

upna

Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

IdAB

Instituto de Agrobiotecnología
Agrobioteknologiako Institutua



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Universidad Pública de Navarra

Departamento de Agronomía, Biotecnología y Alimentación

Instituto de Agrobiotecnología - CSIC- Gobierno de Navarra

Innate immunity against small ruminant lentiviruses (SRLV):

Characterization of APOBEC3-derived restriction

Memoria presentada por

LORENA DE PABLO MAISO

para optar al grado de Doctor por la Universidad Pública de Navarra

Director: Dr. Ramsés Reina Arias

Director: Dr. Damián de Andrés Cara

Pamplona/Iruña, 2019

Dr. RAMSÉS REINA ARIAS, Investigador Ramón y Cajal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Dr. DAMIÁN DE ANDRÉS CARA, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

INFORMAN:

Que la presente memoria de Tesis Doctoral “**Innate immunity against small ruminant lentiviruses (SRLV): Characterization of APOBEC3-derived restriction.**” elaborada por Doña **LORENA DE PABLO MAISO** ha sido realizada bajo su dirección y que cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firman la presente en Pamplona, a 31 de Julio de 2019.

Fdo. Ramsés Reina Arias

Fdo. Damián de Andrés Cara

“Siempre fue mejor lo no buscado”

Izal

AGRADECIMIENTOS

Parece mentira que hayan pasado ya seis años desde que comenzó esta aventura, pero parece que de una manera u otra ha llegado a su fin. Podía resumir estos agradecimientos con un “GRACIAS” que albergue la enorme gratitud hacia todos que habéis hecho este tiempo inolvidable.

Quiero agradecer a la Universidad Pública de Navarra, por la formación y ayuda económica recibida durante esta etapa. Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Gobierno de Navarra, que de un modo u otro han hecho posible el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral.

A mis directores, a Damián por haberme dado la oportunidad de trabajar en su equipo y por el apoyo recibido. A Ramsés, por todos y cada uno de los momentos que hemos compartido durante estos seis años, por los buenos y los no tanto. Por haberme enseñado a investigar, por sus consejos bien y mal recibidos en ciertas ocasiones. Por haber confiado en mí muchas veces, ni tan siquiera cuando yo era capaz de hacerlo. Eskerrik asko, de verdad.

A los BAZs, a las de siempre y a los de ahora. A Idoia, por haberme enseñado mucho de lo aprendido en el labo, porque Apobec3 es de las dos. A Heles, por haberme acogido con su amabilidad y cariño, por haber compartido nuestros ratitos. A las nuevas incorporaciones, a Ana, a Hugo, por estos últimos meses, pero en especial a Irache, porque eres todo lo que se puede desear como compañera, alegría y trabajo a partes iguales. A los de Zaragoza por cada reunión en proyectos, especialmente a Ricardo, eres pura alegría.

A los IL, porque hicisteis de la primera planta una familia. A Iñigo y Solano por los consejos siempre dispuestos. A mi Carmentxu, por los conocimientos y la ayuda en el mundo western blot. A la Echeverz, por ser la constancia pura en el laboratorio. A mi pequeña Titz, que sigamos siendo las mejores “mocatrices”, y a mi primi Sonia, por estar siempre dispuesta a alegrar un jueves con un buen vino de nuestra tierra. A los BM por haber ocupado el hueco en esta planta y haber aportado la alegría necesaria en el día a día. A Oihane, porque sé que puedo contar contigo siempre. A las chicas del labo 12, a las que se fueron, pero en especial a Bea San Román. A Irene, gracias por las innumerables risas y vaciladas en cada concierto, cine o lo que se tercié.

A los AT, a Arancha y Naiara, habéis sido las mejores amigas y compañeras que he tenido la suerte de encontrarme en este camino. Por vuestra sonrisa, humor y sobre todo por estar. A Pilar, porque eres amor en formato ciencia. A Sergio y Laurene. A Toledo por sus consejos en el RNA. A mi Jaiobitas, no sé muy bien donde encajarte. Por los días de esquí, los instantes vividos dentro y fuera, así que solo quiero darte las gracias por volver al IdAB.

Al resto del IdAB, por haber compartido muchos y buenos momentos durante este tiempo. Por amenizar las comidas y por cada buenos días. Que jamás perdamos unos Calderetes y un buen Goldaratz. A Marijose por enseñarme a cuidar el IdAB como mi casa. A los L3, gracias Ancín, Farran y Ali. A los JP, a los JG. Y a Junkal, gracias por cada consejo en esta recta final un poco larga.

A Víctor, porque eres el ALMA, en mayúsculas, de este sitio y ser una de las mejores personas y amigos que conozco.

A nuestro hogar, a María, por los ánimos y los momentos compartidos desde que ambas empezamos este camino. El periodismo necesitaba encontrarte y dar luz a lo que has hecho.

A la Bodeguita, por ser nuestro anclaje al mundo real. Gracias a la sabiduría de todo un barrio y a los conocimientos de euskera de SantaKara. Gracias Monti y Josean, sois lo mejor de Iturrama. A Berna, a mi hermanita Mirentxut, a Agus y Ioseba por cuidarnos y aconsejarnos cada día.

A mis yogurinas, porque siempre decimos que juntas sumamos, y esto es una gran verdad. Por todos los momentos que no nos hace falta nadie más que nosotras. Por cada juerga y cada conversación. Mi salvavidas fuera de este mundo loco. Compartir con vosotras cualquier momento es lo único que necesito. A los Kolorikis, porque juntos somos la mejor familia que se puede elegir.

A mi cuadrilla de Huércanos, por todo lo compartido desde pequeños. Porque aunque no todos entienden este mundo de la ciencia han estado siempre conmigo. Por cada San Pantaleón juntos, cada cena, cada casa rural. A Sheila, María y Vanesa, porque me habéis enseñado que el tiempo no pasa si lo que viene siempre es algo mejor.

A Teresa, por tantos y tantos buenos momentos y por estar ahí siempre, aunque pasen los años y la distancia.

A las Txarrenak, por los ánimos, los Sanfermines, las sidrerías, las tardes de peña y todo lo que se nos da bien. A la Guti, por el interés mostrado siempre y por tener la cataplasma necesaria para cada ocasión.

A mi familia de Pamplona, a mamá Mariaje, por el cariño y apoyo diario, por la verdurita de la huerta y quererme sin condición. A papá Joaquin, a Mikel y a Bea.

A mi Saio, por todo. Porque somos el mejor equipo del mundo. Porque juntas siempre es mejor y siempre superamos todo. Por haber hecho este viaje juntas y por todos los que nos quedan por compartir. Estoy muy orgullosa de haber podido compartir y aprender tanto de ti. Yo también te espero en nuestra fábrica de plásmidos.

A mis abuelas, por haberme educado y criado. Lo sois todo para mí. Porque para ellas, a partir de ahora, parece que vaya a salvar vidas, recetarles medicamentos para sus achaques y operar a corazón abierto. Están orgullosísimas aunque ni siquiera entiendan que es esto.

A mis padres, porque vosotros sí que me lo habéis enseñado todo, que el esfuerzo y el sacrificio se cultivan cada día, y la pasión por vuestra profesión. El amor que siempre me habéis dado y la confianza que siempre habéis puesto en mí. Sin vuestro apoyo diario nunca hubiera podido llegar a lo que soy o seré algún día.

A mi madre

Parte de la introducción de esta Tesis Doctoral ha sido publicada en:

1. **de Pablo-Maiso, L.; Doménech, A.; Echeverría, I.; Gómez-Arrebola, C.; de Andrés, D.; Rosati, S.; Gómez-Lucia, E.; Reina, R.** Prospects in Innate Immune Responses as Potential Control Strategies against Non-Primate Lentiviruses. *Viruses*. 2018 Aug 17;10(8). pii: E435. doi: 10.3390/v10080435.

Los capítulos de esta Tesis Doctoral han sido publicados, o serán publicados en:

2. **de Pablo-Maiso, L.; Glaria, I.; Crespo, H.; Nistal-Villán, E.; Andrésdóttir, V.; de Andrés, D.; Amorena, B.; Reina, R.** Characterization of Ovine A3Z1 Restriction Properties against Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs). *Viruses*. 2017 Nov 17;9(11). pii: E345. doi: 10.3390/v9110345.
3. **de Pablo-Maiso, L.; Glaria, I.; Echeverría, I.; Crespo, H.; Luján, L.; Nistal-Villán, E.; de Andrés, D.; Reina, R.** Vif resistance of APOBEC3Z1 proteins is relieved by CYPA. 2019. En preparación.
4. **de Pablo-Maiso, L.; Echeverría, I.; Luján, L.; de Andrés, D.; Garcin, D.; Nistal-Villán, E.; Reina, R.** Sendai Virus, a strong inducer of anti-lentiviral state in ovine cells. 2019. En preparación.

Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos de investigación:

- Título del proyecto: “Inmunidad innata y adquirida frente a lentivirus de pequeños rumiantes: elementos responsables del tropismo viral y de la presentación clínica de la enfermedad”. Entidad financiadora: **CICYT (AGL2010-22341-C04-01)**.
- Título del proyecto: “Patogenómica traslacional en el estudio de enfermedades infecciosas con implicaciones económico-sanitarias en especies productivas”. Entidad financiadora: **Gobierno de Navarra (referencia IIQ14064.RI1)**.
- Título del proyecto: “Modelos in vitro para evaluación de eficacia inmunológica de β -glucanos de Shiitake. Entidad financiadora: **Agencia de Desarrollo Económico de La Rioja, ADER (en colaboración con UE: FEDER, FEADER) (Ref.: 2013-I-IDD-00074)**.
- Título del proyecto: “Inmunidad implicada en los procesos inmunomediados: síndrome asia ovino y lentivirus de especies productivas. Entidad financiadora: **MINECO_DGICYT (AGL2013-49137-C3-1-R)**.
- Título del proyecto: “Potenciación del estado inmunológico del ganado cunícula a través de betaglucanos de setas (RABBITGLUCAN). Entidad financiadora: **CENTRO PARA EL DESARROLLO TECNOLÓGICO INDUSTRIAL (CDTI) (cofinanciable con FEDER) (Ref.: IDI 20140852)**.
- Título del proyecto: “Inmunopotenciación del ganado cunícula mediante suplementos a base de beta glucanos de setas (CUNIGLUCAN)”. Entidad financiadora: **MAGRAMA Ayudas IDi (REF.: 20140020001815)**.
- Título del proyecto: “Nuevas estrategias de control frente a lentivirus basadas en terapia génica”. Entidad financiadora: **Fundación Caja Navarra Id70558**.
- Título del proyecto: “Contribución a la epidemiología molecular y al control innato de las infecciones lentivirales ovi-caprinas”. Entidad financiadora: **Gobierno de Navarra. Departamento de Desarrollo Económico PI042 LENTIMOL**.
- Título del proyecto: “Epidemiología molecular y control innato de las infecciones lentivirales en el ganado Navarro.” Entidad financiadora: **Gobierno de Navarra. Plan de Desarrollo Rural**.
- Título del proyecto: Herramientas diagnósticas y adyuvantes inmunológicos para el control del Ectima contagioso en Navarra. (CONNECTIM).” **Entidad financiadora: Gobierno de Navarra. Centros Tecnológicos**.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 19 |
| SUMMARY | 25 |
| INTRODUCCIÓN | 31 |
| 1. <i>Lentivirus de pequeños rumiantes</i> | 31 |
| 1.1 Estructura y genoma | 32 |
| 1.1.1 Genes y proteínas | 35 |
| 1.2 Clasificación | 40 |
| 1.2.1 Clasificación filogenética | 41 |
| 2. <i>Biología viral</i> | 43 |
| 2.1 Ciclo viral | 43 |
| 2.2 Mecanismos determinantes de la resistencia o susceptibilidad | 46 |
| 2.2.1 Mecanismos de resistencia por especie | 46 |
| 2.2.2 Resistencia por tejido | 48 |
| 2.2.3 Resistencia celular | 50 |
| 3. <i>Respuesta inmunitaria</i> | 52 |
| 3.1 Respuesta innata | 53 |
| 3.1.1 Receptores del sistema innato | 53 |
| 3.1.2 Control de la inmunidad adaptativa por parte de la inmunidad innata | 61 |
| 3.1.3 Inmunidad innata en infecciones por SRLV | 62 |
| 3.1.4 Inmunidad adaptativa en infecciones por SRLV | 63 |
| 3.2 Selección genética | 66 |
| 4. <i>Patogénesis y formas clínicas de la enfermedad</i> | 67 |
| 5. <i>Importancia de la infección</i> | 68 |
| 5.1 Impacto económico | 68 |
| 6. <i>Diagnóstico y métodos de control</i> | 69 |
| 6.1 Métodos de control | 71 |
| 6.1.2 Métodos serológicos | 72 |
| 7. <i>Factores de restricción</i> | 74 |
| 7.1 TRIM5 α | 75 |
| 7.2 SAMHD1 | 77 |
| 7.3 BST2A | 78 |
| 7.4 APOBEC3 | 80 |
| 7.4.1 Mecanismos de acción | 82 |
| 7.4.2 APOBEC3 y HIV | 86 |

| | |
|---|------------|
| 7.4.3 Neutralización mediante Vif viral..... | 88 |
| 7.4.4 Evolución de los lentivirus..... | 90 |
| 7.4.5 APOBEC3 ovino | 95 |
| 8. Vacunación..... | 96 |
| 9. Sendai virus y su valor como vector en estrategias de vacunación. | 98 |
| 9.1 Genes y proteínas | 99 |
| 9.2 Ciclo de replicación..... | 101 |
| 9.3 Tropismo e inducción de respuesta inmunitaria..... | 102 |
| 9.4 Vectores basados en SeV | 104 |
| 9.5 Estrategias profilácticas y terapéuticas basadas en SeV | 105 |
| 9.5.1 SeV y HIV | 107 |
| REFERENCIAS | 109 |
| OBJETIVOS | 141 |
| CHAPTER I..... | 143 |
| <i>Characterization of Ovine A3Z1 Restriction Properties against SRLVs</i> | |
| ABSTRACT | 145 |
| INTRODUCTION..... | 146 |
| MATERIAL AND METHODS | 148 |
| RESULTS..... | 155 |
| DISCUSSION..... | 170 |
| REFERENCES..... | 173 |
| CHAPTER II..... | 177 |
| <i>Vif resistance of APOBEC3Z1 proteins is relieved by CYPA</i> | |
| ABSTRACT | 179 |
| INTRODUCTION..... | 180 |
| MATERIAL AND METHODS | 182 |
| RESULTS..... | 185 |
| DISCUSSION..... | 196 |
| REFERENCES..... | 199 |
| SUPPLEMENTARY MATERIAL..... | 201 |
| CHAPTER III..... | 203 |
| <i>Sendai Virus, a strong inducer of anti-lentiviral state in ovine cells</i> | |
| ABSTRACT | 205 |
| INTRODUCTION..... | 206 |
| MATERIAL AND METHODS | 208 |
| RESULTS..... | 211 |
| DISCUSSION..... | 222 |
| REFERENCES..... | 225 |
| SUPPLEMENTARY MATERIAL..... | 228 |
| PROYECTOS FUTUROS..... | 229 |
| CONCLUSIONES | 245 |

RESUMEN

RESUMEN

La infección por lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV) está extendida en todo el mundo afectando la productividad de la ganadería ovi-caprina. La ausencia de tratamientos y de estrategias de vacunación aplicables en campo limita su control a la detección de la enfermedad mediante métodos serológicos, que, sin embargo, fallan a la hora de controlar todos los animales infectados, impidiendo la erradicación y favoreciendo la re-emergencia..

Se han empleado diferentes estrategias de inmunización incluyendo virus inactivado, virus vivos modificado genéticamente para su atenuación, proteínas recombinantes o vacunas ADN que, sin embargo, no inducen inmunidad esterilizante. Las vacunas inactivadas dan lugar a un exacerbamiento de la enfermedad tras el desafío experimental, posiblemente debido a procesos mediados por el sistema inmune. La administración de vacunas ADN incluyendo moléculas coestimuladoras B7 o virus atenuados de manera natural (genotipo E) son las opciones más prometedoras hasta el momento desde el punto de vista de la protección. Sin embargo, la aplicación de vacunas ADN a través de partículas de oro coloidal no parece aplicable en campo al ganado ovino y los virus atenuados suponen una infección de facto que podría originar problemas de recombinación con las estirpes de SRLV que circulen en el territorio.

Los factores de restricción inducibles por interferón son proteínas con capacidad para inhibir distintas fases del ciclo de replicación de los lentivirus. Algunas especies moleculares de TRIM5 α ovino como algunas proteínas APOBEC3 (Z2Z3) poseen actividad antiviral, no sólo frente a los SRLV sino también frente a lentivirus que infectan otras especies como la humana.

La caracterización de factores del hospedador que sean capaces de restringir la replicación de los lentivirus podría abrir una nueva estrategia para controlar las infecciones basada en la terapia o en la selección genética.

En esta tesis se han llevado a cabo los siguientes estudios:

1. **Identificación y caracterización de la restricción por APOBEC3 ovino frente a los SRLV.** Se han estudiado dos tipos celulares que muestran restricción natural frente a los SRLV, monocitos y macrófagos-M1, identificando la isoforma Z1 como la más expresada, entre las proteínas APOBEC3 ovinas. En la caracterización genética de A3Z1 se ha identificado una isoforma adicional resultante de splicing alternativo, también presente en el transcriptoma humano y que carece del

dominio citidín desaminasa (A3Z1Tr) característico de este tipo de proteínas. La expresión de estas proteínas se induce tanto tras la incubación con IFN- γ como con la infección viral. Ambas son resistentes a la degradación por Vif de SRLV y pueden encapsidarse en los viriones. Mediante ensayos de inmunoprecipitación se ha podido determinar que ambas proteínas pueden interactuar entre sí así como con Vif viral, a pesar de la resistencia que presentan a su degradación. La expresión endógena de A3Z1 en células en cultivo tipo fibroblasto (*T-immortalized goat epithelial fibroblasts*, TIGEF) tan solo ha sido posible empleando estrategias de expresión transitoria, ya que los intentos de expresión permanente resultaban en cultivos abortivos. Las células TIGEF que expresan A3Z1 muestran una menor producción de SRLV. Ensayos de infectividad de un solo ciclo (*single cycle infection*) con vectores virales basados en HIV-1, MLV y SIV indican que A3Z1 ovino es capaz de inhibir la infectividad de dichos vectores. El mecanismo de restricción parece implicar la actividad citidín desaminasa en el contexto GA/AA. En ambos casos, la co-expresión de la isoforma truncada mitiga la restricción, probablemente por competición estérica con la proteína nativa en el interior de los viriones.

- 2. Caracterización de las vías de degradación de APOBEC3.** Se ha investigado la capacidad de A3Z1 de restringir la infección con estirpes de SRLV que codifican la proteína Vif. Mediante ensayos de inmunoprecipitación se ha podido comprobar que CYP A y no CBF- β es el cofactor necesario para la degradación de las proteínas APOBEC3 ovinas, requisito esencial en el caso de A3Z1 y A3Z1Tr. Concentraciones altas de CYP A permiten la degradación de A3Z1 por parte de Vif en diferentes tipos celulares, promoviendo así la infección por lentivirus. Sin embargo, no se alcanzan los niveles basales de A3Z1 empleando inhibidores del proteasoma y la degradación se produce también en presencia de Vif mutado, incapaz de reclutar el complejo ubiquitín ligasa y degradar así proteínas por la vía proteasomal, abriendo la posibilidad a la existencia de vías alternativas que permitan degradar A3Z1. Tan solo la combinación de inhibidores del proteasoma junto con inhibidores de la autofagia conseguían restablecer los niveles basales de A3Z1 sugiriendo la implicación de ambas vías. Además, la inhibición de la autofagia parece perjudicar la infección por SRLV, sugiriendo que la inducción podría favorecerla.

3. **Estimulación de la respuesta innata ovina a través de la infección con vectores virales basados en el virus murino Sendai.** La infección de células ovinas con un vector viral basado en el virus Sendai que codifica la proteína verde fluorescente (SeV-GFP) ha resultado ser del 100%, incluso en macrófagos de distintos orígenes. Sin embargo, la infección con SeV-GFP no se transmite en células ovinas y el vector es no replicativo. La infección con SeV-GFP ha activado una programación diferente dependiendo del tipo celular ovino, siendo la inducción de A3Z1 en células mieloides de especial importancia. La infección con SRLV y la producción de virus se encontraba disminuida en estas células tras el tratamiento con el vector viral. Los sobrenadantes procedentes de estos cultivos eran capaces de transmitir la restricción a células frescas, probablemente debido a la producción de interferón de tipo 1, sugiriendo que podría ser de utilidad en futuras estrategias de inmunización. La restricción también se ha observado frente a vectores basados en lentivirus, como HIV o SIV.

SUMMARY

SUMMARY

Small ruminant lentiviruses (SRLV) infection is widespread over the world, affecting sheep and goat productivity. The lack of treatments and vaccination strategies restrain the control to the identification of infected animals by serological methods that, however, do not account for the wide antigenic spectrum described for SRLV, preventing eradication and favoring re-emergence.

Different immunization strategies have been used including inactivated viruses, genetically modified live-attenuated viruses, recombinant proteins or DNA vaccines that, nonetheless, do not induce sterilizing immunity. Inactivated vaccines give rise to disease exacerbation after the experimental challenge, possibly due to immune system processes. Both the administration of a DNA vaccine encoding B7 costimulatory molecules or the inoculation of a naturally attenuated virus (genotype E1) are the most promising options described so far, from the protection point of view. Nevertheless, DNA vaccine administration, using colloidal gold, does not seem to be suitable in the field and attenuated viruses represent an infection that may arise recombination problems with the circulating SRLV variants.

Interferon inducible restriction factors are a group of proteins able to inhibit different phases of the lentivirus replication cycle. Some ovine TRIM5 α molecular species, as well as APOBEC3 (Z2Z3) hold antiviral activity, not only against SRLV but also against lentivirus that infects other species, such as humans.

Characterization of host restriction factors able to restrict lentivirus replication, could open up new strategies to control SRLV infection, based on cellular therapy or genetic selection.

Different studies have been carried out in this thesis:

1. **Identification and characterization of the restriction exerted by ovine APOBEC3 against SRLV.** Two cellular types that show natural restriction against SRLV have been studied, monocytes and M1-macrophages, identifying the Z1 isoform as the most expressed, among the ovine APOBEC3 proteins. In the genetic characterization of A3Z1, an additional isoform resulting from alternative splicing, also present in the human transcriptome, was described. This new isoform lacks the cytidine deaminase domain (A3Z1Tr), characteristic of this type of proteins. Both A3Z1 proteins were induced after incubation with IFN- γ as well as after viral infection, are resistant to Vif SRLV degradation and can be

incorporated into virions. Through immunoprecipitation assays we have been able to determine that both A3Z1 proteins can interact, as well as with viral Vif, in spite of their resistance to degradation. A3Z1 endogenous expression in fibroblast type cells (T-immortalized goat epithelial fibroblasts, TIGEF) has only been possible using transient expression strategies, because permanent expression experiments resulted in aborted cultures. TIGEF cells that transiently express A3Z1 show a lower SRLV production. Single cycle infectivity trials with viral vectors based on HIV-1, MLV and SIV showed that ovine A3Z1 is able to inhibit the aforementioned vectors. The restriction mechanism seem to be citidin deaminase dependent in the GA/AA context. In both cases, the co-expression of the truncated isoform mitigates the restriction, probably by steric competition with the native protein inside the virions.

2. **Characterization of APOBEC3 degradation pathways.** The ability of A3Z1 to restrict SRLVs encoding the Vif protein has been investigated. Through immunoprecipitation assays it has been possible to confirm that CYP A, and not CBF- β is the cofactor for the optimal degradation of ovine APOBEC3, an essential requirement in the case of A3Z1 and A3Z1Tr. High concentrations of CYP A allowed the degradation of A3Z1 by Vif in different cell types, thus promoting lentivirus infection. However, A3Z1 basal levels were not restored when proteasome inhibitors were used. Furthermore, degradation also happened in the presence of a mutated Vif, unable to recruit the ubiquitin ligase complex and degrade proteins by the proteasome pathway, opening alternative pathways to degrade A3Z1. The combination of proteasome and autophagy inhibitors was able to restore A3Z1 basal levels, suggesting the involvement of both pathways. In addition, autophagy inhibition seems to impair SRLV infection, suggesting that induction could be a virus promoting mechanism.
3. **Stimulation of innate immune response through murine Sendai virus vectors.** The infection of ovine cells with a Sendai virus vector that encodes the green fluorescent protein (SeV-GFP) has been obtained at the 100% level, even in macrophages from different origins. However, SeV-GFP was a non-replicative vector and infection was not transmitted among ovine cells.

Infection with SeV-GFP induced a different activation depending on the cell type, being the induction of A3Z1 in myeloid cells of special importance. Infection with SRLV as well as virus production were reduced in these cells after treatment with the viral vector. Supernatants from SeV infected cell cultures were able to transmit the restriction to fresh cells, likely due to type I IFN production, suggesting the potential application of this vector in future immunization strategies. The restriction has also been observed against lentivirus-based vectors from HIV or SIV.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Lentivirus de pequeños rumiantes

El género *Lentivirus* pertenece a la familia *Retroviridae*, que se caracteriza por la capacidad de retrotranscribir el RNA viral monocatenario a DNA de doble cadena, a través de la enzima retrotranscriptasa (RT), para su integración en el genoma del hospedador. A este grupo pertenecen los virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 (HIV-1 y HIV-2), el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) y el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), que causan un síndrome de inmunodeficiencia basado en la depleción o en el mal funcionamiento de los linfocitos T CD4+. Otros lentivirus infectan macrófagos pero no linfocitos, causando una enfermedad caracterizada por la afección del sistema retículo-endotelial, pulmones, sistema nervioso central, articulaciones y glándula mamaria, sin una severa depleción linfocitaria en sangre. A este segundo grupo pertenecen el virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV), el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) y los lentivirus de pequeños rumiantes (Small Ruminant Lentiviruses, SRLV).

Los SRLV, antiguo prototipo del género *Lentivirus*, son prácticamente endémicos en el ganado ovino y caprino de todo el mundo con recientes descripciones en Asia, Centroamérica y Sudamérica (Kokawa et al., 2017; Panei et al., 2017; Sanchez et al., 2016). El impacto económico que causa la infección se ha subestimado, ya que la aparición de los síntomas es tardía y depende de factores relacionados con la susceptibilidad de la raza y del individuo, el sistema de producción, las prácticas ganaderas, el genotipo infectante o la vía de contagio (Peterhans et al., 2004). El desvieje prematuro es quizás la consecuencia más consensuada de la entrada de SRLV en un rebaño, lo que implica importantes pérdidas económicas debido a la reducción de la productividad de las explotaciones. También se ha descrito una disminución de la fertilidad, del número de corderos, del peso al nacer y en el engorde y de la calidad de la carne (Leitner et al., 2010). La infección puede provocar también un menor rendimiento en la producción de leche, alrededor del 10%, además de afectar a su calidad ya que contiene menos grasa, lactosa y extracto seco así como un alto contenido de células somáticas (Martinez-Navalon et al., 2013). Asimismo, la exportación de ganado a otros países se ve afectada, ya que muchos exigen certificados de ausencia de virus o de patologías asociadas a la infección por SRLV, valorizando los rebaños certificados libres de SRLV (Perez et al., 2010). Actualmente, no se dispone de tratamientos o estrategias de vacunación efectivas.

Inicialmente considerados agentes etiológicos distintos, el virus Visna-maedi ovino (VMV) y el virus de la artritis encefalitis caprina (CAEV), en realidad pertenecen a un único grupo genético debido a la proximidad filogenética y a la transmisión natural de ambos virus entre ovejas y cabras (Shah et al., 2004b; Zaroni, 1998). Actualmente se consideran genotipos distintos dentro de un continuo al que se le ha denominado SRLV.

El VMV fue el primer virus descrito causante de las llamadas infecciones lentivirales. Fue aislado por Sigurdsson en los años 50 (Sigurdsson et al., 1952; Sigurdsson B, 1960), durante la epidemia de enfermedades lentas que azotó Islandia en los años cuarenta, tras la importación desde Alemania de ovinos de raza Karakul para la mejora de la producción. La epidemia provocó la pérdida de 150.000 animales afectados y el sacrificio de otros 600.000 (Thormar, 2013).

La enfermedad causada por CAEV y su etiología retroviral se describieron en Estados Unidos en 1974 (Cork et al., 1974) y el virus fue aislado en 1980 (Crawford et al., 1980).

En España, la presencia de animales infectados se describió por primera vez en los años ochenta (Badiola et al., 1983) y desde entonces se ha detectado allí donde se ha estudiado, aunque los datos de prevalencia son variables dependiendo de la zona geográfica. Estudios que comprenden Navarra y La Rioja (Luján et al., 1993), Euskadi (Gonzalez et al., 1987), León (Benavides et al., 2006a) y Cataluña (Alba et al., 2008) revelan prevalencias entre el 90 y 100% en rebaños, y entre 40 y 66% en individuos, lo que hace prácticamente imposible encontrar algún rebaño sin individuos seropositivos. En zonas de Andalucía (Barrero Domínguez et al., 2017), Galicia (Lago et al., 2012), Comunidad de Madrid (Barquero et al., 2011) y Castilla la Mancha (Leginagoikoa et al., 2006), la prevalencia decae por debajo del 50% en rebaños y por debajo del 30% al nivel de individuo. Asimismo, los cuadros clínicos que se observan en el ganado de nuestro país dependen de la zona de estudio. Tradicionalmente, las sintomatologías más frecuentes han sido la mamaria y respiratoria (Lujan et al., 1994a), aunque también se han descrito formas articulares en Aragón (Glaría et al., 2009) y nerviosas en León (Benavides et al., 2006b).

1.1 Estructura y genoma

Tanto los lentivirus animales, como los que afectan a humanos exhiben una ultraestructura así como una organización genómica muy similares. El genoma y algunas proteínas virales asociadas como la retrotranscriptasa (RT), la proteasa (PR) o

la integrasa (IN) están protegidas por la nucleocápside (NC) que, a su vez, está rodeada de la cápside (CA) y la matriz proteica (MA). El virión posee una envoltura exterior lipídica procedente de la membrana plasmática celular, en la que están embebidas las glicoproteínas de la envoltura viral formadas por las subunidades transmembrana (TM) y de superficie (SU) (**Figura 1**).

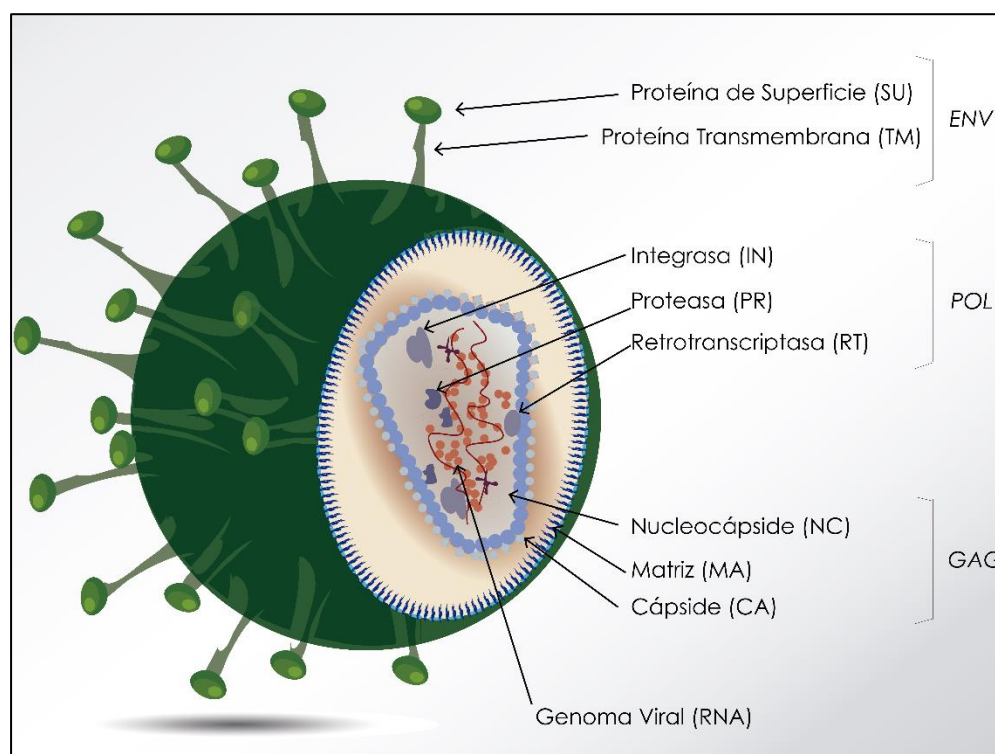


Figura 1. Estructura del virión. Virión de lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV) mostrando sus principales componentes, entre ellos las dos cadenas de RNA de sentido positivo, las proteínas estructurales Gag (nucleocápside, NC; cápside, CA y matriz, MA), las proteínas Pol (proteasa, PR, retrotranscriptasa, RT e integrasa, IN) y las glicoproteínas Env (superficie, SU y transmembrana, TM) distribuidas en la envoltura lipídica de origen celular.

El genoma consiste en dos cadenas monocatenarias de RNA idénticas de sentido positivo de entre 8 y 9,5 kb. El extremo 5' metilado y el 3' poliadenilado le confieren equivalencia a un RNA mensajero celular (Gifford, 2012). El genoma codifica tres genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*) y de tres a seis genes accesorios dependiendo de la especie de Lentivirus: *vif*, *vpr-like* y *rev* están presentes en SRLV; y además *vpu*, *tat*, *nef* y *vpx* en HIV-1 (**Figura 2**). En la forma proviral, el genoma está flanqueado por una región repetida no codificante, denominada *Long Terminal Repeat* (LTR) que realiza las funciones de regulador de la transcripción viral.

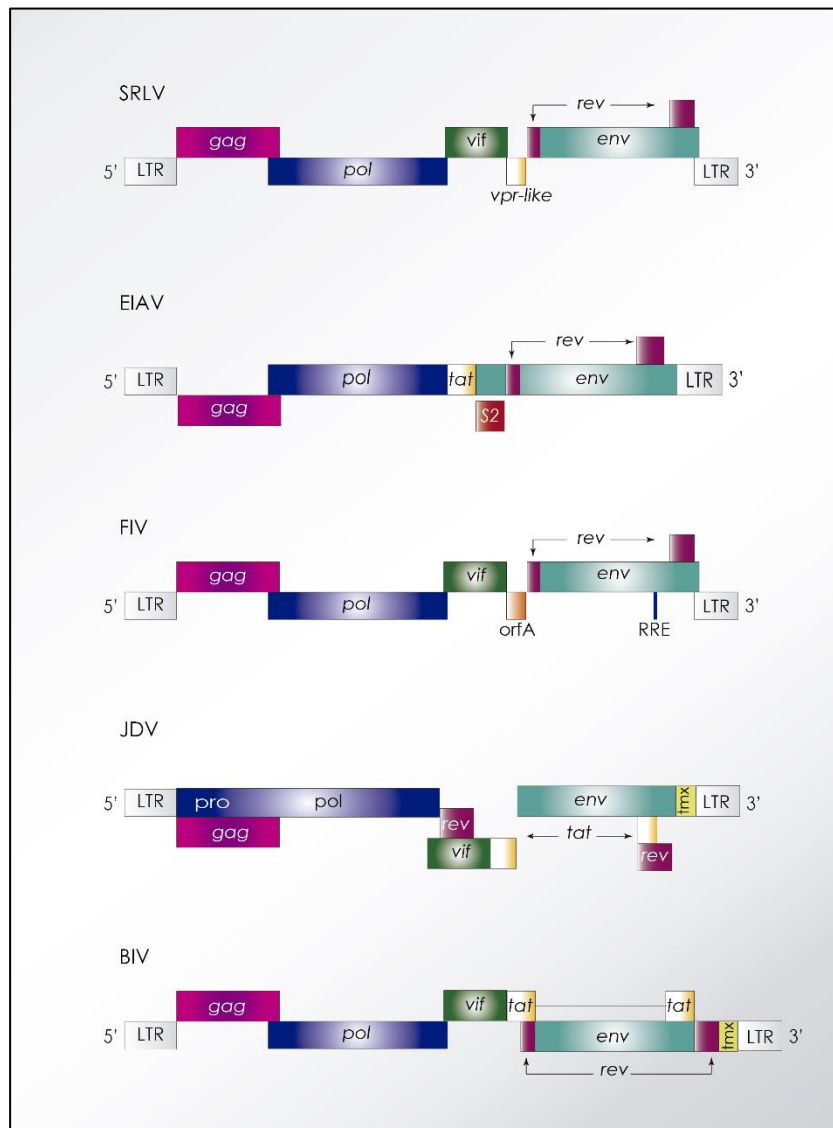


Figura 2. Organización del provirus de lentivirus animales. Genoma de los Small Ruminant Lentiviruses (SRLV), Equine infectious anemia virus (EIAV), Feline immunodeficiency virus (FIV) y los que afectan a bovinos, Jembrana disease virus (JDV) y Bovine immunodeficiency virus (BIV).

1.1.1 Genes y proteínas

- a) **env** (*envelope*): codifica dos glicoproteínas implicadas en la unión con el receptor celular y por tanto con la entrada en las células hospedadoras, además de ser las proteínas más expuestas al sistema inmune. A partir de un precursor único, tras ser digerido por proteasas celulares, se obtienen las subunidades transmembrana (TM o gp46) y de superficie (SU o gp135). La proteína Env expresada en la membrana de células infectadas es capaz de reconocer receptores en la membrana de las células sanas colindantes provocando la fusión de membranas y permitiendo la propagación de la infección sin necesidad de producir partículas virales completas (Sanchez et al., 2002; Yan and Chen, 2012). La fusión celular da lugar al efecto citopático característico *in vitro* de las infecciones por SRLV, es decir, la formación de sincitios o células multinucleadas. Las proteínas codificadas por el gen *env* desencadenan la formación de anticuerpos neutralizantes (AcNt) y podrían intervenir en el reconocimiento del receptor celular responsable de la infección (Pisoni et al., 2010). Los anticuerpos neutralizantes descritos en la literatura reconocen motivos presentes en la proteína Env y se han descrito mutantes de escape a la neutralización (Haflidadottir et al., 2008; Laakso et al., 2007).
- b) **gag** (*group specific antigen*): codifica una única poliproteína, el precursor p55-GAG, que tras ser digerida por la proteasa viral da lugar a las proteínas estructurales de la nucleocápside (NC o p14), cápside (CA o p25) y matriz (MA o p17). La proteína más abundante del virión, la p25, forma el core hidrofóbico que induce una fuerte respuesta humoral, por lo que se emplea como antígeno en los test ELISA indirectos disponibles en el comercio (de Andres et al., 2005).
- c) **pol** (*polymerase*): codifica proteínas relacionadas con la replicación del material genético que ejercen su actividad en distintos puntos del ciclo viral. La retrotranscriptasa (RT), proteína que da nombre a toda la familia *Retroviridae*, sintetiza una doble cadena de DNA a partir del RNA viral monocatenario. Además, durante este proceso, degrada la hebra de RNA del híbrido RNA/DNA y elimina el cebador tRNA^{Lys-3} a través de su actividad RNAasa H. La proteasa (PR) madura p55-GAG en las tres proteínas estructurales; y la integrasa (IN) se encarga de activar los extremos de los transcritos reversos para la integración. En el núcleo, la IN cataliza la reacción de transferencia de cadenas por la que el DNA viral queda ligado covalentemente al DNA cromosómico, forma que se conoce como provirus. La

detección de secuencias provirales se emplea con fines diagnósticos y como punto de partida en estudios filogenéticos y/o de caracterización de estirpes.

La subunidad **dUTPasa** del gen *pol*, exclusiva de lentivirus animales, exceptuando el genotipo E de SRLV, está implicada en la virulencia y la tasa de mutación viral. En general, los estudios han indicado que tiene un papel importante en la replicación viral productiva en células que no se dividen y en la hidrólisis de dUTP a dUMP, evitando la incorporación errónea de uracilos en la retrotranscripción. Esta actividad toma especial relevancia en células con una alta proporción de dUTP:dTTP, como los macrófagos, células diana de los SRLV. Sin embargo, la ausencia de hipermutaciones en el genotipo E y la presencia de altas cargas virales *in vivo* pueden llevar a replantear la definición de las funciones de la dUTPasa (Reina et al., 2009a).

- d) **vif** (**viral infectivity factor**): la proteína codificada por este gen, situado entre los genes *gag* y *pol*, es esencial para la replicación de HIV-1 en linfocitos, pero no en líneas celulares como HeLa, COS7 o 293T, dando origen a la clasificación de células en permisivas y no permisivas en función de la capacidad replicativa de un virus mutante Δ vif (Gabuzda et al., 1992; Strebel et al., 1987). Fusionando los núcleos de células permisivas y no permisivas, se observó un fenotipo no permisivo sugiriendo la presencia de un factor celular capaz de bloquear la replicación de los virus Δ vif. La proteína Vif evita la incorporación en las partículas virales del factor de restricción celular APOBEC3 (A3) (Sheehy et al., 2002) presente en las células no permisivas. Vif se une a las proteínas A3 y al complejo E3 ubiquitina ligasa, induciendo la poliubiquitinación de A3 y su posterior degradación vía proteasoma. También se ha observado que Vif es necesaria para la replicación de HIV-2 (Reddy et al., 1995), SIV (Desrosiers et al., 1998), FIV (Tomonaga et al., 1992) y CAEV (Harmache et al., 1995). En el caso de VMV, se ha considerado esencial para la replicación en las células diana naturales, tanto *in vivo* como *in vitro* (Kristbjornsdottir et al., 2004). Se han identificado mutaciones en Vif que producen una replicación atenuada en macrófagos *in vitro*. También se dan patrones de replicación atenuados en células permisivas donde se dan mutaciones puntuales en Vif, junto con una mutación en la CA (Gudmundsson et al., 2005). Además se han estudiado otras mutaciones puntuales en Vif dando como resultado una acumulación de hipermutaciones debidas a la desaminación provocada por APOBEC3, sugiriendo que Vif viral puede ejercer más de una función y que puede haber interacción entre éste y la CA (Franzdottir et al., 2016).

La proteína Vif está constituida por un dominio N-terminal por el que se une a APOBEC3, seguido de los dominios HCCH, BC-box y PPLP de unión a las distintas subunidades del complejo E3 ubiquitina ligasa (**Figura 3**). Se ha estudiado la estructura tridimensional de la proteína Vif y las interacciones mostradas con las proteínas APOBEC3 y el complejo E3 están en concordancia con los datos empíricos, lo que podría ayudar en el diseño de nuevas drogas (da Costa et al., 2014).

Diversos estudios realizados en HIV, han demostrado que Vif emplea un cofactor celular para ayudar a degradar A3. En el caso de lentivirus primates, CBF- β (Core binding factor beta) interactúa con Vif de HIV y SIV para mejorar la biosíntesis, el plegamiento y la estabilidad del factor viral, mejorando así la formación del complejo E3 ubiquitina ligasa, lo que lleva a aumentar la degradación de A3G y la infectividad viral (Hultquist et al., 2011; Jager et al., 2011). El reclutamiento de CBF- β por parte de Vif solo se ha atribuido a HIV y SIV y es completamente prescindible para la actividad de lentivirus animales no primates, SRLV, FIV y BIV (Miyagi et al., 2014; Zhang et al., 2011). En el caso de SRLV, se ha identificado Ciclofilina A (CYPA) como un factor necesario para la degradación de A3 vía proteasoma.

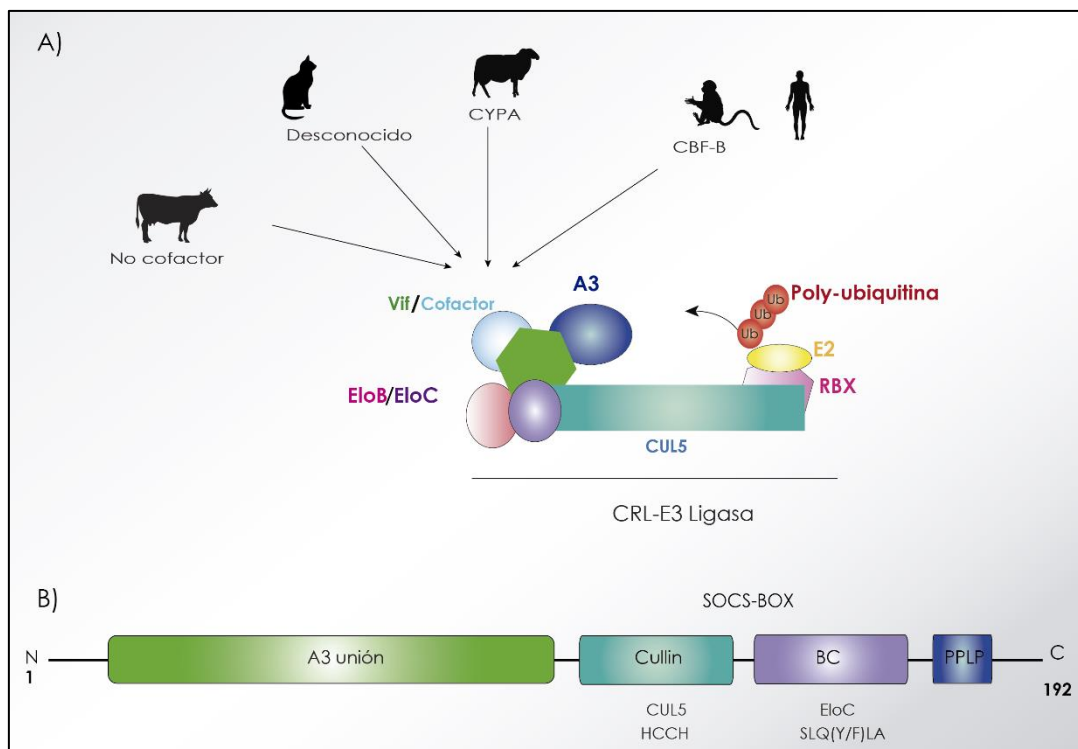


Figura 3. Estructura complejo CRL-E3 ubiquitín ligasa y las regiones de Vif. (A) Esquema de los cofactores utilizados por los lentivirus. **(B)** Representación esquemática de los motivos de Vif implicados en interacciones con moléculas virales y celulares. La región N-terminal se ha implicado en la unión a A3. Vif se asocia con Cul5-EloB-EloC mediante la unión directa a Cul5 a través de residuos hidrófobos dentro de una región de unión a zinc formado por el motivo HCCH, y a EloC mediante un motivo conservado dentro de la caja BC. Este motivo SLQXLA, es esencial para la degradación de A3 vía proteasoma. En la región C-terminal, se encuentra el motivo proteolítico de PPLP, involucrado en asociaciones con pr55Gag y multimerización de Vif, necesarias para unión a RNA y patogénesis.

La acción de Vif como supresor de A3 es generalmente específica de especie, es decir, el factor lentiviral de un virus concreto puede inhibir A3 de su hospedador natural, pero no el de otras especies. La divergencia en Vif es de hecho muy alta entre los diferentes lentivirus. Sin embargo, en el caso de Vif de SRLV, La Rue y colaboradores describen como “promiscuidad” la capacidad que éste tiene para inhibir la actividad antiviral de A3 de ovino, pero también el de humano, mono, felino y bovino, aunque la eficacia sea menor (Larue et al., 2010).

- e) **rev (regulator of virion expression)**: la proteína Rev es esencial para la replicación viral (Tiley et al., 1991; Toohey and Haase, 1994) y está implicada tanto en la estabilidad de los RNA virales tras los procesos de corte y empalme (splicing), como en el transporte y la protección del RNA del núcleo al citoplasma para su

traducción. Contiene señales que le permiten entrar al núcleo donde ejerce su acción mediante su unión a RRE (*Rev Responsive Element*) situado en el gen *env*.

- f) **vpr-like (viral protein R)**: en un principio se denominó *tat* por analogía con la posición que ocupa en el genoma comparado con el de otros Lentivirus. Sin embargo, su capacidad transactivadora, función principal de Tat, es prácticamente nula (Villet et al., 2003b). Estudios funcionales posteriores demostraron una mayor compatibilidad con la proteína Vpr (Villet et al., 2003a). Esta juega un papel importante en la regulación del transporte del complejo de pre integración (PIC, *Preintegration complex*) al núcleo y es necesaria para que el virus se replique en células que no se dividen, como las células de la serie monocito-macrófago, una de las principales dianas del virus. En cambio, en células con capacidad proliferativa, causa un bloqueo del ciclo celular en fase G2 y apoptosis, lo que puede provocar una disfunción inmunitaria (Villet et al., 2003a). Vpr-like es además capaz de inducir apoptosis siguiendo la vía clásica (Bouzar et al., 2003).
- g) **LTR (Long Terminal Repeat)**: es una región que no codifica ninguna proteína y su función principal es la de proporcionar los sitios de unión a factores de transcripción, modulando así las fases latentes y productivas (Barros et al., 2005). Está compuesta por las regiones U3, R y U5, y en el provirus está presente de manera duplicada en ambos extremos del genoma. Contiene todas las señales requeridas para la expresión génica de eucariotas como el promotor o *enhancer*, el punto de inicio de la transcripción (*capping*), el terminador de la transcripción y la señal de poliadenilación. La expresión dirigida por las señales contenidas en la región LTR se lleva a cabo por las proteínas de la célula hospedadora. La región U3, situada en el extremo 5' del provirus, contiene la caja TATA, que marca el inicio de la transcripción y los sitios de unión a factores de transcripción necesarios para la regulación. La región R contiene el sitio CAP y la señal de poliadenilación de los mRNA. Por último, la región U5 es la primera que se retrotranscribe y constituye el extremo 3' del provirus.

La región LTR es también importante desde el punto de vista del diagnóstico molecular por PCR, ya que presenta zonas conservadas y se encuentra duplicada en el provirus, lo que podría aumentar la sensibilidad (Alvarez et al., 2006). Existen además formas abortivas de la región LTR que son susceptibles de amplificación por PCR correspondientes a estructuras circulares (formadas por recombinación homóloga entre las dos regiones LTR presentes en el provirus), formas circulares

con 2-LTR (producto de la ligación entre ambas regiones) y formas lineales con dos regiones LTR, una en cada extremo (Oskarsson et al., 2007).

1.2 Clasificación

La elevada variabilidad genética y antigénica de los SRLV se debe a la confluencia de distintos mecanismos. Por un lado y como se ha mencionado anteriormente, la RT posee una elevada tasa de error, que junto con la ausencia de sistemas de corrección contribuye a una alta frecuencia de mutaciones puntuales, incluyendo inserciones y deleciones. Se ha estimado que la tasa de mutaciones oscila entre 0,1 y 2 mutaciones por genoma y ciclo replicativo (Roberts et al., 1988). Otro mecanismo de variabilidad es la recombinación, que se da cuando una célula es co-infectada por dos o más virus (Smyth et al., 2012). En estos casos, la RT puede *saltar* de un genoma a otro durante la retrotranscripción dando lugar a virus recombinantes, lo que puede suponer una ventaja evolutiva (L'Homme et al., 2015). La presión selectiva que ejerce el sistema inmune es también una fuente de variabilidad en los SRLV. Así, los anticuerpos neutralizantes inducidos tras la infección seleccionan mutantes de escape, las proteínas APOBEC3 se incorporan en las partículas de nueva formación y durante la retrotranscripción desaminan citosinas produciendo hipermutaciones de G a A en la cadena cDNA+, etc. (Bishop et al., 2004; Vartanian et al., 1991). Incluso los propios métodos de control, basados en un diagnóstico precoz a través de la evaluación clínica y la aplicación de métodos serológicos, pueden dar lugar a mutantes de escape (Cardinaux et al., 2013). Por último, la propia célula diana de los SRLV puede contribuir a aumentar la variabilidad genética ya que los macrófagos poseen un alto ratio de dUTP:dTTP, lo que proporciona uracilos que pueden ser incorporados mutando el DNA viral (Terai and Carson, 1991).

Esta variabilidad ha dado lugar a la existencia de diferentes genotipos de SRLV capaces de infectar un amplio rango de hospedadores, tales como ovejas, cabras y algunos rumiantes silvestres (Erhouma et al., 2008; Minardi da Cruz et al., 2013; Patton et al., 2012; Sanjose et al., 2016). Además, la variabilidad genética se traduce en variabilidad biológica ya que los SRLV muestran un amplio abanico de signos clínicos, como lo demuestran las afecciones neurológicas, artríticas, pulmonares y/o mamarias. Cabe destacar que dicha diversidad cobra especial relevancia en el diseño de estrategias de control basadas en el diagnóstico precoz o en el desarrollo de vacunas (Murphy et al., 1999).

1.2.1 Clasificación filogenética

Tradicionalmente los SRLV se han clasificado respondiendo a las características biológicas analizadas *in vitro* y a la patogenicidad observada *in vivo* (Querat et al., 1984). El estudio de más aislados de campo reveló la dificultad para clasificar las estirpes en estas categorías, por lo que se optó por una clasificación atendiendo a la variabilidad genética. Los primeros estudios genéticos realizados en 1997 demostraron que los aislados procedentes de ovinos de una zona concreta de Francia eran más parecidos a las secuencias de CAEV que a las de Maedi descritas en aquel momento, acuñando el término SRLV, que representa la variabilidad genética de este grupo de virus (Leroux et al., 1997b). Shah y colaboradores, siguiendo los criterios empleados para el HIV (Peeters and Sharp, 2000) extendieron estas observaciones y propusieron una clasificación de tipo filogenético basándose en dos segmentos largos del genoma de los SRLV (el segmento *gag-pol* de 1,8 kb; y el segmento *pol* de 1.2 kb) (Shah et al., 2004a). Más tarde se demostró que esta clasificación podía obtenerse teniendo en cuenta otras zonas genómicas como LTR (Reina et al., 2006). Atendiendo a dicha clasificación, los genotipos virales de SRLV se dividen en cinco grupos que difieren entre un 25% y un 40% de su secuencia nucleotídica. Los genotipos A, B y E albergan subtipos que difieren entre un 15% y un 27% de su secuencia. Concretamente, los genotipos predominantes A (estirpes tipo VMV) y B (estirpes tipo CAEV) se subdividen en dieciocho (A1-A18) y cuatro (B1-B4) subtipos respectivamente distribuidos mundialmente; mientras que el genotipo E, lo hace en dos subtipos (E1-E2) cuya presencia se limita a Italia. No se han descrito hasta el momento subtipos dentro del genotipo C, descrito solo en Noruega (**Figura 4**).

Dentro del subtipo A1 se han caracterizado diferentes aislados. Uno de los más representativos es el aislado británico EV1 (Sargan et al., 1991), que se ha tomado como estirpe modelo en numerosos estudios. Esta estirpe fue aislada de un animal con afección pulmonar y artrítica, y es capaz de replicarse en un amplio rango de tipos celulares en cultivo. La primera estirpe causante de síntomas nerviosos en nuestro país, fue el virus del aislado español 697, perteneciente al subtipo A3, fue obtenido de médula espinal de un ovino con patología nerviosa severa, replica *in vivo* en macrófagos pero no en fibroblastos de piel ovina *in vitro* (Glaría et al., 2012).

El otro genotipo de distribución mundial, el B, agrupa los aislados clásicamente denominados tipo CAEV. Dentro del subtipo B1, el virus más representativo es el CAEV-Co, aislado en Estados Unidos en una cabra con leucoencefalomielitis, y del que se ha

obtenido un clon molecular (Cork et al., 1974; Saltarelli et al., 1990). La estirpe española Ov496 pertenece al subtipo B2, aislada de un ovino con cuadro artrítico presenta una tasa de replicación alta en cultivo y un intenso efecto citopático (Glaría et al., 2009). El subtipo B3 está configurado por las estirpes italianas Fonni y Volterra y por algunas secuencias presentes en Turquía (Bertolotti et al., 2011) así como en Mallorca (de Pablo-Maiso et al., 2017). Recientemente, estudios filogenéticos de la región *gag* en cabras de Ontario han originado la descripción del subtipo B4 (Santry et al., 2013).

El genotipo C está compuesto por estirpes de ovejas y cabras de Noruega. Se ha secuenciado el genoma completo del aislado 1GA, que fue obtenido a partir del carpo de una cabra con artritis (Gjerset et al., 2006).

Por último encontramos el genotipo E, que se divide en los subtipos E1 y E2. La estirpe Roccaverano, subtipo E1, fue obtenida mediante cultivo de glándula mamaria de una cabra que no presentaba síntomas clínicos típicos de infección por SRLV, por lo que se considera de baja patogenicidad (Reina et al., 2009b). La estirpe Seui, subtipo E2, fue aislada por co-cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de una cabra artrítica con células de plexo coroideo (Reina et al., 2010). Ambos carecen de la subunidad *dUTPasa* y el gen accesorio *vpr-like*.

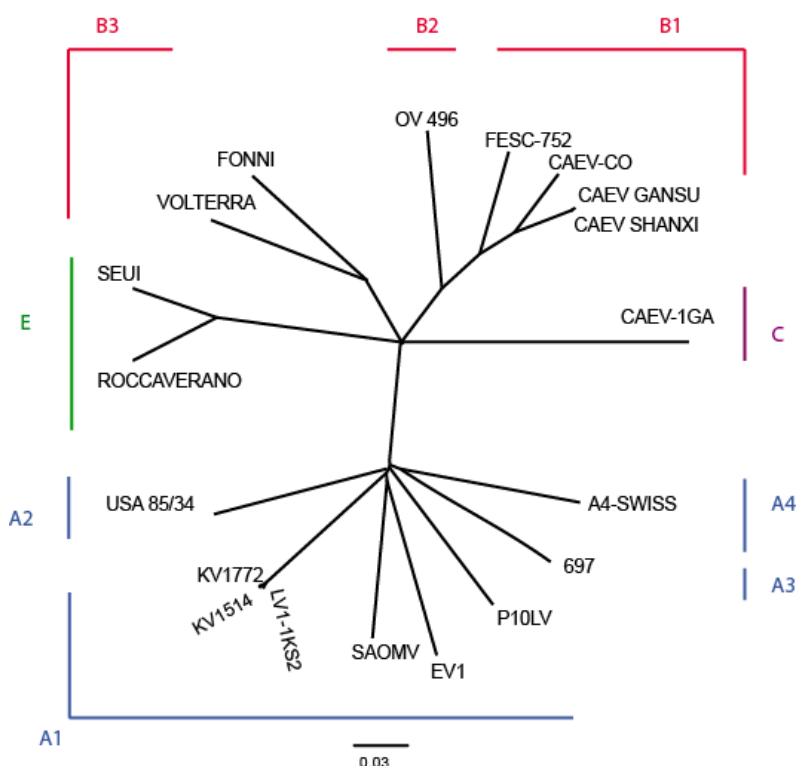


Figura 4. Variabilidad genética de SRLV. Secuencias completas de las estirpes de SRLV descritas en la literatura, pertenecientes a los diferentes genotipos y subgrupos.

2. Biología viral

2.1 Ciclo viral

El ciclo viral de los lentivirus está constituido por las siguientes fases (**Figura 5**):

a) Entrada en la célula hospedadora: el reconocimiento del receptor situado en la superficie de la célula permisiva por la glicoproteína de la envoltura del virus (SU o gp135) produce la fusión de la envoltura viral con la membrana celular, liberando en el interior la cápside vírica. Por el momento, no se ha identificado un receptor celular único para los SRLV, aunque parecen existir distintos receptores en función del tipo celular ya que se han descrito varios potenciales receptores y correceptores (Bruett et al., 2000; Crane et al., 1991; Crespo et al., 2011). Incluso, algunos autores proponen un uso diferencial del receptor celular según la estirpe de SRLV (Hotzel and Cheevers, 2002). Con el empleo de vectores virales pseudotipados con la proteína Env de algunos SRLVs se ha determinado que el receptor/es no se encuentra presente en células HEK293-T, CHO o en células humanas (Lyll et al., 2000).

b) Retrotranscripción e integración: la cápside libera en el citoplasma el genoma viral y varias enzimas, incluyendo, la RT, IN y PR, que durante su viaje al núcleo forma el complejo de pre-integración, en el que se completará la retrotranscripción o síntesis de la doble cadena de DNA a partir del RNA viral. La retrotranscripción comienza en la región U5, donde se encuentra el sitio de unión del cebador (PBS, *primer binding site*) de tRNA^{Lys-3}, marcando el inicio de la síntesis de la cadena complementaria de DNA de sentido negativo (cDNA-). El RNA del híbrido RNA-DNA es degradado por la actividad RNAasa H de la RT y finalmente sintetiza la cadena de sentido positivo (cDNA+) desde los denominados trectos de polipurinas situados al final del gen *pol* (cPPT) e inmediatamente aguas arriba de la 3'-LTR (3'PPT), que no son degradados por la RNAasa H. Esta doble cadena de DNA es transportada al núcleo, donde se integra en el genoma celular gracias a la IN, formando el provirus.

En este punto del ciclo viral es donde ejercen su acción factores de restricción de la inmunidad innata como SAMHD1, TRIM5 α o APOBEC3, que se abordarán en detalle más adelante.

c) Transcripción: el provirus integrado en el DNA del hospedador puede permanecer en estado latente durante un período indeterminado. Diferentes factores ambientales, el estrés de la lactancia, diferentes hormonas o la maduración de monocitos a

macrófagos, pueden activar la fase productiva de la infección, ya que desencadenan señales para que la RNA polimerasa II celular reconozca y se una a la caja TATA de la región LTR y comience la transcripción (Mselli-Lakhal et al., 1999). Se ha descrito además, la presencia de sitios de unión a factores de transcripción celulares relacionados con la respuesta inmune innata del hospedador. Los sitios GAS y TAS estarían alterando la transcripción del genoma viral en presencia de IFN- γ y TNF- α respectivamente, presumiblemente aumentando la replicación viral en zonas en las que se den procesos de inflamación (Murphy et al., 2012; Murphy et al., 2007).

Exceptuando los genes *vif*, *vpr-like* y *rev*, que se transcriben como RNAm completamente procesados, los genes estructurales se traducen como precursores proteicos, el mismo RNA que codifica la proteína Gag, por *frame-shift* codifica la proteína Pol.

d) Ensamblaje, maduración y liberación: el precursor proteico de Env pasa por el retículo endoplasmático rugoso y por el aparato de Golgi, donde se glicosila, para transportarse a la cara interna de la membrana plasmática donde comienza el ensamblaje. Una proteasa celular digiere dicho precursor, dando como resultado las proteínas maduras SU y TM. La maduración del precursor de las proteínas Gag y Pol, sin embargo, se produce gracias a una modificación post-transcripcional llevada a cabo por la proteasa viral. Las proteínas Gag y las codificadas por *pol* se ensamblan rodeando el genoma del virus y se asocian a las glicoproteínas virales ancladas en la membrana plasmática. La nueva partícula viral formada se libera al medio por gemación (Pepin et al., 1998). En este punto del ciclo viral puede ejercer su acción otros factores de restricción como la teterina.

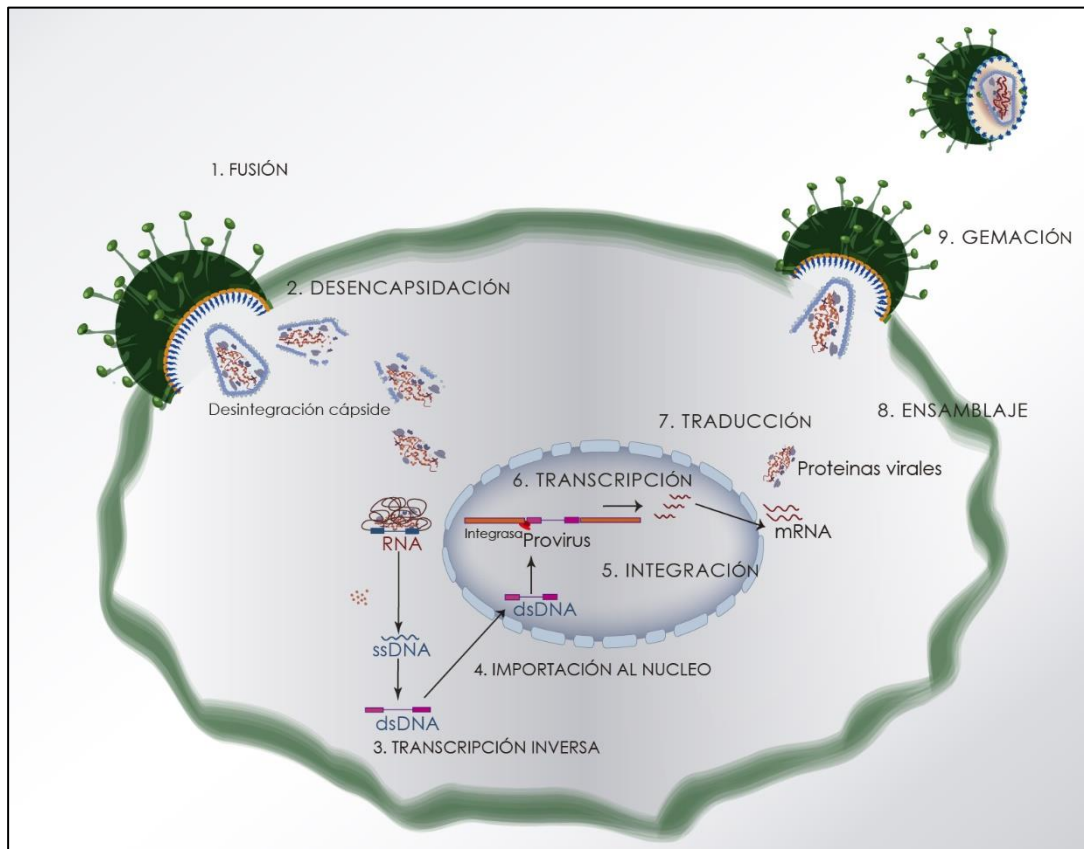


Figura 5. Ciclo viral de los lentivirus de pequeños rumiantes. El ciclo viral de los lentivirus comienza con la **fusión** de la envoltura del virus con la membrana de la célula, entrada del virus en la célula hospedadora, **desencapsidación** y liberación del material genético en el citoplasma celular. Tras la liberación de material genético, tiene lugar la **retrotranscripción** y formación del complejo de preintegración que se **transporta al núcleo** donde tiene lugar la **integración** del DNA viral en el genoma celular. La maquinaria de **transcripción y traducción** celular sintetiza las proteínas virales que se **ensamblan** formando los nuevos viriones que se liberan por **gemación**.

2.2 Mecanismos determinantes de la resistencia o susceptibilidad

Las interacciones entre el virus y el hospedador pueden darse a distintos niveles:

- Al nivel de especie: los SRLV infectan ganado ovino y caprino además de algunas especies de rumiantes silvestres. Es importante la susceptibilidad de la raza y del individuo ya que diferentes razas agrestes se han considerado resistentes y no todos los animales infectados de un mismo rebaño muestran signos de la enfermedad (Leginagoikoa et al., 2006), ni la misma carga viral (Crespo et al., 2016).
- Al nivel de tejido: dependiendo de los órganos que el virus sea capaz de invadir se manifestarán las distintas formas de la enfermedad (mastitis, artritis, neumonía y/o encefalitis). A su vez, la respuesta inmune también se diferencia en determinados tejidos como las mucosas o el bazo, contribuyendo en ocasiones a la resistencia y en otras a la susceptibilidad.
- Al nivel celular: la restricción de la infección puede producirse en todas las fases del ciclo viral (entrada, integración, transcripción y/o ensamblaje) gracias a la presencia de polimorfismos en el/los receptor/es y a la acción de los factores de restricción de la inmunidad innata.

2.2.1 Mecanismos de resistencia por especie

En un principio las estirpes tipo CAEV y tipo VMV se consideraron específicas de cabras y ovejas, respectivamente. El análisis de las secuencias de los virus circulantes ha demostrado que la transmisión cruzada entre ovejas y cabras se da de forma natural (Leroux et al., 1997a; Pisoni et al., 2005; Shah et al., 2004b). Así, aunque algunos genotipos se asignaron a una única especie, el aumento de datos revela que el espectro de las especies hospedadoras podría ser mayor en la naturaleza (Minardi da Cruz et al., 2013).

Los lentivirus muestran una fuerte restricción por especie supuestamente por la presencia de factores de restricción específicos de especie que bloquean la transgresión de la barrera interespecífica. Aun así, existen casos de diferentes lentivirus que, o bien se han adaptado a nuevas especies, o bien infectaban ya a ancestros comunes entre especies. Por ejemplo, EIAV es capaz de infectar caballos pero también burros, aunque causando una enfermedad más leve (Cook et al., 2001). FIV es capaz de infectar diferentes especies de felinos y la transmisión entre gato montés y pumas se ha descrito más de una vez (Lee et al., 2017). El ejemplo de adaptación más estudiado es el salto de

especie que dio lugar a la adaptación de estirpes de SIV al ser humano. Dos cepas de SIV, SIVcpz de chimpancé central (*Pan troglodytes troglodytes*) y SIVsmm de mangabey (*Cercocebus*) representan el reservorio de infección cruzada dando lugar a HIV-1 y HIV-2 (Hirsch et al., 1989; Huet et al., 1990). Aunque la pandemia de HIV-1 comenzó a principios de la década de 1980, el contagio de SIVcpz desde los chimpancés hacia los seres humanos comenzó mucho antes. El período más probable de transmisión cruzada de SIVcpz como el virus ancestral HIV-1 hacia los humanos es entre 1853 y 1908. De acuerdo con estas estimaciones, la primera transmisión del HIV-1 en humanos se produce alrededor de 1920 en Kinshasa (Sharp et al., 2000). La propagación del virus desde Kinshasa pudo darse a lo largo de las rutas migración y comercio. Se desconocen las circunstancias que favorecieron la transmisión cruzada entre especies, pero tiene implicaciones para el estudio sobre futuras posibles transmisiones.

La transgresión de la barrera de especie sugiere la superación de los sistemas de restricción del hospedador. Desde la entrada del virus en las células del hospedador, tras el reconocimiento del receptor celular por la proteína Env viral, la formación del PIC, el proceso de retrotranscripción, la integración en el genoma del hospedador hasta la producción de nuevas proteínas virales y la gemación de la progenie viral, existen interacciones al nivel molecular entre las proteínas virales y del hospedador que regulan dichos procesos. Se ha descrito que los SRLV utilizan distintos receptores en células ovinas y caprinas (Hotzel and Cheevers, 2002) y que el no reconocimiento del receptor es la única barrera que impide la infección de células humanas (Mselli-Lakhal et al., 2000). Sin embargo, virus pseudotipados con la proteína Env de SRLV son capaces de entrar en células de pollo, hámster, humano, simio y codorniz, indicando que el receptor celular para los SRLV está ampliamente distribuido en distintas especies (Lyll et al., 2000). Así, la entrada del virus en la célula no tiene por qué estar asociada a una infección productiva ya que la infección puede también restringirse en pasos posteriores a la entrada, principalmente por los mecanismos antivirales de la respuesta inmune innata o a una susceptibilidad natural por parte del hospedador, mediante APOBEC3, SAMHD1, TRIM5 α o teterina, que mutan el genoma viral, interactúan con la cápside vírica induciendo su degradación o atrapan los nuevos virus evitando la salida de la célula, respectivamente, pueden restringir la infección con especificidad de especie (Bieniasz, 2012; Jauregui et al., 2012).

Por otro lado, el virus ha desarrollado mecanismos para contrarrestar la acción de las proteínas de su hospedador, como la proteína viral Vif que es capaz de neutralizar APOBEC3 (Larue et al., 2010). En el caso de virus de primates el número de proteínas

accesorias es mayor y se ha descrito por ejemplo la actividad de Vpu o Nef (en el caso de SIV) que contrarrestan la acción de la teterina o la proteína viral Vpx que evita la acción de SAMHD1 (Hrecka et al., 2011). El estudio y la caracterización de las interacciones implicadas en esta carrera armamentística podría dar lugar al desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento y control de las infecciones lentivirales.

El bloqueo de la transcripción y/o la síntesis de proteínas virales puede también conducir a una replicación restringida. Morin y colaboradores concluyen que el bloqueo de la infección por SRLV en bovinos no se debe a la ausencia de receptores virales ni a la producción de anticuerpos neutralizantes. Tras la infección experimental con SRLV, las terneras producen anticuerpos específicos y la infección se establece. Se aislaron virus replicativos tanto a partir de células de sangre como de tejidos sólo durante los primeros 4 meses de infección, tras los que no se detectaron genomas virales (Morin et al., 2003). *In vitro*, las células aisladas de las terneras infectadas no mostraron restricción a la infección, sugiriendo la eliminación de la infección por mecanismos inmunes no relacionados con la producción de anticuerpos, tras la inoculación experimental en bovinos.

Los SRLV también podrían estar presentes en rumiantes silvestres (Minardi da Cruz et al., 2013). De hecho la infección experimental de híbridos muflón y oveja es eficiente (Guiguen et al., 2000). Además, se ha detectado reacción serológica en ciervos y gamos de nuestro país, sin embargo no se han podido identificar las estirpes circulantes. Algunas estirpes de SRLV se adaptan rápidamente *in vitro* a las células procedentes de ciervo y gamo que, no obstante, muestran resistencia intrínseca a la infección por SRLV basada en la expresión de APOBEC3 y/o teterina (Sanjose et al., 2016).

2.2.2 Resistencia por tejido

La existencia de distintos cuadros clínicos de la enfermedad y el hecho de que todos ellos no se manifiesten siempre, sugieren que existe un tropismo específico de órgano por parte del virus, o bien la presencia de respuestas inmunes capaces de controlar la infección en determinados órganos diana.

Aunque no existe un consenso sobre la región genética responsable del tropismo tisular, LTR y *env* han sido las más estudiadas. La región promotora LTR posee los sitios de unión a factores de transcripción (TBS, *transcription binding site*), es esencial para la replicación viral y podría controlar la especificidad celular (Barros et al., 2005;

Oskarsson et al., 2007). Algunos de estos sitios como parecen necesarios para la biología del virus, ya que permanecen altamente conservados entre los aislados de campo y se mantienen tras pases sucesivos en células en cultivo (Gomez-Lucia et al., 2013). La repetición de 53 bp presente en la región U3 de ciertas estirpes nerviosas incrementa el tropismo hacia células de plexo coroideo (Agnarsdottir et al., 2000); mientras que estirpes aisladas de ovinos con cuadros pulmonares no la presentan (Andresdottir et al., 1998), lo que sugiere que la duplicación de los sitios de unión a factores de transcripción es determinante del tropismo tisular y la patología desarrollada. Además, la deleción de 13-14 bp en la región R se ha relacionado con una menor patogenicidad del virus en pulmón (Angelopoulou et al., 2008). Sin embargo, no siempre existe una correlación entre las diferencias de secuencia en LTR y el tropismo tisular de las estirpes (Murphy et al., 2010), lo que hace pensar que otras zonas del genoma viral están implicadas en el tropismo. La secuencia LTR aislada de los distintos órganos de un ovino con enfermedad inflamatoria multisistémica asociada a lentivirus fue única, no hallando diferencias que se pudiesen relacionar con el tropismo tisular (Adedeji et al., 2013). Esta interacción huésped-patógeno también tiene su reflejo en la respuesta inmune innata ya que se han descrito sitios de unión a IFN- γ y TNF- α , dos citoquinas proinflamatorias que podrían aumentar la replicación viral en los sitios de inflamación (Murphy et al., 2012; Murphy et al., 2006).

La actividad transcripcional de la región LTR podría estar afectada por la acción de diferentes hormonas que se producen durante la gestación, parto y lactancia en los ovinos. Mediante la unión a los TBS específicos, algunas hormonas esteroideas pueden provocar una variación en la producción y la excreción del virus que se observa a lo largo del ciclo reproductivo de las ovejas. Una alta concentración de esteroides inhibe la expresión dirigida por LTR, aunque concentraciones fisiológicas podrían incluso revertir este efecto hacia una expresión aumentada del VMV (Gomez-Lucia et al., 2014).

Un punto obvio de interacción entre el hospedador y el patógeno tiene lugar en el reconocimiento del receptor celular por parte de la proteína viral Env. Se ha descrito que una estirpe obtenida de cerebro de un ovino con sintomatología nerviosa, difiere en un 11,7% en la secuencia de la proteína Env respecto a la del aislado de pulmón de una oveja de la misma raza con síntomas pulmonares (Andresdottir et al., 1998). Las distintas *quasi*-especies podrían invadir distintos órganos y, debido a la presión ejercida por el sistema inmune, quedar aisladas evolucionando en cada uno de ellos de manera diferenciada, lo que se denomina compartimentalización, como se ha demostrado en HIV y FIV (Blackard, 2012; Liu et al., 2006). El análisis de la región

variable V4 de Env en ovinos y caprinos infectados, ha demostrado compartimentalización en PBMCs y calostro (Pisoni et al., 2007). En otro estudio, donde se analizan las secuencias de la región TM y V4-V5 en un ovino con visna, también se evidencia una clara compartimentalización en el sistema nervioso central y otros órganos, como pulmón y glándula mamaria. Además, las secuencias más próximas al ancestro común son las obtenidas a partir de células de lavado broncoalveolar, lo que indicaría una entrada del virus en el organismo por vía aerógena y una posterior distribución a los órganos afectados (Ramirez et al., 2012).

2.2.3 Resistencia celular

Las células diana por excelencia de los SRLV *in vivo* son la línea monocito/macrófago y las células dendríticas (Narayan et al., 1982; Ryan et al., 2000). El virus es capaz de entrar e integrarse en el genoma de los monocitos, pero no se observa replicación productiva hasta que éstos maduran a macrófagos (Gendelman et al., 1986). Durante la diferenciación aumenta la expresión de factores de transcripción como c-Fos y c-Jun que, tras unirse a sitios concretos de la región promotora LTR del virus, activan la replicación dando lugar a una infección productiva (Narayan et al., 1983). Por otro lado, se ha descrito que la restricción observada en monocitos podría deberse a la alta expresión de la proteína celular APOBEC3, que es baja en macrófagos (Peng et al., 2007). Esta observación también se da en el caso de los SRLV y ovinos (Glaría, 2015). Así, los monocitos circulantes en sangre actuarían de “caballo de Troya” diseminando el virus que se multiplicaría en los tejidos diana tras la maduración a macrófagos (Peluso et al., 1985).

La infección produce cambios importantes en la secreción de citoquinas por parte de las células diana. Los macrófagos infectados con SRLV *in vivo* e *in vitro*, exhiben un perfil antiinflamatorio M2, sugiriendo adaptación viral a este subconjunto de células en particular, o la inducción de estados de diferenciación específicos tras la infección (Crespo et al., 2013). En cambio la replicación en macrófagos proinflamatorios M1 es prácticamente nula en todos los genotipos de SRLV (Crespo et al., 2013). Las células dendríticas (DC) infectadas con SRLV *in vivo* e *in vitro*, son importantes para la transferencia de la infección desde el sitio de inoculación al tejido linfóide (Ryan et al., 2000). Por otro lado, estudios en animales infectados con SRLV muestran una mayor proporción de linfocitos $\gamma\delta$ en comparación con animales sanos, lo que sugiere que podrían tener una función importante en el desarrollo de la infección (Jolly et al., 1997).

Las células asesinas o *Natural Killer* (NK) no se han estudiado con profundidad en el contexto de la infección con SRLV. No está claro cómo las células NK se dirigen a macrófagos infectados con SRLV, sin embargo parecen incluir mecanismos de actividad citotóxica como un posible elemento de control en ovejas infectadas con SRLV (Singh et al., 2006).

Una característica de la infección por SRLV es la aparición de síntomas en un porcentaje de los individuos del rebaño, normalmente cercano al 30%, sugiriendo la presencia de mecanismos de resistencia *in vivo* que dificultan e incluso podrían eliminar la infección como en el caso de bovinos y rumiantes silvestres. Se ha descrito un tipo de restricción en fibroblastos, pero no en macrófagos ovinos infectados con estirpes de CAEV. Dicha restricción consiste en el procesamiento erróneo de la proteína Env (Chebloune et al., 1996). Incluso dentro de una misma población caprina, infectada por una sola estirpe, se han detectado animales con alta y baja carga viral, lo que confirma la importancia de la respuesta del hospedador en el proceso infeccioso, identificando factores de restricción con un posible papel en dicha resistencia (Crespo et al., 2016).

Los SRLV son capaces de infectar muchos otros tipos celulares, tales como células de explantes pulmonares (Sigurdardottir and Thormar, 1964), del aparato reproductor masculino (Dahlberg et al., 1981; Peterson et al., 2008), de la microglia (Adebayo et al., 2010), de la córnea (Kirkland and Batty, 1987), de bazo (Belov and Whalley, 1988), células de la granulosa del ovario (Lamara et al., 2001), epiteliales del oviducto (Lamara et al., 2002), endotelio caprino (Lechat et al., 2005; Milhau et al., 2003), células del tercer párpado (Capucchio et al., 2003), médula espinal (Grossi et al., 2005), epitelio tubular del riñón (Angelopoulou et al., 2006), hepatocitos y miocitos (Brellou et al., 2007). Además, se han establecido líneas celulares inmortalizadas permisivas a la infección, como TIGEF (Da Silva Teixeira et al., 1997), TIGMEC (Mselli-Lakhal et al., 2001) o MOCL (Olivier et al., 2001). Los macrófagos pueden emplearse para el aislamiento de SRLV porque prácticamente todas las estirpes producen altos títulos en ellas (Singh et al., 1999), siendo la replicación restringida en otros tipos celulares, como fibroblastos, dependiendo del origen de dichas células así como el del genotipo viral (Morin et al., 2003). Sin embargo, la obtención y mantenimiento de macrófagos en cultivo puede ser problemática y su replicación está muy limitada, ya que la formación de sincitios no es un signo específico de la infección por SRLV en estas células. Por el contrario, las células procedentes de cultivos primarios de plexo coroideo (SCP) (Narayan et al., 1982), fibroblastos de piel ovina (Querat et al., 1984) y de membrana sinovial de cabra (GSM) (Crawford et al., 1980), son de fácil manejo, permisivas al virus

y en ellas se observa claramente el efecto citopático, por lo que son las más utilizadas *in vitro*. Sin embargo, no todas las estirpes producen altos títulos virales en estas células.

Mientras que las estirpes patógenas se adaptan normalmente bien a estos métodos de cultivo *in vitro* en células de tipo fibroblasto, nuevas estirpes/genotipos que no muestren claramente el efecto citopático, podrían necesitar otros enfoques para el aislamiento y la caracterización genética (Colitti et al., 2019).

3. Respuesta inmunitaria

La función esencial del sistema inmunitario es proteger al organismo de agentes infecciosos y microorganismos presentes en el ambiente, preservando la homeostasis. Para ser eficaz, el sistema inmunitario debe detectar una gran variedad de patógenos, y distinguirlos de las células y tejidos del propio organismo. Los rumiantes, igual que los demás mamíferos, poseen líneas de defensa frente a los agentes externos. El sistema inmunitario innato constituye la primera línea de defensa que limita la infección tras la exposición a microorganismos, a través de una respuesta inmediata e inespecífica, sin conferir inmunidad duradera (Hoffmann et al., 1999). Este sistema de defensa incluye componentes celulares (células epiteliales, células dendríticas, macrófagos, linfocitos, neutrófilos y células NK), moléculas del sistema del complemento y citoquinas. El reconocimiento de características comunes de los patógenos por parte del sistema inmune innato se realiza a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR, *pattern recognition receptors*), que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*) y señales endógenas asociadas al daño tisular (DAMPs, *danger associated molecular patterns*). Entre los principales PAMPs que actúan como dianas para la activación del sistema inmune innato se encuentran el lipopolisacárido, el ácido teicoico, las secuencias de DNA CpG metiladas, glicosilaciones como la manosilación y el RNA bicatenario característico de virus. El sistema inmune innato se activa en respuesta a estas señales detectadas por los PRRs a través de la expresión de una gran variedad de genes antivirales y de citoquinas proinflamatorias (Akira et al., 2006). A través de macrófagos y sobre todo DCs, el sistema innato es capaz de detectar la presencia de agentes invasores a la respuesta inmunitaria adaptativa y, en gran medida, determinar el tipo de respuesta. Ésta, compuesta por células (linfocitos T y B) y anticuerpos, optimizan la respuesta específica frente al patógeno, además de conferir memoria frente a exposiciones posteriores (Medzhitov, 2007).

3.1 Respuesta innata

Tras el reconocimiento inicial de los PAMPs por parte de los PRRs, se activan diferentes cascadas de señalización que llevan finalmente a la expresión de interferón de tipo I a través de factores de transcripción como el NF- κ B (Murphy et al., 2000). El interferón de tipo I (IFN- α y β) es la citoquina principal implicada en la respuesta inmune innata (Borden et al., 2007). La secreción de esta citoquina a su vez, induce la activación de una cascada de señalización que permite la expresión de cientos de proteínas (Akira et al., 2006). Estas proteínas tienen una clara actividad antiviral así como una función en la llamada e incorporación de células del sistema inmune a la zona infectada.

3.1.1 Receptores del sistema innato

Las estructuras presentes en los microorganismos que se detectan por los PRR son de muy diferente naturaleza e incluyen polisacáridos complejos, glicolípidos, lipoproteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos. Los PRR se caracterizan por tener una estructura y especificidad concretas, una expresión específica de tejido así como una localización intracelular determinada, incluyendo la membrana plasmática, endosomas, lisosomas y citoplasma (Barton and Kagan, 2009). Existen dos mecanismos que detectan la mayoría de los PAMPs, mediante mecanismos extrínsecos de la célula a través de los *Toll-like Receptor*, (TLRs) y mediante mecanismos intrínsecos, a través de otros receptores (*Retinoic acid-inducible gene 1-like receptors* RLRs, *NOD-like Receptors* NLRs y sensores de DNA citosólicos). Es probable que estos mecanismos se hayan originado a lo largo de la evolución para proporcionar señales diferentes al sistema inmune.

Tabla 1. Resumen de los diferentes PRR según su localización.

| | PRR | Patrón | Ligando | Fuente | Localización | Estructura | Señalización | | |
|------------------|--|--|---|--|---|--------------------|--|---|-------------|
| PRRs de membrana | TLR (<i>Toll-like Receptors</i>) | TLR 1, 2, 4-6, 10 | PAMPs and DAMPs | Lipoproteínas triacil y diacil, lipopéptidos, peptidoglicano, ácido lipoteicoico, LPS, flagelina, RNA monocatenario, DNA CpG viral y bacteriano y DNA doble cadena | Bacterias, virus, parásitos y hongos | Superficie celular | Dominio LRR (Leucine-rich repeats) y TIRc | Todos los TLR, excepto TLR3, usan la ruta dependiente de MyD88. TLR3 ruta dependiente de TRIF | |
| | | Endosoma | | | | | | | |
| PRRs de membrana | CLR (<i>C-type Lectin Receptors</i>) | Tipo 1 (DEC205, <i>Manose Receptor</i>) | PAMPs and DAMPs | Beta-glucanos, carbohidratos de tipo alto en manosa, fructosa, micobacterias, ciertos hongos y células necróticas DAMP | Hongos, bacterias y virus | Superficie celular | Varios dominios CRD | | |
| | | Tipo 2 (<i>Dectin 1 or 2, DC-SIGN, Mincle, DNGR-1</i>) | | | | | Beta-glucanos, manosa y fructosa | | Dominio CRD |
| | | Soluble | | | | | Manosa y residuos de N-acetylglucosamina. | | |
| PRRs citosólicos | RLR (<i>Retinoic acid-inducible gene-1-like receptors</i>) | RIG-I | RNA | RNA doble cadena (hasta 1Kb, con extremo 5' monofosfatado), RNA monocatenario positivo y negativo | Virus RNA | Citoplasma | Dominio DExD/H box RNA helicase y dos residuos caspasa recruiting domain (CARD)-like domains. | MDA-5 y RIG-I son reclutados por el adaptador MAVS de las mitocondrias que conduce a la activación de varios factores de transcripción, incluidos IRF3-7 y NF-κB. | |
| | | MDA-5 | RNA | RNA doble cadena largos | | | Dominio DExD/H box RNA helicase | Actúa como un regulador negativo de RIG-I y MDA-5. | |
| | | LGP2 | DNA | RNA doble cadena | | | | | |
| | NLR (<i>NOD-like Receptors</i>) | NODs, NLRPs IPAF | PAMPs, DAMPs y DNA. Señales de estrés y daño celular. | Las NLRP y las subfamilias de IPAF están involucradas en la formación del inflamasoma (pueden activarse por PAMPs, DAMP) | Bacterias, virus, parásitos y levaduras | Citoplasma | NACHT central (NOD dominio de unión a nucleótidos), C-terminal (LRR dominio de rico en leucina que detecta la presencia de ligando) N-terminal responsable de la interacción proteína-proteína | Señalización o inflamasoma NLR | |

Un amplio rango de PRRs median la detección de PAMPs y DAMPs, encargados de detectar la presencia de patógenos en la membrana plasmática, entre los que se encuentran los TLRs y los *C-type lectin receptors* (CLRs), y en el citoplasma, como los RLRs y NLR.

3.1.1.1 Receptores de membrana

La primera barrera que se encuentra un patógeno intracelular en busca de un ambiente propicio, es decir, en el interior de la célula, es la membrana plasmática y las proteínas asociadas. Los PRRs que componen este grupo incluyen TLRs y CLRs, que son capaces de reconocer diferentes estructuras proteicas y de naturaleza glucídica, como la manosilación, común en lentivirus y poco comunes en proteínas de mamíferos.

- TLRs

La familia de los receptores Toll-like constituye uno de los grupos más importantes dentro de los PRRs. Se describieron por primera vez en *Drosophila melanogaster*, donde se vio que participaban en la respuesta inmune frente a hongos induciendo la síntesis de péptidos antimicrobianos (Gay and Keith, 1991). Hasta la fecha, la familia de los TLR comprende 23 miembros en total, de los cuales, 11 han sido identificados en humanos, ratón, cerdo, vaca y oveja (Akira et al., 2006; Clop et al., 2016; Chang et al., 2009; Mathur et al., 2012; McGuire et al., 2006).

Los TLRs se encuentran en células inmunes, principalmente APCs (*antigen presenting cells*), células dendríticas, monocitos, macrófagos y células del endotelio vascular y del epitelio intestinal.

Tabla 2. Resumen de los receptores TLR.

| Receptor | Ligandos | Origen del ligando | Adaptador | Ubicación | Tipo celular |
|---------------|--|--|---------------------|--------------------|---|
| TLR 1 | Triacil-lipopéptidos | Bacteria | MyD88 | Superficie celular | Monocitos/macrófagos Células dendríticas Linfocitos B |
| TLR 2 | Glicolípidos, lipopeptidos y lipoproteínas. | Bacteria | MyD88 | Superficie celular | Monocitos/macrófagos |
| | Zymosan (Beta-glucan) | Hongos | | | Células dendríticas mieloides Células Mastoides |
| TLR 3 | RNA de doble cadena, poly I:C | Virus | TRIF | Endosoma | Células dendríticas Linfocitos B |
| TLR 4 | Lipopolisacárido Proteínas de fase aguda Fibrinógeno Heparán sulfato | Bacterias Gram-negativas Bacterias y células del huésped Células del huésped | MyD88/MAL/TRIF/TRAM | Superficie celular | Monocitos/macrófagos Células dendríticas Células Mastoides Epitelio intestinal |
| TLR 5 | Flagelina | Bacterias | MyD88 | Superficie celular | Monocitos/macrófagos Células dendríticas Epitelio intestinal |
| TLR 6 | Diacil-Lipopéptidos | Mycoplasma | MyD88 | Superficie celular | Monocitos/macrófagos Células Mastoides Linfocitos B |
| TLR 7 | Imidazoquinolina, Loxoribina (un análogo de guanósina) RNA de cadena simple | Compuestos sintéticos de pequeño tamaño y virus RNA | MyD88 | Endosoma | Monocitos/macrófagos Células dendríticas Linfocitos B |
| TLR 8 | RNA de cadena simple | | MyD88 | Endosoma | Monocitos/macrófagos Células dendríticas Células mieloides |
| TLR 9 | Oligonucleótido DNA CpG no metilado | Bacterias | MyD88 | Endosoma | Monocitos/macrófagos Células dendríticas Linfocitos B |
| TLR 10 | Hongos | desconocido | MyD88 | Superficie celular | Monocitos/macrófagos Linfocitos B |

TLR1, 2, 4, 5 y 6 son principalmente proteínas ancladas a la membrana plasmática, mientras que TLR3, TLR7/8 y TLR9 están localizados en vesículas intracelulares (Takeda and Akira, 2005). Recientemente, se ha descubierto TLR11, el cual reconoce flagelina (FliC) de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, a través de mecanismos altamente divergentes (Hatai et al., 2016).

La unión del ligando al TLR provoca un cambio conformacional que origina una cascada de señalización intracelular múltiple que finaliza con la producción de mediadores de la inflamación, promoviendo la diferenciación, la proliferación o la apoptosis de la célula.

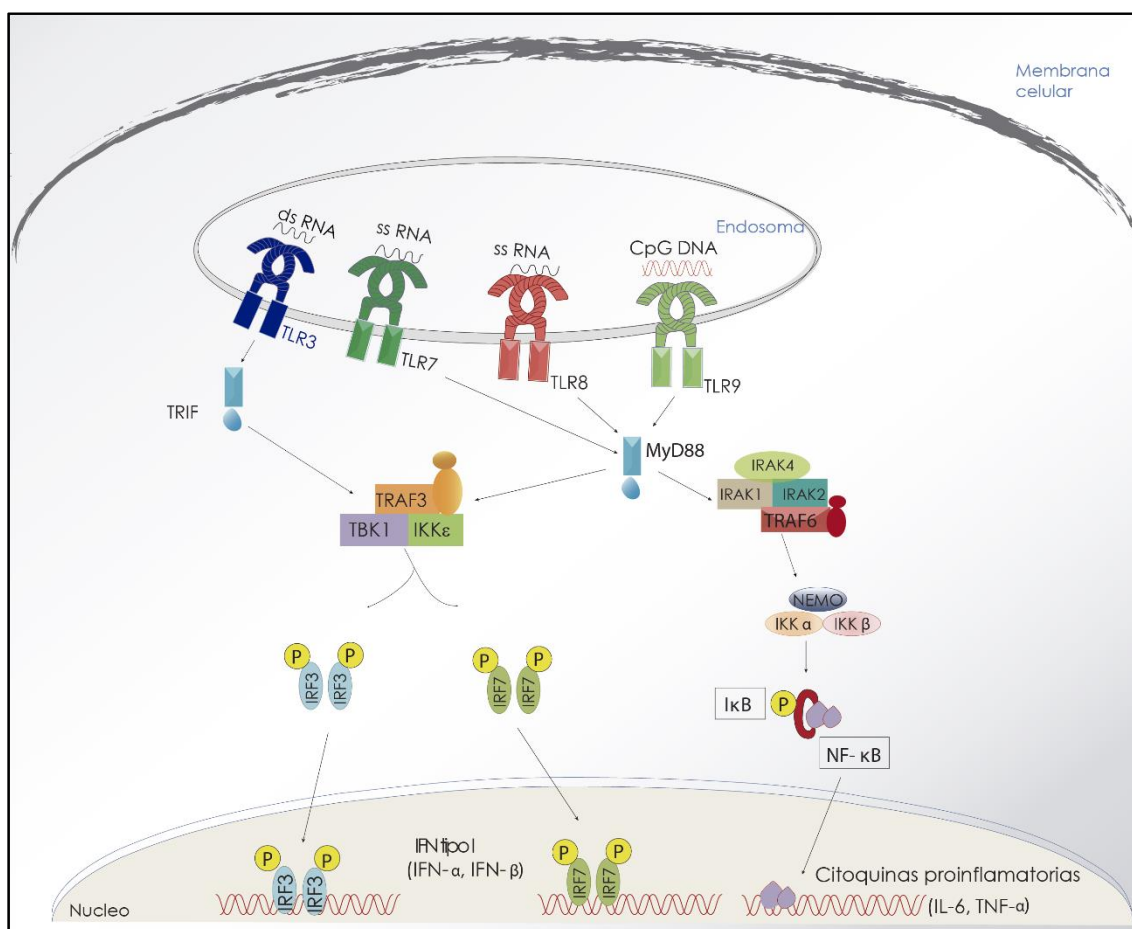


Figura 6. Visión general de los TLRs citoplasmáticos asociados a membrana y su ruta de señalización. La unión con los ligandos de los TLRs inicia una cascada de señalización que culmina en la traslocación de factores de transcripción NF- κ B e IRF3 y 7 al núcleo, generando una respuesta inflamatoria. Se muestran las características generales de la vía de señalización dependiente o independiente de MyD88.

La vía de activación asociada a la activación de los diferentes TLRs puede ser independiente o dependiente de MyD88 (factor de diferenciación mielóide primaria 88)

(Figura 6). Tras la estimulación, MyD88 es la primera molécula en ser reclutada al dominio TIR. Una vez que MyD88 se ha unido al dominio TIR (receptor Toll/IL1) de TLR, se recluta y activa a la quinasa asociada a IL-1R (IRAK) (Takeda and Akira, 2004). IRAK-1 se activa mediante fosforilación y se asocia con TRAF6, la cual inicia una cascada de activación de kinasas por la que IKK α e IKK β (*Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha/beta*) se activan formando un dímero IKK que fosforila una proteína inhibitoria conocida como I κ B. En condiciones basales I κ B se une a NF- κ B en un complejo citosólico e inhibe su traslocación al núcleo. Tras la eliminación de I κ B, NF κ B entra en el núcleo y activa la transcripción de genes implicados en la respuesta inflamatoria. La activación de las vías independientes de MyD88 implica TRIF y TRAF3, lo que conduce al reclutamiento de IKK ϵ / TBK1, la fosforilación de IRF3 y la expresión de interferón- β (Kawai and Akira, 2007). Al contrario que el resto de TLRs, TLR3 utiliza una vía independiente, con TRIF (dominio TIR que contiene proteínas adaptadoras que inducen interferón β) como molécula adaptadora, el cual activa IRF3 y IRF7 a través de TRAF3 (Kawai and Akira, 2007).

- CLRs

Los receptores de lectinas tipo C reconocen hidratos de carbono presentes en proteínas de la superficie de agentes infecciosos. Además, también participan en la adhesión y la comunicación celular y su activación lleva a la secreción de citoquinas y quimioquinas. Detectan los ligandos e internalizan los microorganismos que los portan; después los degradan, procesan y los presentan, como péptidos antigénicos, a los linfocitos T. Estas lectinas tipo C unen muchas y variadas estructuras azucaradas que portan las células dendríticas, lo cual evidencia su reducida especificidad de ligando. Por este motivo, algunas de estas lectinas pueden ser consideradas como receptores “scavenger”. La función “scavenger” de algunas de estas lectinas puede contribuir al mantenimiento de la homeostasis tisular, ya que retiran proteínas extracelulares y hormonas del medio circundante. El más conocido de este grupo es el SR-A que une el lipopolisacárido (LPS) de bacterias y lipopoliproteínas de baja densidad (LDL) endógenas modificadas y por ello tiene un papel importante en la homeostasis y en la prevención de la arterioesclerosis. Por su gran capacidad de unión, pueden actuar como receptores auxiliares formando parte de complejos de receptores (Linehan et al., 2000).

El receptor de la manosa (MR, CD206) es una de las lectinas tipo C con mayor expresión en células dendríticas, participa en la endocitosis y la fagocitosis,

desempeñando un papel importante en la homeostasis inmunológica, al eliminar las manoglicoproteínas no deseadas. El MR reconoce estructuras azucaradas en un amplio rango de microorganismos (hongos, bacterias, parásitos y virus) que poseen en una pared celular recubierta con manano para proceder a su endocitosis. Virus como HIV o SRLV, o bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans*, entre otros, se unen al MR, son endocitados por macrófagos, pero aprovechan esta circunstancia para su propia supervivencia (Crespo et al., 2012; Shepherd et al., 1997; Vigerust et al., 2005).

A su vez, DC-SIGN (*dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*, CD209), reconoce estructuras complejas de manosa, fucosa, lipoarabinomanano y fosfoinositol, presentes en patógenos como *Streptococcus pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis* y también en la glicoproteína gp120 del HIV (Geijtenbeek and van Kooyk, 2003). DC-SIGN se encuentra dentro de los PRR que no señalizan pero, se expresa en células dendríticas y en algunas subpoblaciones de macrófagos como en los macrófagos alveolares. El reconocimiento entre DC-SIGN y su ligando da lugar a una inhibición en la liberación de IL-12 inducida por TLR y un incremento en la producción de IL-10 reduciendo así la activación de la respuesta inmunitaria (Caparros et al., 2006).

3.1.1.2 Receptores citoplasmáticos

En este grupo se incluyen RIG-I-like receptors (RLRs), NOD-like receptors (NLRs) y DNA Innate sensing receptors (DIRs).

- *RLRs*

Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I), *melanoma differentiation associated gene 5* (MDA5) y *laboratory of genetics and physiology* (LGP2) son receptores intracelulares de PAMPs (Yoneyama and Fujita, 2004). Estos receptores regulan las vías de señalización que promueven la expresión de genes dependientes de IRF3, IRF7 y NF- κ B. Los tres miembros tienen una estructura proteica similar, contienen un dominio helicasa central (DECH-box) con los dominios HEL1 y HEL2; la región C-terminal (CTD) que interactúa directamente con el RNA viral y lo procesa; y dos dominios en la región N-terminal, CARD (*caspase activating recruitment domains*) que están involucrados en la interacción con la proteína de señalización antiviral MAVS (*mitochondrial antiviral signalling*). LGP2 comparte una arquitectura similar, presenta secuencias conservadas dentro del dominio helicasa y el motivo C-terminal pero pierde la región CARD,

impidiéndole interactuar con MAVS. Por esta razón, se piensa que la LGP2 regula positiva o negativamente la señalización de RIG-I y MDA5 en lugar de funcionar como un receptor de señalización por sí solo. Los dominios C-terminales de RIG-I y LGP2 actúan como represores, asegurando que los receptores permanezcan en una conformación inactiva hasta que reconozcan el RNA viral.

RIG-I es esencial para la detección de la mayoría de virus RNA como el virus Sendai, el virus de la influenza, Rift Valley, Ebola, estomatitis vesicular (VSV) y hepatitis C (Loo and Gale, 2011).

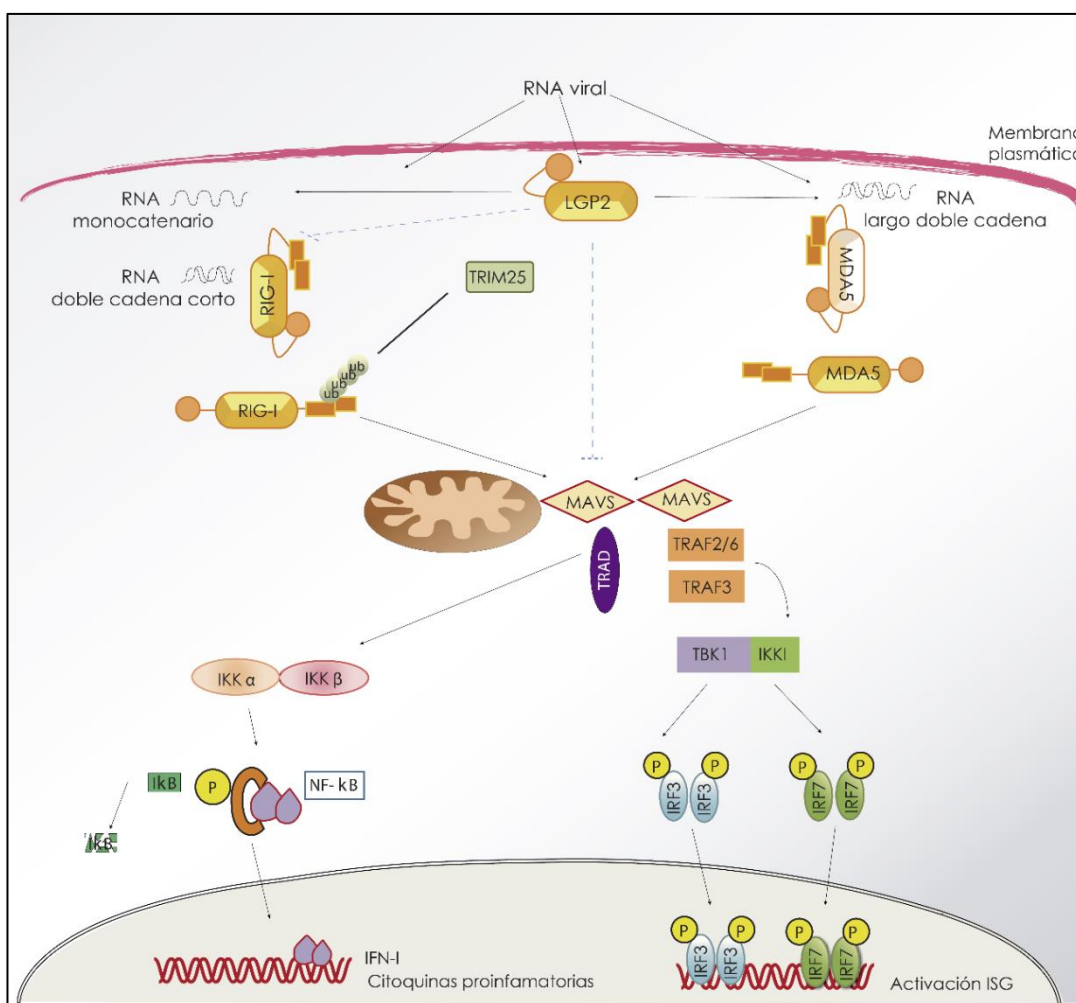


Figura 7. Detección virus RNA e inducción de vías de señalización antiviral por RLRs. Señalización mediada por RIG-I, MDA-5 y LGP2. La unión del RNA viral en el citoplasma induce la poliubiquitinación mediada por TRIM25, activando así a RIG-I. MDA-5 y RIG-I son reclutados por MAVS en la membrana externa de las mitocondrias, lo que lleva a la activación de varios factores de transcripción, incluidos IRF3 e IRF7 controlando la expresión de IFN tipo I; y NF-κB regulando la producción de citoquinas inflamatorias.

RIG-I se une preferentemente a moléculas de RNA monocatenario que contengan regiones doble hélice, así como RNA bicatenarios pequeños (de unas 300pb)

trifosforilados en 5', sin fosfato en 5' o con monofosfato en 5'. En contraste, MDA5 une moléculas de RNA de doble cadena más largas (de aproximadamente 1000pb).

En ausencia de RNA viral, RIG-I se encuentra en forma de monómero e inactivo. La unión de RNA por RIG-I es seguida por la unión a TRIM25 que incorpora cadenas de poliubiquitina a través del dominio CARD promoviendo su multimerización y estabilización. La dimerización de MAVS le permite asociarse con proteínas adaptadoras, incluidas TRAF-2-6, TRAF-3 y TRADD para desencadenar la activación de TBK1 e IKK ϵ . TBK1 e IKK ϵ fosforilan IRF3 e IRF7, trasladándose al núcleo para promover la expresión de IFN de tipo I y III. Al mismo tiempo, la proteína adaptadora TRADD (*TNFR1-associated death domain protein*), forma el complejo MAVS-TRADD que conduce a la activación de IKK α y IKK β fosforilando a IKB. Esta fosforilación promueve la degradación proteasomal de IKB, permitiendo que NF- κ B se traslade al núcleo e induzca la expresión de citoquinas proinflamatorias y genes diana (**Figura 7**).

- NLRs

Los receptores NLR (*Nod Like Receptors*) contienen un dominio central de unión a nucleótidos, NOD, un dominio N-terminal responsable de las interacciones proteicas y un dominio C-terminal, con la presencia de una serie de repeticiones ricas en leucina, LRR, que detecta la presencia de ligando. Las proteínas NLRs son sensores intracelulares de PAMPs y DAMPs asociados a estrés celular, que entran en la célula a través de la fagocitosis o la formación de poros (bacterias, hongos y otros patógenos). Se piensa que los NLR reconocen tanto los productos microbianos como otras señales de peligro intracelulares, iniciando así las vías de defensa del huésped mediante la activación de la respuesta NF- κ B y las caspasas inflamatorias (Wen et al., 2013).

3.1.2 Control de la inmunidad adaptativa por parte de la inmunidad innata

El reconocimiento de PAMPs por parte de los PRRs conduce a la activación de las defensas innatas del organismo y, cuando sucede en la superficie de células dendríticas, a la activación de la respuesta adaptativa. El papel fisiológico que juegan los diferentes PRRs en la detección de patógenos y en la inducción de la respuesta adaptativa es aún objeto de numerosos estudios, aunque la evidencia nos muestra claramente que la respuesta innata determina el destino de la respuesta adaptativa, ya que los PRRs determinan el tipo de infección invasora e instruyen a los linfocitos para la inducción de respuestas efectoras. Sin embargo, aún quedan incógnitas importantes por resolver

que ayudarán a entender mejor la regulación de la respuesta adaptativa por parte de la innata. Por ejemplo, la respuesta de tipo Th2 que se da en infecciones por gusanos parásitos o algunos alérgenos parece ser independiente del reconocimiento por parte de los PRR. Es posible que los organismos multicelulares no compartan estructuras conservadas entre los diferentes grupos de parásitos. Del mismo modo, los alérgenos que no son de origen microbiano, carecen de estructuras comunes y dan lugar a reacciones de tipo 2 a través de mecanismos totalmente desconocidos. Otra cuestión sin resolver es la aparente habilidad del sistema inmune para distinguir entre microorganismos comensales beneficiosos y aquéllos que pueden causar enfermedad. Ambos tipos de microbios expresan PAMPs y pueden ser detectados por los diferentes PRRs, sin embargo, el resultado de su reconocimiento debe ser y es totalmente diferente, quizás dependiendo de determinadas características del microorganismo, como puede ser su capacidad invasiva o la producción de toxinas. Así, la respuesta innata “maneja” de alguna manera las poblaciones de los microorganismos tanto comensales como patógenos, previniendo su crecimiento desmesurado o su malignidad (Belkaid and Naik, 2013; Brestoff and Artis, 2013; Chow et al., 2010).

3.1.3 Inmunidad innata en infecciones por SRLV

No se ha estudiado ampliamente el papel de los TLR en la infección por SRLV, sin embargo, parecen estar jugando un papel en el reconocimiento, ya que durante la infección se activan TLR7 y 8 induciendo IFN- α , IL-6, TNF- α y posteriormente la expresión de proteínas antivirales (Blacklaws, 2012). De hecho, su expresión se mantiene significativamente elevada en animales con lesiones pulmonares inducidas por SRLV (Larruskain et al., 2013). Mikula et al. (Mikula et al., 2010) han relacionado determinadas frecuencias de mutación en los genes TLR7 y TLR8 con la infección por SRLV. En cuanto a TLR9 no encontraron relación entre la infección por SRLV, siendo este muy polimórfico, incluso al nivel de raza (Mikula and Mikula, 2011). A pesar de esto, posteriormente, se ha descrito la mutación G520R en TLR9 asociada con la seropositividad a SRLV, y podría usarse en estudios que investigan la susceptibilidad o resistencia a SRLV en ovinos (Sarafidou et al., 2013).

Aunque se desconoce la manera o maneras en las que el sistema inmune innato reconoce la infección por SRLV, la infección induce una respuesta de IFN de tipo I débil. La producción *in vitro* del interferón inducido por lentivirus (IFN-LV), una mezcla entre los interferones de tipo 1 y 2, inhibe la maduración de monocitos a macrófagos y con

ella la replicación viral, además de tener un efecto directo sobre la replicación en macrófagos (Bertoni G., 2010). Tras el reconocimiento inicial, la producción de IFN de tipo I conlleva la activación de las células infectadas (macrófagos y células dendríticas), que modificarán el patrón transcripcional de cientos de genes con propiedades antimicrobianas, conocidos como *interferon stimulated genes* (ISGs). La inducción de estos ISGs crea un estado antiviral y la activación de la inmunidad adaptativa.

Los factores de restricción son proteínas antivirales que forman parte de este conjunto de ISGs, e inhiben directamente algún paso del ciclo viral. Su expresión es constitutiva en ciertos tipos celulares e inducibles por interferón en otros, por lo que su actividad puede estar presente en la célula sin requerir la señalización provocada por la infección.

3.1.4 Inmunidad adaptativa en infecciones por SRLV

Las células diana de los SRLV se encargan de captar y presentar antígenos a los linfocitos para generar una respuesta inmune específica. La respuesta inmunitaria adquirida frente a la infección por SRLV implica tanto la rama celular como la humoral, aunque se desconoce cómo se relaciona cada una de ellas con la protección del huésped o la progresión de la enfermedad (Reina et al., 2008b).

- Respuesta inmunitaria celular

La aparición de una respuesta celular específica se produce entre una y cuatro semanas tras la infección, dependiendo de la vía de inoculación, pero los niveles de células inmunes disminuyen hasta valores normales entre cuatro y doce semanas después (Griffin et al., 1978; Sihvonen, 1981). Sin embargo, en una infección natural, el número de macrófagos circulantes infectados es bajo y variable (1-12%) y la respuesta celular aunque efectiva, es pobre. Ni siquiera se puede detectar en todos los animales infectados, caracterizándose por ser una respuesta transitoria con picos en diferentes fechas post-infección (Sihvonen, 1984).

Las células que intervienen en esta respuesta son principalmente los linfocitos T, que pueden dividirse en células inductoras (CD4+) y células efectoras (CD8+). Los linfocitos T CD4+ o *helper* (Th) reciben la información necesaria para reaccionar específicamente frente a los antígenos virales en la presentación antigénica. Existen al menos cuatro subpoblaciones de estos linfocitos con diferentes funciones dependiendo de múltiples factores, como el contexto del complejo principal de histocompatibilidad

(MHC), el propio antígeno, la coestimulación o las citoquinas presentes en el momento de la presentación antigénica (**Figura 8**).

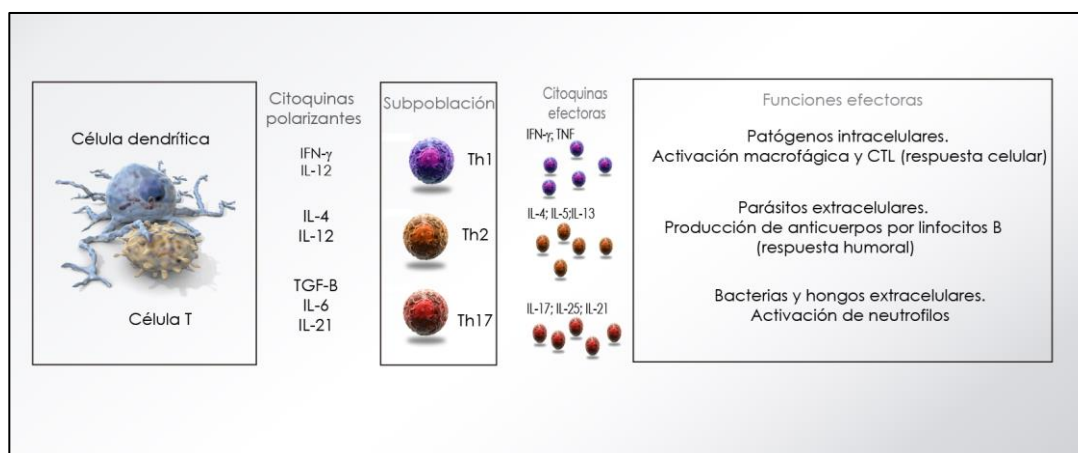


Figura 8. Regulación de citoquinas en la respuesta inmune. Cuando una célula dendrítica activa una célula T, ésta puede diferenciarse en distintos tipos en función de las citoquinas presentes. Cada subpoblación está caracterizada por el patrón de citoquinas que secretan y las funciones efectoras que realizan. Las citoquinas pueden ser divididas en dos grandes categorías: aquellas que se originan en los linfocitos T e inducen el desarrollo del fenotipo Th1 asociado con la respuesta celular, o el fenotipo Th2 que conlleva la producción de anticuerpos por los linfocitos B.

Los SRLV no infectan las células CD4+, por lo que el mantenimiento de dicha población celular durante la infección por SRLV permitirá el desarrollo y mantenimiento de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de SRLV. Sin embargo, la infección puede interferir en la proliferación de células CD4+, ya que las cabras artríticas infectadas con CAEV presentan una proliferación de células CD4+ reducida en comparación con cabras asintomáticas (Perry et al., 1995). En animales infectados se detecta un aumento significativo del recuento de linfocitos T CD8+ respecto al número de CD4+ en órganos diana, principalmente pulmón, invirtiéndose la proporción normal entre estas dos poblaciones celulares. Este aumento puede deberse al incremento en la presentación de antígeno, que activa bien directamente, o bien por la acción de los linfocitos CD4+ Th1, la actividad de los CTL. En el contexto de la infección disminuye la expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II en macrófagos (Jolly et al., 1997), observándose también una disminución de las moléculas coestimuladoras B7, anergia de los linfocitos T y bajos niveles de producción de IFN- γ , en ovejas con síntomas clínicos de la enfermedad (Reina et al., 2007). En general, esto sugiere que la infección por SRLV interfiere con el procesamiento y la presentación del

antígeno y, por lo tanto, limita la capacidad de las células presentadoras de antígenos para activar las células CD4+ e inducir respuestas CTL.

Las células T reguladoras FoxP3 + (Treg) constituyen un linaje distinto de linfocitos T implicados en funciones supresoras. Estudios recientes han desafiado esta idea al sugerir que conservan la plasticidad del desarrollo para convertirse en células T (Th) auxiliares Foxp3 (-) en respuesta a la inflamación. En el contexto de la infección por SRLV, los linfocitos reguladores FoxP3 + parecen tener un papel crucial en el desarrollo de lesiones en los tejidos afectados (Pinczowski et al., 2017).

Sin embargo, la respuesta celular específica tan solo consigue controlar la primera fase aguda de la infección, falla a la hora de eliminar el virus y es particularmente débil en la sangre periférica, es decir, al nivel sistémico en los animales con infección crónica (Cheevers et al., 2000).

- *Respuesta inmunitaria humoral*

Los anticuerpos generalmente no son indicativos de una respuesta protectora en el caso de las infecciones virales, y especialmente en el caso de los lentivirus, debido a la alta variabilidad genética y antigénica que presentan. Sin embargo, su presencia es importante ya que pueden detectarse de por vida, debido al carácter crónico de la infección, siendo la base del diagnóstico de los SRLV. La respuesta inmune mediada por anticuerpos se origina como resultado de la presentación antigénica a linfocitos T CD4+ que, debido a las citoquinas presentes, maduran a Th2 siendo capaces de estimular linfocitos B para producir anticuerpos. La respuesta de anticuerpos generalmente se dirige frente a los epítomos de la proteína Env y de la CA (Bertoni G., 2010). Las respuestas de anticuerpos pueden aparecer a las 2-4 semanas después de la infección y tienden a fluctuar durante los primeros 6 meses de infección. En un intento de controlar la infección inicial, se producen los anticuerpos neutralizantes, sin embargo, pueden tardar 2 años en aparecer (Narayan et al., 1981). No obstante, los epítomos del virus pueden mutar en respuesta a la presión de selección impuesta por las inmunoglobulinas del huésped (Narayan et al., 1978). Estas mutaciones tienden a producirse en el cuarto dominio variable de gp135 y se ha demostrado que la mutación de una citosina conservada cambia los epítomos de neutralización, probablemente contribuyendo a la progresión de la enfermedad (Haflidadottir et al., 2008). Las respuestas de anticuerpos, en general, pueden contribuir a la progresión de la enfermedad en infecciones por SRLV, ya que los animales asintomáticos presentan un

título bajo de IgG2 específica de gp135, mientras que los animales artríticos muestran niveles muy altos de IgG1 y una relación IgG1 / IgG2 más alta que en animales asintomáticos (Trujillo et al., 2004). Incluso la propia inducción de anticuerpos neutralizantes es motivo de controversia, ya que no se han detectado en infecciones por CAEV.

Aunque es necesario realizar más investigaciones para comprender mejor el rol de los anticuerpos neutralizantes en el control de la infección por SRLV, es evidente que una respuesta mediada por anticuerpos no es suficiente para controlar la infección (Gonzalez et al., 2005).

3.2 Selección genética

La selección genética de animales con resistencia natural a la infección por SRLV se ha desarrollado recientemente. La diferencia existente entre rebaños en cuanto a la seroprevalencia y la carga proviral individual observadas sugiere la fuerte implicación del componente genético que determina la susceptibilidad de los individuos (Crespo et al., 2016).

Se han asociado polimorfismos en TLR9 (Sarafidou et al., 2013), CCR5 (White et al., 2009), TMEM154 (Heaton et al., 2012), TMEM139 (Fluri et al., 2006), ZNF (White et al., 2014) y MHC-II (Larruskain et al., 2010) a la resistencia a SRLV.

Un estudio de asociación con el genoma ovino (*genome-wide association study*, GWAS) con más de 50.000 marcadores analizados, en ovinos infectados y no infectados identificó una mutación (E35K) en la proteína transmembrana 154 (TMEM154) asociada significativamente a la resistencia a la infección por VMV. Aunque la función de esta proteína aún sea desconocida, se expresa en células B y monocitos, sugiriendo que podría tener importancia inmunológica. El análisis de 2800 ovejas reveló que aquellas que poseían el alelo E35 tenían un riesgo de infección casi tres veces mayor, convirtiéndolo en un buen candidato como marcador de selección genética (Heaton et al., 2012). La asociación de TMEM154 con la infección podría estar también influenciada por los genotipos de SRLV, ya que se ha observado que distintos subgrupos de virus se han adaptado a infectar ovejas con los genotipos E35 o K35 de manera específica (Sider et al., 2013). Así, tanto los genotipos del hospedador como del virus afectan al riesgo relativo de padecer la infección por SRLV en ovinos. Estudios similares proponen nuevos marcadores que podrían ser incluidos en tests de selección, como DPPA2/DPPA4 o SYTL3 entre otros (White et al., 2012)

Sin embargo, no está claro que la selección genética en favor de la resistencia a una enfermedad no aumente la susceptibilidad a otras, o vaya acompañada de descensos en la producción. Además, hay que tener en cuenta que los lentivirus tienen una alta tasa de mutación y es posible que el virus se adapte rápidamente a la selección ejercida (Stonos et al., 2014).

4. Patogénesis y formas clínicas de la enfermedad

La transmisión de los SRLV se produce principalmente mediante el contacto directo con animales infectados a través de aerosoles procedentes de secreciones respiratorias (vía horizontal) y/o por la ingestión de leche o calostro infectado (vía lactogénica). El virus, en forma libre o por medio de células infectadas, entra en el hospedador a través del tracto respiratorio, la conjuntiva del animal o los capilares fenestrados del intestino en corderos (Blacklaws et al., 2004). Otras posibles formas de transmisión, tales como la intrauterina (Ali Al Ahmad et al., 2005) o la sexual (Fieni et al., 2012; Reina et al., 2011a), tienen una importancia mucho menor en la transmisión natural.

Tras la infección primaria se produce una breve viremia inicial que conducirá a la seroconversión del animal por la síntesis de anticuerpos frente a los antígenos virales (Begara et al., 1996). La afección de los tejidos provoca la aparición de los cuadros sintomáticos típicos de la enfermedad (Cutlip et al., 1988). La progresión de la infección da lugar al desarrollo de lesiones en los pulmones, el sistema nervioso central (CNS), las articulaciones y la glándula mamaria, provocando una inflamación multisistémica que cursa con neumonía, encefalitis, artritis y/o mastitis. Por lo general, uno de los órganos se ve mayormente afectado, aunque varios tejidos pueden mostrar lesión con severidad variable. El tipo y el grado del cuadro clínico que se desarrolla están determinados por distintos factores: por un lado, la base genética de la especie, raza o animal hospedador que condiciona tanto la respuesta inmune innata como adquirida y por otro, las características genéticas y biológicas de la estirpe infectante que condicionarán el tropismo y la virulencia. La forma mamaria y articular no suelen, por sí solas, causar caquexia y muerte del animal, aunque provocan un reemplazo prematuro debido a un descenso en la producción de leche y dificultades locomotoras. Las formas respiratorias y neurológicas, en cambio, sí que conducen a un estado de caquexia y alteración general del sistema nervioso. Las lesiones producidas por la infección se pueden calificar como inmunomediadas, ya que la patología consiste en

infiltración linfocitaria y fibrosis, deriva principalmente de la respuesta inmune crónica del hospedador frente a las células infectadas (Blacklaws, 2012).

5. Importancia de la infección

La infección por SRLV cursa de manera lenta; desde que un animal se infecta hasta que muestra síntomas clínicos pueden pasar incluso años en los que el virus se disemina por todo el organismo sin causar lesiones aparentes. Por ello, el diagnóstico clínico es poco adecuado, de hecho, los síntomas clínicos no aparecen hasta que aproximadamente el 30% del rebaño es seropositivo a SRLV (Ritchie and Hosie, 2014). En este sentido, existe también una relación muy clara entre la transmisión y el sistema de manejo del rebaño, ya que los sistemas de cría intensiva o semi-intensiva, donde se produce el contacto estrecho entre los animales mientras están estabulados, favorece la transmisión del virus (Gomez-Lucia et al., 2018).

Además, los síntomas derivados de la infección producida por SRLV pueden solaparse con los causados por multitud de patógenos, entre los que se encuentran la adenomatosis pulmonar y el síndrome ASIA ovino (Asin et al., 2018).

En la Unión Europea existe una legislación que impide la exportación de animales a aquellos rebaños que no demuestren estar libres de la enfermedad. De forma similar, numerosos países de fuera de la Unión Europea han establecido también la necesidad de estar indemnes de esta enfermedad para poder importar animales vivos. En España es obligatorio testar los animales destinados a exportación así como los sementales en centros de inseminación artificial. Además la *World Organisation for Animal Health*, OIE, considera las enfermedades causadas por lentivirus ovi-caprinos de declaración obligatoria.

5.1 Impacto económico

La infección por SRLV en el ganado supone grandes pérdidas económicas. Aunque no existe un consenso claro en cuanto a las pérdidas concretas sí que existe un amplio acuerdo es que los rebaños con un porcentaje significativo de animales afectados ven mermada su rentabilidad económica, tanto por la reducción en la cantidad y calidad de las producciones como por la restricción en la exportación a otros países. Dentro de las pérdidas económicas directas se encuentran aquellas más evidentes, como la muerte de los animales, o bien otras menos visibles, como los descensos de producción de leche, el menor crecimiento de los corderos o el desvieje prematuro. La muerte a causa de esta

enfermedad se suele producir en forma de goteo, a lo largo de todo el año y tras un largo periodo de adelgazamiento. En un estudio llevado a cabo en dos rebaños lecheros de raza assaf en régimen intensivo y con una seroprevalencia elevada (>70%) se pudo comprobar que la enfermedad era la principal causa de pérdidas de animales, bien por la muerte directa, sobre todo en animales afectados por la forma nerviosa, o bien por el desvieje prematuro del rebaño. (Benavides et al., 2013). Por ello, es importante implementar programas de control que posibiliten la certificación de rebaños libres.

El primer país en tomar medidas para controlar la infección fue Islandia tras la epidemia sufrida en los años 50, llevando a cabo un reemplazo total de los rebaños que presentaban animales enfermos, lo que supuso el sacrificio de más de medio millón de animales (Palsson, 1978). Este método, aunque efectivo, es económicamente inviable en países con una alta tasa de animales infectados, como es el caso de España. Además, la eliminación de ejemplares de alto valor en términos de producción iría en detrimento de la calidad genética de las razas (Houwens, 1990).

Existen muy pocos estudios que analicen la eficacia de planes de control a nivel regional o nacional. El último caso exitoso corresponde al *Norwegian Healthier Goats Program*, cuyo objetivo ha sido evaluar la rentabilidad para los productores de participar en el programa, donde se propone el control y la eliminación del animal infectado con CAEV entre otras enfermedades, en los rebaños de cabras noruegas productoras de leche, mostrando resultados rentables a nivel de granja durante 10 años o más, para unos niveles de producción determinados (Nagel-Alne et al., 2014).

6. Diagnóstico y métodos de control

El aislamiento viral confirma la presencia del virus mediante la observación del efecto citopático, consistente en la formación de sincitios, o por la presencia de actividad retrotranscriptasa (RT) en el sobrenadante.

Otras técnicas de diagnóstico directo, como la inmunocitoquímica o (Lujan et al., 1994b), hibridación *in situ* o PCR *in situ*, que detectan proteínas o ácidos nucleicos virales en zonas con lesión compatible con la infección por SRLV (Biescas et al., 2005; Storset et al., 1996), están restringidas a la investigación o como pruebas confirmatorias, ya que su coste es elevado, no hay gran disponibilidad de reactivos y muchas veces muestran baja sensibilidad (Reina et al., 2008b).

Entre las técnicas moleculares, el ensayo de movilidad heterodúplex, útil para la caracterización genotípica de estirpes (Germain and Valas, 2006) o la técnica de

amplificación isotérmica (LAMP) (Huang et al., 2012) implementada en dispositivos portátiles *dipstick* (Tu et al., 2017). Sin embargo, la PCR es la técnica más utilizada hoy en día debido a su adaptabilidad, sensibilidad y sencillez. Son muchos los factores que pueden influir en la detección del virus por PCR, tales como el tipo y la calidad de la muestra de partida, la carga viral que varía durante la infección, la variabilidad de las secuencias entre estirpes y la zona del genoma viral que se escoja para el diseño de los cebadores (Cardinaux et al., 2013). Hay que tener en cuenta que tan sólo un monocito se encuentra infectado entre 10^4 - 10^5 células, por lo que la PCR diseñada debe ser muy sensible. Mediante PCR se ha detectado el genoma proviral en muestras de leche o secreciones mamarias (Extramiana et al., 2002), semen (Travassos et al., 1999), líquido sinovial (Reddy et al., 1993), PBMCs (Zanoni et al., 1996) y PBL, leucocitos de la sangre (Alvarez et al., 2006; Leginagoikoa et al., 2009), siendo estas dos últimas fuentes las más utilizadas para el diagnóstico de la infección.

Una de las estrategias para aumentar la sensibilidad es el uso de PCRs anidadas o semi-anidadas que implican dos o más rondas de amplificación (Celer et al., 2000; Eltahir et al., 2006) o el de cebadores degenerados, permitiéndonos salvar el problema de la heterogeneidad. En la bibliografía podemos encontrar cebadores diseñados a lo largo de todo el genoma viral, incluyendo los genes *gag*, *pol* y *env*, o las regiones LTR, mostrando diferencias en sensibilidad y especificidad. Además de la PCR convencional también se ha utilizado la PCR en tiempo real (q-PCR) para la detección y cuantificación de SRLV, tanto en muestras de DNA como de RNA (Brinkhof et al., 2008; Carrozza et al., 2010). La q-PCR posibilita la cuantificación de la carga viral (Gudmundsson et al., 2003; Zhang et al., 2000), con un incremento de la sensibilidad y especificidad gracias al uso de sondas Taqman en estas reacciones aumenta la especificidad. Además, la PCR se puede acompañar de otras metodologías que permitan distinguir entre estirpes sin la necesidad de secuenciar, como el análisis de los amplicones con enzimas de restricción (Rosati et al., 1995), HMA (Valas et al., 1997) o la utilización de q-PCR multiplex (Cardinaux et al., 2013).

Numerosos estudios apuntan que, por regla general, el diagnóstico serológico, sobre todo mediante ELISA (ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas), es más sensible que el diagnóstico por PCR (Muz et al., 2013), aunque la PCR puede detectar animales infectados que aún no hayan seroconvertido (Zanoni et al., 1996). Por ello, la complementación de ensayos serológicos con técnicas PCR sería óptima para el diagnóstico y posterior control de la infección por SRLV (Brinkhof et al., 2010; Modolo et al., 2009).

6.1 Métodos de control

En ausencia de estrategias de vacunación efectivas, la medida de control más extendida se basa en la identificación temprana de animales positivos y el sacrificio selectivo de éstos y su descendencia, utilizando madres seronegativas para la reposición. De esta manera se ha logrado eliminar la infección en rebaños con seroprevalencias cercanas al 30% en un período de 2 a 7 años (Synge and Ritchie, 2010). En rebaños con seroprevalencias mayores se puede optar por la creación de otro rebaño libre de SRLV, separado físicamente del infectado. Los corderos de reposición de este nuevo rebaño son destetados tras el parto y se alimentan con calostro artificial o leche no infectados (Houwens, 1990). Sin embargo, la necesidad de disponer de dos instalaciones independientes hace que no sea siempre viable. Otras medidas podrían ser la compra anual de animales libres de SRLV para la reposición o la selección genética, como se ha mencionado anteriormente, de animales resistentes, sin detrimento de la selección basada en criterios de producción.

A este respecto, regiones como Escocia han implantado programas con más de 2600 rebaños acreditados. A través del programa *Maedi Visna Accreditation Scheme* (SRUC) los rebaños son testados cada 2 o 3 años para renovar la acreditación y los ganaderos son asesorados por medio de unas estrictas reglas de bioseguridad para evitar la infección. Sin embargo, el *Scotland's Rural College* ha dado la voz de alarma porque en los últimos años se han detectado brotes de SRLV en rebaños certificados libres, hallándose en casi todos los casos fallos en el seguimiento de la normativa, apoyados en un ELISA basado en un solo genotipo (Ritchie and Hosie, 2010, 2014). Se ha estimado que la infección por SRLV puede reducir la producción de un 20% a un 40%, lo que significaría una reducción de hasta 50.000 libras en una ganadería de gran tamaño que no siga el programa de control (Reports, 2014).

En el caso de España, se realizó una campaña de control y erradicación en Aragón en basados en diagnóstico serológico durante los años 2000. El rebaño analizado en fue considerado controlado frente a la infección, ya que el porcentaje de seroprevalencia detectado en los sucesivos estudios serológicos era siempre menor del 5% (Perez et al., 2010). Otro sistema de control que comenzó en 2004 basado en la segregación serológica y las estrategias de manejo en un rebaño lechero infectado de ovejas de raza Manchega. Tras la segregación, se redujo la infección aproximadamente dos años sin la necesidad de sacrificar una gran cantidad de animales (Perez et al., 2013).

6.1.1 Métodos serológicos

El método más utilizado para el diagnóstico de la infección es la detección de anticuerpos. Estos anticuerpos no protegen de la enfermedad, pero son buenos indicadores de la infección. Esta metodología no está exenta de problemas, como los derivados de la alta variabilidad genética y antigénica de las estirpes circulantes en el campo, el periodo que tarda el animal entre la infección y la producción de anticuerpos detectables o la intermitencia en la seroconversión durante la vida del animal infectado, todos ellos pudiendo originar falsos negativos. Por otro lado, la presencia de anticuerpos maternos podría dar lugar a falsos positivos.

La producción de anticuerpos se puede detectar por inmunodifusión en gel de agar (AGID), ELISA, la radioinmunoprecipitación (RIPA) y western blot (WB), aunque ninguno de ellos puede considerarse como *gold standard* (de Andres et al., 2005; Knowles, 1997). Tanto el ensayo RIPA como el WB se emplean como pruebas confirmatorias (Herrmann-Hoesing, 2010). El AGID tiene una alta especificidad, pero su sensibilidad es baja y además su interpretación es a menudo subjetiva (Knowles, 1994), por lo que está siendo sustituido por métodos más sensibles y susceptibles de automatización, como es el ELISA, de relativo bajo coste y fácil de interpretar, aumentando el éxito de los programas de control (Synge and Ritchie, 2010).

Aunque la variabilidad antigénica entre genotipos sea muy alta, se han descrito anticuerpos con reacción cruzada frente a antígenos de la cápside de tipo VMV (genotipo A) y tipo CAEV (genotipo B) (Gogolewski et al., 1985), permitiendo el control de la infección por SRLV. Sin embargo, el uso de ELISAs basados en antígenos derivados exclusivamente de una sola estirpe viral está permitiendo el escape de animales positivos, tal como se demuestra en la infección por los genotipos E (Reina et al., 2009c), B2 (Lacerenza et al., 2006), A (de Andres et al., 2013) o A4 (Cardinaux et al., 2013). A este respecto, existen muy pocos estudios que comparen la sensibilidad y especificidad de los distintos ELISAs comerciales disponibles a nivel internacional y que impliquen tanto muestras ovinas como caprinas (Michiels et al., 2018).

Se han desarrollado ELISAs de competición (cELISA CAEV of VMRD Inc. Pullman, WA) que utilizan anticuerpos monoclonales frente a la proteína de la envoltura viral (Herrmann et al., 2003), pero es más habitual el uso de ELISAs indirectos. Uno de los primeros descritos se basa en tapizar los pocillos ELISA con virus completo, y se comercializa como AG-CHEKIT (CAEV/MVV kit, IDEXX Switzerland AG, Liebefeld, Bern, Switzerland) (Zanoni et al., 1994). Otros están tapizados con la proteína recombinante

Gag p25 y un péptido sintético de la región TM, ambos derivados del genotipo A, Elitest-MVV (HYPHEN Biomed, Neuville-sur-Oise, France) (Saman et al., 1999) y Pourquoiier (ELISA Maedi-Visna/CAEV Serum verification Institut Pourquoiier, Montpellier, France), IDDEX, IDVet. Pero se ha demostrado que los epitopos inmunodominantes de p25 presentan heterogeneidad, lo que afecta a la sensibilidad de los ELISAs basados en una única estirpe (Grego et al., 2002). Para solventar este problema, se ha desarrollado test que incluyen una mezcla de antígenos de la región *gag* de tres genotipos de SRLV diferentes, A, B y E (IN3 diagnostic. Eradikit® SRLV indirect ELISA for Small Ruminant Lentivirus) o péptidos de la región *env* de los genotipos A y B (INgezim Maedi ® Ingenasa).

La presencia de epítopos inmunodominantes en regiones menos conservadas dentro de cada genotipo, permite a su vez plantear el diseño de test ELISA capaces de determinar el tipo del virus circulante. Por ejemplo, la proteína SU es muy variable entre los SRLV (Mordasini et al., 2006) y péptidos basados en esta región podrían tener un gran potencial para realizar diagnósticos específicos que permitan determinar el genotipo del virus presente en un brote o en un rebaño concreto. Un estudio de los virus circulantes en Polonia utilizando un ELISA basado en los dominios inmunodominantes de las proteínas MA (p17), CA (p25) y SU, muestra una reacción antigénica cruzada para los epítopos GAG entre los genotipos A y B, pero no para los epítopos SU, que son específicos de genotipo (Olech et al., 2012). Este hecho demuestra, una vez más, la importancia de la correcta elección de los antígenos del test según la finalidad del procedimiento.

Otros métodos alternativos para detectar la presencia de virus, incluyen la detección y cuantificación de la actividad de la RT en sobrenadantes de cultivos celulares o en muestras biológicas. Se puede determinar mediante el uso de un kit comercial, basado en una técnica ELISA no radioactiva altamente sensible que utiliza un formato de placa de titulación de 96 pocillos (HS-Lenti Cavid), o mediante RT-PCR en tiempo real. En la cuantificación de la actividad RT por PCR cuantitativa basada en SYBR Green (SG-PERT) se agrega un RNA exógeno al sobrenadante viral y la actividad de la RT se estima determinando la cantidad de RNA que se retrotranscribe en cDNA (Pizzato et al., 2009). Este ensayo se utiliza para la detección de contaminantes retrovirales en productos biológicos. En comparación frente al ELISA es superior, por su menor variación, menor precio, menor tiempo de realización y mayor rango lineal. Por lo tanto, este ensayo constituye una alternativa atractiva para la determinación rutinaria de retrovirus y lentivirus en el laboratorio (Vermeire et al., 2012).

7. Factores de restricción

Como parásitos intracelulares obligados, los retrovirus dependen del sistema celular para completar su ciclo replicativo, haciendo uso para ello de vías metabólicas conservadas a lo largo de la evolución de los mamíferos. Estas rutas ayudan al virus a entrar en la célula, replicar su genoma viral, traducir sus proteínas y liberar nuevos virus infectivos. Los mamíferos codifican diferentes factores implicados en la inhibición de cada uno de los pasos de la replicación viral. Estos factores de restricción del hospedador tienen contacto directo con determinadas proteínas virales que actúan a modo de contramedidas, generalmente codificadas por los genes accesorios, que excluyen dichos factores recuperando así la infectividad (**Figura 9**).

El primer factor de restricción retroviral descubierto fue Fv1 (*Friend Virus susceptibility 1*) (Best et al., 1996). Situado en el cromosoma 4 de murino, está codificado por un gen (*Fv1*), responsable de la resistencia a la infección causada por el virus de la leucemia murina, (*murine leukemia virus*, MLV). Fv1 tiene una similitud ($\approx 60\%$) con el gen *gag* de un retrovirus endógeno (ERV-L) no relacionado con los MLVs (Best et al., 1996). Los dos alelos originales de Fv1 (Fv1b y Fv1n) permitieron la división de los MLVs en 3 grupos, dependiendo de su tropismo en dos líneas de ratón. Si bien Fv1 proviene de un retrovirus endógeno, parece haber sido adquirido por la célula para desarrollar una actividad nueva (revisado en Bieniasz, 2012), bloqueando la infección tras la entrada del virus a la célula, uniéndose a la cápside vírica y previniendo así la progresión del ciclo viral en pasos previos a la integración, pero posteriores a la retrotranscripción. La restricción producida por Fv1 no es total pero suficientemente intensa para disminuir la tasa de leucemias en ratones infectados (Pryciak and Varmus, 1992). Tras varios estudios, se encontraron bloqueos similares a Fv1 en células humanas y en primates denominando *Restriction factor-1* (Ref1) a la proteína humana y *lentivirus susceptibility factor-1* (Lv1) a la de primates, (Cowan et al., 2002). En el caso de los lentivirus, los factores de restricción más estudiados son APOBEC3, TRIM5 α , SAMHD1 y teterina

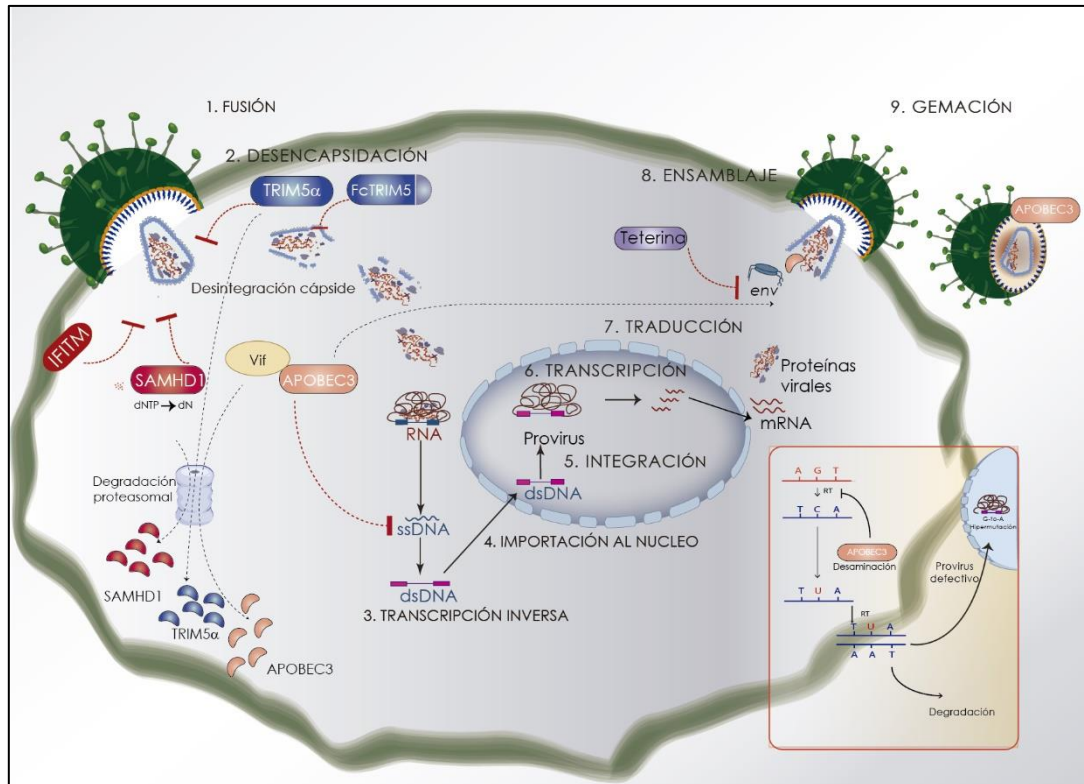


Figura 9. Factores de restricción frente a los lentivirus. APOBEC3, TRIM5 α , Teterina y SAMHD1 y sus interacciones con las proteínas virales accesorias (Vpu, Vif, Vpx, Nef). Cada factor retroviral tiene como diana un paso específico del ciclo viral e inhiben la replicación mediante mecanismos diferentes. El proceso de hipermutación mediado por APOBEC3 se indica en el panel.

7.1 TRIM5 α

Ref-1 en humanos y Lv1 en primates, se describieron como factores inhibitorios de la infección retroviral (Cowan et al., 2002; Hatzioannou et al., 2003) bloqueando pasos del ciclo viral posteriores a la retrotranscripción (Bieniasz, 2004; Towers et al., 2000). En 2004 se descubrió en el macaco Rhesus, TRIM5 α (tripartite motif-containing 5 alpha) como parte de la familia de moléculas TRIM (Stremlau et al., 2004) y se demostró que Ref1 y Lv1 estaban codificadas por variantes del gen TRIM5 α específicas de especie (Hatzioannou et al., 2004; Keckesova et al., 2004). Además de en humanos y primates, se ha descrito actividad antiviral mediada por TRIM5 α en ganado bovino, en conejos, en liebres y en ovinos (Fletcher et al., 2010; Jauregui et al., 2012; Schaller et al., 2007; Si et al., 2006), lo que sugiere que estos genes proceden de una secuencia ancestral con actividad antiviral y que esta defensa está extendida en todos los mamíferos. Generalmente TRIM5 α ha sido considerado como un factor de restricción frente a virus heterólogos, responsable de la barrera entre especies, mostrando poca o

nula actividad frente a los retrovirus que infectan la propia especie. Así, TRIM5 de humanos carece de actividad frente a HIV-1 pero restringe activamente la replicación de EIAV y MLV-N. Las diferencias en la especificidad de TRIM5 α así como en los niveles de expresión pueden modificar la permisividad a la infección, como en el caso de TRIM5 α ovino frente al virus VMV (Jauregui et al., 2012).

Aunque las proteínas de la familia TRIM presentan diferentes funciones, poseen una estructura y organización de dominios muy similar, con elementos comunes como el motivo tripartito RBCC en el extremo amino terminal, que consta de un dominio RING con actividad E3 ubiquitina ligasa, uno o dos dominios B-Box y una región Coiled-coil (Nisole et al., 2005). La isoforma TRIM5 α , activa frente a retrovirus, contiene además en el extremo carboxilo terminal un dominio B30.2, también llamado PRYSPRY, que se une a la cápside retroviral (Stremlau et al., 2006). PRYSPRY es el mayor determinante de la especificidad de la diana viral o del espectro de retrovirus que se restringen por una variante de TRIM5 α en particular (Song et al., 2005).

No se conoce con exactitud la forma en que TRIM5 α restringe la infección por retrovirus, se estima que el hito más importante es el reconocimiento y la unión de la cápside vírica en una etapa temprana del ciclo viral tras la entrada en la célula. Los dímeros de TRIM5, a su vez, multimerizan en hexámeros, implicando los dominios CC, B-Box2 y la región Linker 2 (L2) situada entre CC y PRYSPRY (Ganser-Pornillos et al., 2011; Wagner et al., 2016). Estos hexámeros constituyen una red que es complementaria a la cápside vírica. El mecanismo de acción más aceptado en la comunidad científica tiene lugar en dos fases. La primera de ellas es suficiente para la inhibición de la infección viral y consiste en la unión de TRIM5 α a la cápside vírica. En la segunda fase TRIM5 α induce una desencapsidación abortiva del virus unido, por una vía dependiente del proteasoma, probablemente por autoubiquitinación mediada por el dominio RING. Sin embargo, también se ha visto implicado en la restricción de la infección de retrovirus en una etapa tardía (conocida como *late restriction*) en la que TRIM5 evita la producción de viriones en la célula infectada de una forma independiente del dominio PRYSPRY, identificando los dominios RBCC como responsables de la especificidad en este tipo de restricción (Sakuma et al., 2010). La restricción en esta etapa implica una interacción entre TRIM5 α y los componentes virales durante el ensamblaje de los nuevos viriones. El papel relativo que juegan las dos etapas, temprana y tardía, en la restricción frente a los distintos virus depende de la especie de mamífero de la que procede TRIM5 α y del virus al que éste restringe (Ohmine et al., 2011).

Aunque su mecanismo de acción sea desconocido todavía, está claro que TRIM5 α representa un arma del sistema inmune para bloquear la infección por retrovirus. Su expresión es constitutiva, pero aumenta por inducción con interferón tipo I a través de un sitio IRF3 en el promotor de TRIM5 α , quedando así conectado con el sistema inmune (Towers, 2007).

7.2 SAMHD1

SAMHD1 (*sterile α motif and HD domain containing protein 1*) es la única proteína de mamífero caracterizada como una enzima dNTP trifosfohidrolasa (dNTPasa) (Baldauf et al., 2012) que actúa agotando el *pool* celular de dNTPs requerido por la DNA polimerasa. SAMHD1 tiene además actividad exonucleasa 3' \rightarrow 5' en la cadena simple tanto de DNA como de RNA, degradando el RNA genómico viral o inhibiendo la retrotranscripción (Ryoo et al., 2014). HIV-2 y SIV contrarrestan SAMHD1 expresando la proteína accesoria Vpx o, en el caso de SIVmus y SIVdeb, Vpr (Lim et al., 2012). Vpx y Vpr tras la entrada del virus inducen la degradación proteasomal de SAMHD1 formando un complejo con la ubiquitina ligasa E3 de CRL4^{DCAF1}. Vpx se libera de los viriones antes de la desencapsidación (Jauregui et al., 2015) y la degradación comienza rápidamente después de la infección, detectándose dos horas después de la infección (Hollenbaugh et al., 2014; Kim et al., 2012). HIV-1 es susceptible a la restricción de SAMHD1 ya que su Vpr no induce la degradación de SAMHD1 y carece de una Vpx. Como resultado, el virus tiene una capacidad limitada para infectar células mieloides (Lahouassa et al., 2012).

La capacidad de SAMHD1 para bloquear la infección retroviral en macrófagos, células dendríticas y células T CD4 + en reposo, se controla mediante la fosforilación del aminoácido T592 (Cribier et al., 2013; White et al., 2013). La fosforilación de SAMHD1 regula su capacidad para bloquear la infección por HIV-1, pero no la capacidad de disminuir los niveles celulares de dNTPs (White et al., 2013)

Los polimorfismos en el gen *SAMHD1* están asociados con el síndrome de Aicardi-Goutières (AGS), una enfermedad inflamatoria autoinmune de inicio temprano caracterizada por la expresión constitutiva de IFN tipo I (Crow, 2013).

Además de su función antiviral, se piensa que la SAMHD1 desempeña un papel en la fisiología celular facilitando la reparación del DNA y al regular los niveles de dNTP mediante la restauración de roturas de doble cadena de recombinación homóloga (Daddacha et al., 2017; Lahouassa et al., 2012). Tras el daño, se produce un aumento de

los niveles del inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina (p21). El aumento de la actividad de p21 se asocia con una disminución de SAMHD1 fosforilada, lo que lleva a un aumento de la actividad antiviral (Pauls et al., 2014; Valle-Casuso et al., 2017) asociado a un incremento de la expresión de IGSs (Jauregui and Landau, 2018). SAMHD1 participa en el ciclo celular estimulando la proliferación celular, redistribuye la población del ciclo celular en la fase G1 / G0 y reduce la apoptosis (Bonifati et al., 2016) por lo que se ha relacionado con varios tipos de cáncer (Kohnken et al., 2015).

7.3 BST2A

La teterina ha sido identificada como la proteína responsable de evitar la salida de los viriones de nueva formación de la célula en la infección por virus HIV-1 deficientes en *vpu* (Van Damme et al., 2008). Este hecho concordaba con observaciones anteriores que describían un descenso de 5 a 10 veces en la salida de virus deficientes en Vpu de células T, sin detectarse ningún fallo en la expresión del resto de los genes virales (Strebel et al., 1988). Se demostró que esta deficiencia en la salida era dependiente del tipo celular y que las partículas virales maduras permanecían ancladas a la célula acumulándose en la membrana plasmática y en compartimentos celulares en ausencia de Vpu (Geraghty et al., 1994). El responsable de ello resultó ser un factor de restricción expresado en la superficie de las células e inducible por interferón, la teterina (Neil et al., 2008). Además, se evidenció la unión física de la teterina a las partículas virales Δvpu en la superficie celular y en compartimentos celulares, y que Vpu y la teterina interactúan por medio de sus hélices transmembrana (Gupta et al., 2009; McNatt et al., 2009).

Estudios con una proteína artificial diseñada con dominios topológicamente similares a los que componen la teterina, pero sin homología en la secuencia, revelan que el determinante de la función es la estructura y no la secuencia aminoacídica, ya que la proteína artificial restringe la liberación de los viriones de forma similar a la teterina natural. La teterina inhibe la salida de los virus anclándolos directamente a la célula, por lo que no requeriría de cofactor celular alguno y no se daría un reconocimiento específico de las proteínas virales, como es el caso de otros factores de restricción. De hecho, la teterina se concentra en las zonas por las que el virus realiza la salida de la célula y se incorpora en la membrana lipídica de los viriones, atándolos así a la membrana celular (Perez-Caballero et al., 2009).

La estructura de la teterina incluye un dominio amino terminal citoplasmático, un dominio transmembrana, un dominio extracelular *Coiled-coil* y un dominio de anclaje a membrana C-terminal de glicosilfosfatidil inositol (GPI) (Neil et al., 2008). Esta estructura le permite asociarse tanto a la envoltura viral como a la membrana celular. Los dímeros de teterina adoptan una configuración axial en su estado funcional y tanto el par de dominios transmembrana como el par de anclajes GPI pueden insertarse en las partículas virales que se están ensamblando, quedando atrapados en la membrana celular mediante el par de anclajes restante. Se ha demostrado preferencia del par de anclajes GPI por la unión al virus y la del de los dominios transmembrana a la célula, que dejaría el dominio N-terminal expuesto al citoplasma, donde podría ejercer su función efectora (Venkatesh and Bieniasz, 2013). Por un lado, los viriones capturados se internalizan por endocitosis y se degradan en lisosomas, por lo que la teterina tiene que interactuar con la maquinaria endocítica (Evans et al., 2010) y por el otro, se ha observado que la teterina inicia cascadas de señalización, activando el sistema inmune innato (Yan and Chen, 2012).

El espectro de restricción de la teterina humana es amplio, y además de inhibir la liberación de varios retrovirus también inhibe filovirus o herpesvirus (Jouvenet et al., 2009; Sakuma et al., 2009). No todos los virus poseen la proteína accesoria Vpu para contrarrestar la Teterina, por lo que han desarrollado otros mecanismos para poder hacer frente a la restricción. Por ejemplo, en el caso de SIV la proteína accesoria Nef acelera la endocitosis (Zhang et al., 2009), y en infecciones por HIV-2 la proteína Env acelera la internalización de la teterina (Le Tortorec and Neil, 2009). Sin embargo, no se han descrito proteínas en el genoma de SRLV capaces de contrarrestar la acción de la teterina ovina.

Hasta la fecha, se ha encontrado una copia del gen BST2, codificante de la teterina, en la mayoría de los vertebrados. En rumiantes, el gen BST2 está duplicado (Arnaud et al., 2010; Takeda et al., 2012), codificando dos parálogos BST2, denominados oBST2A y oBST2B (Arnaud et al., 2010). Se ha descrito que IFN τ induce la expresión de los dos genes BST2 ovinos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Wang et al., 2013). Además oBST2A bloquea la salida celular del betaretrovirus exógeno JSRV (*Jaagsiekte sheep retrovirus*), agente causal de un cáncer de pulmón transmisible de ovejas. Curiosamente, oBST2A parece ser más activa que oBST2B para restringir la liberación de partículas virales (Arnaud et al., 2010).

7.4 APOBEC3

La familia de las proteínas APOBEC, *apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide*, está caracterizada por la presencia de uno o dos motivos de Zn²⁺ con la secuencia consenso, dominio Z, HxEx₂₃₋₂₈ PC_{x2-4}C (x puede ser cada uno de los 20 aminoácidos, y en subrayado se indican los residuos invariables) que cataliza la desaminación de citosinas en un amplio espectro de dianas RNA y DNA. Estas proteínas eliminan el grupo amino de las citosinas convirtiéndolas en uracilos (Smith et al., 2012). A esta familia pertenecen la proteína AID (*activation-induced cytidine deaminase*) implicada en la hipermutación somática y la diversificación de anticuerpos, APOBEC1 que edita el RNAm de la apolipoproteína B introduciendo un codón stop y creando dos RNAm distintos, importantes en el metabolismo lipídico; APOBEC2 relacionado con la diferenciación muscular; APOBEC3 (A3) que restringe retroelementos y diferentes tipos de virus; y APOBEC4 que se ha localizado en testículos aunque su función no ha sido aún determinada (Marino et al., 2016).

El estudio de las secuencias A3 de artiodáctilos como cerdos, ovejas o vacas, sugieren que el ancestro común con los primates poseía un repertorio de proteínas A3 constituido por tres dominios desaminasa (Z1, Z1 y Z3) (LaRue et al., 2008). Las proteínas Z1 y Z2 se distinguen de Z3 por poseer el motivo SW-S/T-PC-x2-4-C en vez del motivo TW-S-PC-x2-C. Las proteínas Z1 y Z2 se diferencian entre sí por presentar los motivos H-x1-E-x5-X-V/I y H-x1-E-x5-W-F respectivamente. Además, Z1 posee una única isoleucina en el motivo conservado RIY localizado hacia la región C-terminal de los residuos coordinados de zinc.

Mediante procesos de recombinación y bajo la selección ejercida por infecciones con antiguos retrovirus, este repertorio se habría expandido en humanos hasta alcanzar los ocho genes que presentan en la actualidad (A3A-H) y que se traducen en tres proteínas con un dominio Z único (A3A, A3C y A3H) y cuatro con dos dominios desaminasa (A3B, A3DE, A3F y A3G) (Jarmuz et al., 2002). Los ovinos y bovinos presentan tres dominios Z, aunque por medio de corte y empalme (*splicing*) alternativo codifican cuatro proteínas (A3Z1, A3Z2, A3Z3 y A3Z2Z3), todas ellas con actividad citosina desaminasa sobre DNA de cadena simple (**Figura 10**). A3Z2Z3 se localiza en el citoplasma, mientras que las demás se encuentran también en el núcleo (LaRue et al., 2008).

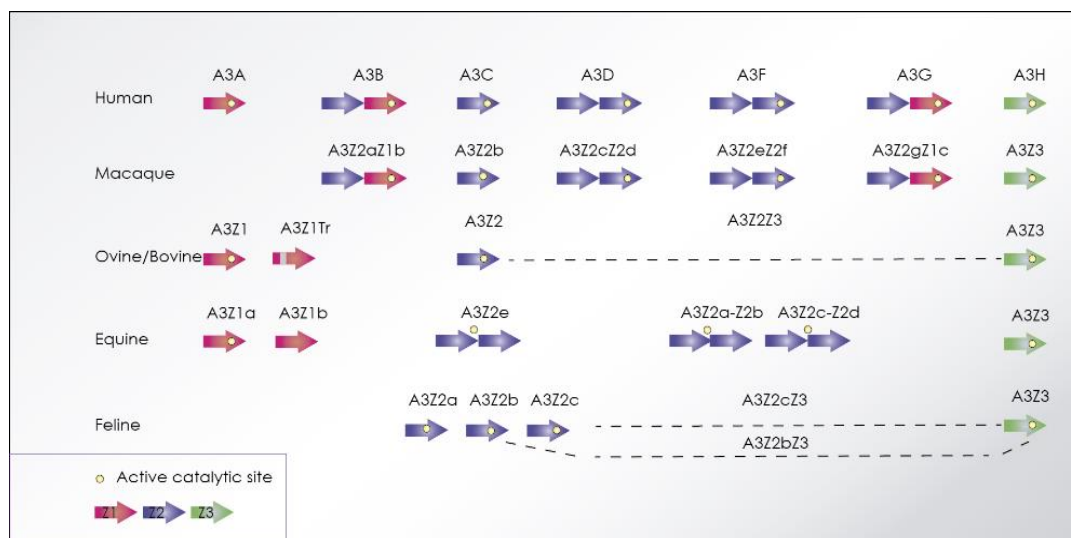


Figura 10. APOBEC3. Representación esquemática de las proteínas APOBEC3 codificadas por primates en comparación con ovinos, bovinos, equinos, y felinos.

Las proteínas A3 han sido ampliamente estudiadas en cuanto a su capacidad para restringir la infección por lentivirus como HIV, SIV o EIAV (Mangeat et al., 2003; Mussil et al., 2011; Refsland et al., 2010). La primera proteína A3 identificada fue A3G, en el estudio de la proteína accesoria Vif de HIV-1. Se había observado que Vif era necesaria para la infección de algunos tipos celulares, pero no de otros (Strebel et al., 1987). La fusión de células permisivas y no permisivas daba lugar a células híbridas que mantenían el fenotipo restrictivo, sugiriendo la existencia de algún factor celular antiviral (Simon et al., 1998). Sheehy y colaboradores aislaron en el año 2002 la proteína celular responsable de inhibir el virus HIV-1 en ausencia de Vif, CEM15, que más tarde se denominaría A3G (Sheehy et al., 2002).

Se ha propuesto a las proteínas A3 esenciales en el mecanismo para prevenir la transmisión zoonótica de los virus (Cullen, 2006). Cabe destacar que investigaciones con cohortes de pacientes infectados con HIV han confirmado una mayor expresión de A3G en personas expuestas seronegativas, en comparación con personas sanas, lo que refuerza la importancia de la actividad antiviral de A3 *in vivo*. Además, el cese de la exposición se asocia con una disminución de la expresión de A3G (Biasin et al., 2007; Vazquez-Perez et al., 2009).

Se ha estudiado la actividad anti A3G de la proteína Vif en pacientes *elite controllers*, en pacientes con infección aguda, así como en pacientes no controlados que no reciben tratamiento, observándose una atenuación significativa de la actividad anti A3G de la proteína Vif en los pacientes capaces de controlar la replicación (Kikuchi et

al., 2015). Asimismo, un haplotipo natural de A3G-H186R, común en las poblaciones africanas, se ha asociado con una progresión más rápida de la enfermedad. Aunque el mecanismo subyacente sigue siendo desconocido, las diferencias en la actividad de Vif frente a A3G natural y A3G-H186R pueden contribuir a la manifestación clínica (Reddy et al., 2016). Recientemente, en un análisis longitudinal en individuos infectados, se han analizado los niveles de A3 en relación a la patogénesis de la infección *in vivo* junto con el efecto de la terapia antirretroviral, en pacientes sin tratamiento antirretroviral o tratados con diferentes antiretrovirales, se ha observado un incremento de A3G/A3A tras varias semanas de tratamiento, sugiriendo que altos niveles pueden estar en relación o asociación con efectos protectores contra la progresión de la enfermedad y la inflamación crónica (Covino et al., 2018).

A3 también ejerce su actividad frente a otros retrovirus incluyendo gamma retrovirus (virus de la leucemia murina, virus del tumor mamario de ratón) (Nitta et al., 2012; Okeoma et al., 2007), virus del sarcoma de Rous (Wiegand and Cullen, 2007), virus de la leucemia humana de células T tipo 1 (Mahieux et al., 2005) y spumavirus (Delebecque et al., 2006); o frente a virus de otras familias, como virus de la hepatitis B (Janahi and McGarvey, 2013; Turelli et al., 2004), parvovirus (Narvaiza et al., 2009), virus del herpes simple 1 (Suspene et al., 2011b) y papilomavirus (Vartanian et al., 2008) con diferentes grados de intervención de la actividad enzimática, dependiendo de si los estudios se han llevado a cabo *in vivo* o *in vitro*. Además, inhiben retrotransposones con o sin LTR (Arias et al., 2012).

7.4.1 Mecanismos de acción

A3 puede inhibir la replicación viral mediante mecanismos dependientes e independientes de la capacidad de desaminación A3. En los mecanismos dependientes, A3 se empaqueta en las nuevas partículas virales que se forman en las células infectadas y son transportadas por el mismo virus a la próxima célula diana donde ejercerán su acción. Durante la retrotranscripción del RNA viral, A3 ya presente en el virión puede unirse a la cadena simple de DNA (-) y provocar la desaminación de citosinas (C) a uracilos (U), que provocará una mutación de guanina (G) a adenina (A) en la cadena de DNA positiva. Las cadenas de DNA que contienen uracilos además pueden ser diana de la uracil-DNA glicosilasa (UNG), que genera un sitio abásico induciendo la degradación del DNA mediante endonucleasas. El uracilo de las cadenas que no son degradadas por la UNG, se empareja con adenina (A) y el DNA proviral continúa el ciclo insertándose en

el genoma celular (**Figura 11**). Estas mutaciones de G a A provocan cambios no sinónimos en las proteínas o la acumulación de codones stop dando lugar a virus defectuosos comprometiendo la viabilidad viral (Harris et al., 2003; Harris and Liddament, 2004). Por otro lado, una tasa de mutaciones por debajo de la hipermutación letal puede contribuir a aumentar la heterogeneidad de los lentivirus y su adaptación al hospedador (Harris, 2008).

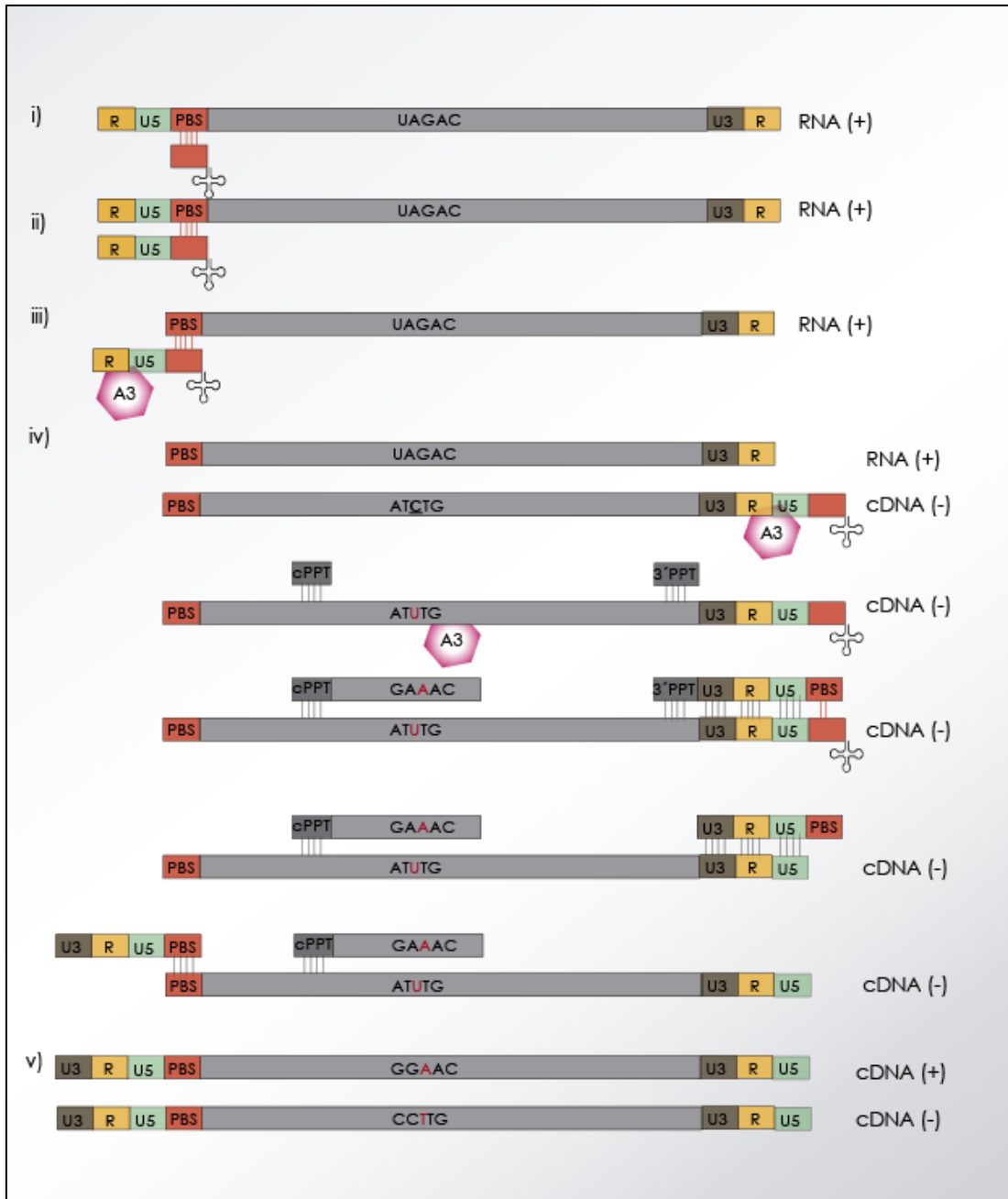


Figura 11. Actividad citidín desaminasa de APOBEC3A durante la transcripción inversa. i) El cebador tRNA^{Lys-3} se une a PBS (*primer-binding site*) del RNA viral. ii) La transcriptasa inversa sintetiza el DNA (-) alargando el tRNA^{Lys-3} hasta el extremo 5'. iii) Una parte del RNA complementario al DNA sintetizado se degrada por la actividad de la RNAasa de la RT. La cadena negativa de DNA monocatenaria, puede actuar como un sustrato para APOBEC3A. iv) APOBEC3A, muta el DNA de C a U a través de su actividad citidín desaminasa. La RNAasa degrada el RNA hibridado al DNA, excepto la región PPT. La síntesis de DNA se reanuda utilizando PPT como cebador. La RNAasa degrada PPT y libera el tRNA^{Lys-3}. v) La transcripción inversa se completa mientras que los nucleótidos de adenina se integran en la cadena positiva del DNA como nucleótidos complementarios a los uracilos en la cadena negativa del DNA. Antes de la integración, U es reparado por enzimas celulares, produciendo pares de bases complementarios A-T.

El DNA proviral hipermutado exhibe dos gradientes gemelos o *twin gradient*, que comprende la región que van desde el PBS al tracto de polipurinas central (cPPT) localizado en el gen *pol*, concretamente en la integrasa; y un segundo gradiente con incremento de frecuencia de mutaciones desde el cPPT hasta el tracto de polipurinas 3' (3'PTT) inmediatamente aguas arriba de la 3'-LTR (Suspene et al., 2006). Tanto cPPT como 3'PTT son regiones del genoma viral resistentes a la actividad de la RNAasa H y se utilizan como cebadores para la síntesis de la cadena de DNA positiva. Se considera que estos gradientes están relacionados con la mayor accesibilidad de la cadena simple de DNA negativa a las proteínas A3 durante la retrotranscripción, es decir, con el tiempo que la cadena de DNA negativa permanece como cadena simple.

Las distintas proteínas A3 desaminan preferentemente citosinas localizadas en un contexto específico. Así, A3G muta la citosina subrayada en un contexto 5'-CCa CU en la cadena negativa, lo que provoca mutaciones 5'-GG a AG en la positiva, mientras que A3B, A3DE, A3F, A3H y A3A tienen predilección por la desaminación 5'-TCa TU, lo que causa mutaciones 5'-GA a AA en la cadena positiva; A3DE también muta 5'-GCa GU, que da lugar a mutaciones 5'-GC a AC (Zheng et al., 2012). Los tres tipos de mutaciones se han observado en pacientes con HIV-1, aunque aún no se ha descubierto qué proteína provoca las mutaciones 5'-GT a AT. Aunque el contexto de secuencia para mutar el DNA varía entre los A3, el mecanismo para la especificidad de la secuencia del sustrato no se conoce bien. Además de la caracterización de la secuencia de unión a ssDNA por parte de A3A, se ha estudiado la estructura específica para la unión de A3A al RNA, determinando que este se une más estrechamente al sustrato cuando se encuentra dentro de un "loop" en comparación con un oligonucleótido lineal, lo que sugiere que la afinidad de A3A está modulada por la estructura del sustrato (Silvas et al., 2018).

La actividad desaminasa está reservada a uno de los dominios en aquellas proteínas A3 con dos motivos coordinados de Zn^{+2} , excepto en el caso de A3B. Así, las proteínas A3G o A3F de humano ejercen su actividad desaminasa mediante el dominio de Zn^{+2} situado en C-terminal, mientras que el dominio N-terminal no es activo en cuanto a la actividad catalítica, sino que tiene gran afinidad por el RNA viral y determina la capacidad de empaquetamiento en los viriones (Navarro et al., 2005). Esta distribución de la actividad en los diferentes dominios Z no está generalizada en todas las proteínas A3 con dos dominios. A3Z2Z3 de artiodáctilos, homólogo a A3F humano, concentra su actividad desaminasa en el dominio N-terminal y no en el C-terminal, y además exhibe un patrón de preferencia de dinucleótidos más amplio (Jonsson et al., 2006).

Además de la actividad desaminasa descrita hasta ahora, se han observado mecanismos independientes de la actividad desaminasa en la restricción de lentivirus (Desimmie et al., 2014). A3 es capaz de bloquear físicamente la retrotranscripción impidiendo el alineamiento del iniciador de tRNA^{Lys-3} al RNA genómico por unión a la nucleocápside viral (Guo et al., 2007), reduciendo la procesabilidad de la RT en la elongación (Bishop et al., 2008) o inhibiendo la transferencia de las cadenas de DNA viral en el cebado de la retrotranscripción, que está relacionada con la capacidad de A3 para prevenir la degradación del RNA por RNAasa H en el híbrido RNA/DNA (Li et al., 2007). También se ha relacionado con el bloqueo de la integración del provirus en el genoma celular (Luo et al., 2007; Mbisa et al., 2007). Este mecanismo independiente de desaminasa ha sido cuestionado porque parece estar en relación con la cantidad de proteína presente y se ha especulado que podría ser un artefacto en los modelos de sobreexpresión de A3 (Goila-Gaur and Strebel, 2008). Sin embargo, estudios con niveles fisiológicos de A3 demuestran tanto la presencia de hipermutación en secuencias virales como la inhibición de la retrotranscripción en células T CD4+ (Chiu et al., 2005). No se conoce nada en cuanto a este mecanismo y su restricción en SRLV.

Estudios con A3G exógeno en células 293T y A3G endógeno en células T indican que existe un inhibidor de la actividad desaminasa en las células diana de los lentivirus que no está presente en las células 293T, por lo que muchos estudios podrían estar evidenciando procesos de restricción difícilmente trasladables *in vivo*. Los lisados de las líneas celulares que expresan A3G exógeno exhiben actividad desaminasa tras el tratamiento con RNAasas, que degradan los complejos inactivos HMM, mientras que la actividad desaminasa en células T CD4+ permanece casi indetectable. Los resultados sugieren que las células T expresan un factor inhibidor de la actividad desaminasa responsable de la baja hipermutación. Este inhibidor no caracterizado podría proteger el DNA del hospedador y podría tener implicaciones en la actividad antiviral de A3G *in vivo* (Thielen et al., 2007).

7.4.2 APOBEC3 y HIV

En cuanto a la interacción virus-hospedador, diferentes estudios han determinado los motivos aminoacídicos de la secuencia de A3 relevantes para el empaquetamiento en los viriones, la interacción con Vif o la actividad enzimática (Zheng et al., 2012). Aunque algunos motivos se conservan en distintas proteínas A3, también se observan diferencias. La proteína A3G se empaqueta en los viriones de HIV-

1 por medio de la interacción dependiente de RNA entre el dominio Z situado en el extremo N-terminal y el motivo 124YYxW127 de la nucleocápside vírica, motivo que también utiliza A3H (Huthoff and Malim, 2007; Khan et al., 2007; Russell et al., 2009a). El residuo triptófano (Y) 315 situado en el motivo de unión a DNA de A3G, también presente en A3F, es crucial para la actividad desaminasa, y su reemplazo por una cisteína (C) en A3DE provoca una disminución drástica de la actividad (Dang et al., 2011). Con respecto a la interacción con Vif, A3F, A3DE y A3C utilizan el motivo EFLARH aguas abajo del dominio Z activo, mientras que A3G emplea el motivo 128DPDY131 próximo al dominio Z no activo N-terminal (Russell et al., 2009b; Smith and Pathak, 2010). Estos motivos de unión a Vif podrían ser diana para nuevas terapias génicas en la lucha contra infecciones lentivirales.

La capacidad antiviral de A3 puede estar relacionada con la conformación que adopta en las células. En células T CD4+ de sangre periférica inactivas o *resting*, que son más resistentes a la infección por HIV-1, A3G se encuentra predominantemente en una forma de bajo peso molecular (*low molecular mass*, LMM) y enzimáticamente activa (Chiu et al., 2005). La estimulación de las células T CD4+ con mitógenos *in vitro* produce el reclutamiento de A3G LMM en complejos de alto peso molecular (*high molecular mass*, HMM) de 5-15 MDa en los que la actividad citosina desaminasa está inhibida, al mismo tiempo que aumenta la permisividad a la infección. Además, Vif se une a A3G presente en los complejos HMM y lo poliubiquitina induciendo su degradación. El tratamiento de A3 HMM con RNAsa A libera las formas LMM activas, lo que manifiesta la naturaleza ribonucleoproteica de los agregados HMM. Las células T CD4+ inactivas de órganos linfoides, en cambio, son permisivas a la infección (Eckstein et al., 2001) y precisamente A3G se encuentra en complejos HMM inducidos por el ambiente de citoquinas presente (Kreisberg et al., 2006). De la misma manera, la resistencia o la permisividad a la infección de monocitos y macrófagos, se relaciona con la presencia de las formas LMM o HMM de A3G, respectivamente (Chiu et al., 2005; Sonza et al., 1996). Pese a todas estas evidencias, no se ha demostrado una relación directa entre A3G y la restricción de HIV-1 en las células T CD4+ inactivas, ya que el silenciamiento del RNAm de A3G o la supresión de la proteína mediante la expresión de Vif en estas células, no revierte la resistencia a la infección (Kamata et al., 2009; Santoni de Sio and Trono, 2009). La conformación de A3 incorporado en los viriones o *passenger* puede formar complejos HMM, puede encontrarse como LMM liberado de complejos HMM o ser proteína A3 de nueva síntesis en forma de LMM. Se ha determinado que la proteína A3G de los viriones de HIV-1 es de nueva formación y que la interacción con el RNA viral

inhibe su actividad, activándose en la célula durante la retrotranscripción al degradarse el RNA por acción de la RNAasa H (Soros et al., 2007).

7.4.3 Neutralización mediante Vif viral

Todos los lentivirus, excepto EIAV, han evolucionado expresando la proteína accesoria Vif que contrarresta la acción antiviral de las proteínas A3 celulares. Vif induce la poliubiquitinación y posterior degradación vía proteasoma de A3 mediante el secuestro del complejo E3 ubiquitina ligasa, compuesto por la proteína de andamiaje Cullin5 (Cul5), las elonginas B y C (EloB y EloC), la subunidad 2 RING-box (RBX2) y la enzima conjugadora E2 (Yu et al., 2003). La interacción entre Vif y el complejo E3 ubiquitina ligasa se produce mediante tres motivos ubicados en el extremo C-terminal de la proteína accesoria: el motivo de Zn HCCH (108Hx5Cx17-18Cx3-5H139) se une a Cul5 (He et al., 2008; Luo et al., 2005; Xiao et al., 2007), 144SLQYLA149 del dominio BC-box a EloC y el motivo 161PPLP164 a EloB (Bergeron et al., 2010; Stanley et al., 2008; Yu et al., 2004). Además, 161PPLP164 también determina la dimerización de Vif y la interacción con A3G. Los motivos de unión a A3 están distribuidos en la región N-terminal, concretamente YRHHY para A3G y DRMR para A3F (Schrofelbauer et al., 2006). El estudio de estos motivos, que son críticos para la interacción entre A3, Vif y el complejo E3 podría originar nuevas terapias antivirales.

Además, se ha descrito que el cofactor CBF- β es necesario para facilitar la interacción Vif-Cul5 y producir la degradación de A3 vía proteasoma en humanos (Jager et al., 2011; Zhang et al., 2011). Además, CBF- β se une a miembros de la familia de factores de transcripción RUNX, mejorando la afinidad de unión al DNA (Tahirov and Bushweller, 2017) potencialmente en beneficio del virus. Vif secuestra a CBF- β por dos motivos. En primer lugar ayuda a la estabilización del complejo E3 ubiquitina ligasa para degradar A3 y además se requiere para la expresión de éste, ya que RUNX se une a CBF- β regulándolo a nivel transcripcional. Los niveles de infección de HIV-1 Δ Vif aumentan en células que carecen de CBF- β , lo que demuestra la importancia de CBF- β en el estado antiviral mediado por A3. Esto sugiere que los lentivirus de primates han evolucionado para secuestrar dicho cofactor con el fin de suprimir A3 (Anderson and Harris, 2015). Además de la degradación de A3G, la degradación de otros miembros de la familia A3 mediada por Vif, también requiere CBF- β .

Sin embargo, CBF- β es completamente prescindible para la actividad de Vif de lentivirus no primates, incluidos SRLV, FIV y BIV (Hultquist et al., 2012; Jager et al.,

2011; Zhang et al., 2011). Kane y colaboradores en un estudio proteómico comparativo de Vif de todos los lentivirus, demuestran que los lentivirus no primates necesitan otro cofactor para la formación del complejo. En el caso de lentivirus ovinos y caprinos se ha descrito Ciclofilina A (CYPA) como el cofactor necesario para reclutar el complejo ubiquitín ligasa y degradar A3 (Kane et al., 2015). Después de identificar CYPA como un miembro del complejo E3 ubiquitín ligasa (**Figura 12**), se han identificado los dominios esenciales para la degradación de A3 ovino, situados entre los aminoácidos P21 y P28. De hecho, mutantes en estas regiones, reducen la degradación de A3Z2Z3. Más allá de los aislados de VMV, Vif de CAEV, también utiliza CYPA para degradar A3. (Yoshikawa et al., 2016).

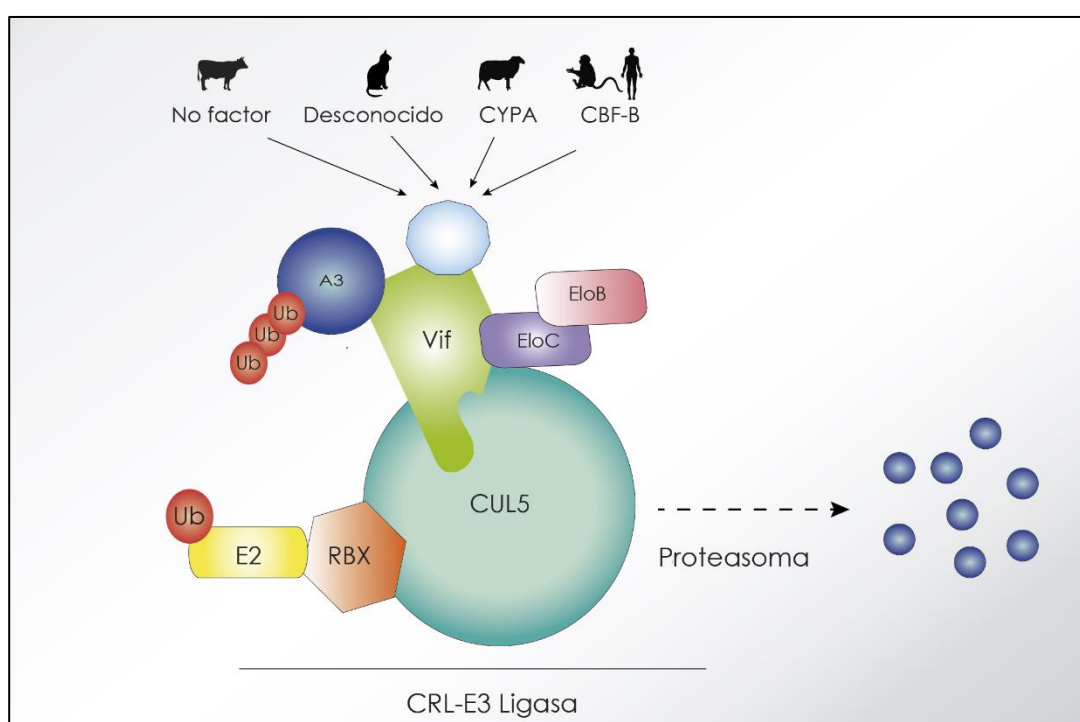


Figura 12. Formación del complejo E3 ubiquitina ligasa. Representación de los factores celulares utilizados por Vif para la formación del complejo CRL-E3 ligasa para la degradación de APOBEC3.

La acción de Vif como supresor de la actividad antiviral de A3 es altamente específica de especie, es decir, generalmente la proteína Vif de un virus concreto puede inhibir A3 de su hospedador natural, pero no el de otras especies. Así, A3G de humanos es inactivado por Vif de HIV-1 pero no por Vif de SIV aislado del mono verde africano (Mariani et al., 2003). Sin embargo, Vif de SIV aislado de macaco rhesus es más promiscuo y es capaz de inhibir A3G de distintas especies. En esta misma línea, LaRue y colaboradores observaron que Vif de ciertos lentivirus, entre ellos los SRLV, inhibe la

actividad antiviral de A3 de su propia especie y de otras, aunque la eficacia es mayor frente a A3 de su hospedador (Larue et al., 2010).

La reducción de A3 producida por Vif suele ser mayor en los viriones que en las células productoras, lo que sugiere que Vif es capaz de bloquear la encapsidación de A3 por mecanismos independientes de la degradación (Kao et al., 2007). Aunque existen evidencias del bloqueo de A3 en ausencia de inducción de degradación vía proteasoma, no se ha descifrado aún el mecanismo de acción (Kao et al., 2007; Opi et al., 2007).

7.4.4 Evolución de los lentivirus

La diversificación de la población viral y la continua adaptación a su hospedador son acontecimientos que garantizan el éxito de la supervivencia de los lentivirus. Este hecho es resultado de la combinación de distintos factores: la amplia población viral infectante en *quasi*-especies, la alta tasa de replicación y de mutación, los eventos de recombinación y la presión selectiva por parte del hospedador (Rambaut et al., 2004). La alta tasa de mutación se atribuye principalmente a la baja fidelidad de la RT, aunque también se ha propuesto que podría deberse a mutaciones sub-letales inducidas por las proteínas A3 (Neogi et al., 2013; Noguera-Julian et al., 2016; Sadler et al., 2010). Se podría incluso especular con la posibilidad de que Vif actúe como regulador del nivel total de mutaciones y por ello interactúa con algunas proteínas A3.

Entre las distintas proteínas A3 que se han estudiado, se considera que las más relevantes respecto a la actividad antiviral frente a HIV son A3DE, A3F y A3G, siendo A3G la más restrictiva de las tres (Chaipan et al., 2013; Refsland et al., 2012). La mayor parte de las investigaciones se realizan en células T CD4+ ya que HIV es un lentivirus fundamentalmente linfotrópico. Los lentivirus animales como los SRLV, BIV y EIAV infectan macrófagos pero no linfocitos, por lo que el repertorio de proteínas A3 y su mecanismo de acción pueden ser distintos en células mieloides comparado con el de células T.

Las proteínas A3 se expresan de manera específica dependiendo del tipo de tejido y célula (Refsland et al., 2010). A3G se expresa en gran medida en linfocitos T CD4 + y células mieloides, mientras que la expresión de A3A es bastante específica para las células del linaje mieloides (Sharma et al., 2015). A3A es la única enzima A3 que puede restringir la infección directamente en las células diana donde se expresa de forma endógena (Berger et al., 2011; Sharma et al., 2015). Aunque más complicado desde un punto de vista técnico, el estudio de las proteínas A3 en células mieloides puede, no sólo

ayudar a entender la respuesta innata en su globalidad, sino también a vislumbrar nuevas estrategias de lucha contra los lentivirus.

- A3A

La expresión de A3A, que decae durante la maduración de monocitos a macrófagos, tiene un papel relevante en la restricción de la fase temprana de la infección por lentivirus en monocitos (Conticello et al., 2005; LaRue et al., 2008). A pesar de presentar una actividad débil frente a HIV (Goila-Gaur et al., 2007), A3A, que posee un único dominio desaminasa agrupado en el clúster filogenético Z1, restringe al virus T-linfotrópico tipo 1 humano (HTLV-1) mediante desaminación (Ooms et al., 2012) y causa hipermutaciones G → A en el genoma del Papilomavirus humano (Vartanian et al., 2008), del virus herpes simplex 1 y Epstein Barr (Suspene et al., 2011b). Inhibe también retrotransposones (Bogerd et al., 2006; Richardson et al., 2014), la replicación de parvovirus adeno-asociados, sin necesidad de la actividad desaminasa (Chen et al., 2006; Narvaiza et al., 2009) y virus de la hepatitis B mediante desaminación (Abe et al., 2009; Lucifora et al., 2014). Además, A3A se ha relacionado con la inducción de la respuesta de daño de DNA (Green et al., 2016; Landry et al., 2011) y la destrucción de DNA de doble cadena foráneo mediante desaminación (Stenglein et al., 2010).

A3A puede hipermutar el DNA celular (Suspene et al., 2011a), hecho que podría tener relevancia en procesos patológicos como la inestabilidad genómica o el desarrollo de cáncer. Las mutaciones en el DNA celular pueden ser reparadas mediante el mecanismo *base excision repair* o provocar apoptosis (Mussil et al., 2013). En el caso de que la hipermutación no conlleve la muerte celular, podrían fijarse mutaciones en el genoma. En algunos tipos de cáncer se han identificado regiones que concentran transiciones C→T focalizados en el dinucleótido TC conocidas como *Kataegis* (Nik-Zainal et al., 2014; Taylor et al., 2013), compatible con el contexto de desaminación de A3A. Una expresión de A3A continua, como puede darse bajo la inducción por IFN-α o IFN-γ en inflamaciones crónicas, podría provocar estos daños en el DNA. El papel de A3A en el catabolismo del DNA es conocido y está conservado en las proteínas ortólogas de monos, bovinos, ovinos, equinos, perros y pandas, manteniendo la capacidad para mutar el DNA nuclear e inducir la ruptura de la doble cadena de DNA (Caval et al., 2014). A3A se ha implicado en la edición de mRNA, concretamente en transcritos de la proteína Wilms Tumour 1, ampliando las funciones de la familia APOBEC3 y su posible relación

con el cáncer (Niavarani et al., 2015). También se ha analizado la sobre expresión de A3A en queratinocitos y el cáncer de piel (Pham et al., 2013), las mutaciones producidas por A3A y determinados tipo de cáncer de mama (Taylor et al., 2013), y en mutaciones de carácter hereditario mediante mutagénesis (Seplyarskiy et al., 2017).

Se ha observado que la expresión de A3A está confinada a la línea monocito/macrófago, siendo alta en órganos que tienen un número elevado de estas células, como son el pulmón o el bazo, y que además su expresión está positivamente regulada por IFN- α (Koning et al., 2009; Mohanram et al., 2013; Peng et al., 2006). El tratamiento de BDM con esta citoquina inhibe la infección por HIV-1, aunque en un principio se dio más relevancia a la restricción por A3G. Ya en los años 80 se constató que la maduración de monocitos a macrófagos iba acompañada de un aumento en la susceptibilidad a la infección por lentivirus y un incremento de la expresión de genes virales, aunque no se conocía el mecanismo subyacente (Gendelman et al., 1986; Narayan et al., 1983). En el año 2007 Peng y colaboradores demostraron que este hecho se acompañaba de una disminución en la expresión de A3G y A3A. El silenciamiento de A3A en monocitos con el consiguiente bloqueo de la resistencia a HIV-1 terminó de correlacionar la susceptibilidad a la infección y la expresión de A3A (Peng et al., 2007). La polarización de macrófagos derivados de monocitos a M1 *in vitro* restringe el ciclo viral tanto antes como después de la integración de HIV-1, probablemente debido a la expresión de A3A (Cassetta et al., 2013).

- *Mecanismos de acción específicos de A3A*

En humanos se expresan dos isoformas de A3A distintas, la proteína nativa y una comenzando en la metionina 13, que muestran actividad desaminasa en el dinucleótido TC y no CC *in vitro* (Thielen et al., 2010). La restricción está acompañada de acumulación de DNA viral, lo que sugiere que A3A interfiere en algún paso temprano de la retrotranscripción. Además, se observa un nivel bajo de nucleótidos editados, que refuerza la idea de que la inhibición no se da exclusivamente por la actividad enzimática. Así, podría no ser el A3A de la célula productora o *passenger* el que está restringiendo la replicación viral, sino el A3A presente en la propia célula diana, o *cellular*, el que inhibe el virus entrante (Berger et al., 2011) (**Figura 13**). Otros autores también han destacado la importancia de A3A *cellular* usando BDMs estimulados con IFN- α , mostrando, sin embargo, un nivel bajo de mutaciones mediadas por A3A (Koning et al., 2011).

Esta restricción por A3A *cellular* se da mediante mecanismos independientes de la actividad desaminasa, ya que proteínas truncadas carentes del dominio citidín desaminasa siguen manteniendo su poder antiviral (Katuwal et al., 2014). Investigaciones realizadas en modelos *in vivo* apuntan también en esa dirección. Ratones transgénicos que expresan A3A o A3G humano restringen la infección por retrovirus murinos, mediante distintos mecanismos. A3G se incorpora en los viriones, produce desaminación en el genoma de los retrovirus y su acción es inhibida por Vif de HIV, mostrando una clara actividad *passenger*. A3A, en cambio, no se introduce en los viriones y media la restricción cuando se expresa en las células diana y la tasa de mutaciones en el DNA viral es baja, actividad *cellular* (Stavrou et al., 2014).

Se ha especulado que la baja actividad de A3A *passenger* frente a HIV-1 carente de Vif se debe a su baja tasa de incorporación dentro de la nucleocápside durante la maduración del virus (Goila-Gaur et al., 2007). Proteínas de fusión entre el dominio N-terminal de A3G o la proteína accesoria Vpr con A3A, han conseguido aumentar la actividad restrictiva de A3A (Aguiar et al., 2008). La región AC-loop-1 situada en los primeros 30 amino ácidos del dominio N-terminal de A3A ha sido identificada como una secuencia importante en la restricción de lentivirus de especies distintas al hospedador natural. A3A de macaco Rhesus es capaz de restringir HIV1ΔVif y SIVΔVif en mayor medida que A3A de humano (Schmitt et al., 2011). En la construcción de proteínas quiméricas, la sustitución de 25-33 aminoácidos de A3A de Rhesus en A3A humano, fue suficiente para restringir HIV1ΔVif a niveles de restricción de A3A de Reshus de SIVΔVif (Schmitt et al., 2013).

Recientemente, se ha descrito un papel inesperado de A3A en la prevención de la reactivación de HIV-1 y en el mantenimiento del estado de latencia. Se ha visto que A3A suprime la reactivación de HIV-1 al reclutar enzimas modificadoras de la cromatina, KAP1 (Trim28) y HP1 (*heterochromatin protein-1*), para producir marcas represivas en la región promotora 5' LTR. La sobreexpresión de A3A en líneas celulares con infección latente lleva a una mayor latencia, mientras que la eliminación de A3A reactivó la replicación viral. La identificación de los factores del huésped que controlan la latencia de HIV-1 puede arrojar pistas para las dianas terapéuticas necesarias para eliminar el reservorio viral del paciente infectado (Taura et al., 2019). En un reciente estudio se ha descrito como la red de interacciones de A3A a un complejo de chaperonas TriC / CCT (TCP-1 en anillo o chaperonina que contiene TCP1). Este complejo regula la actividad del A3A, produciéndose un aumento de la actividad mutacional de A3A si se desestabiliza el complejo (Green et al., 2019).

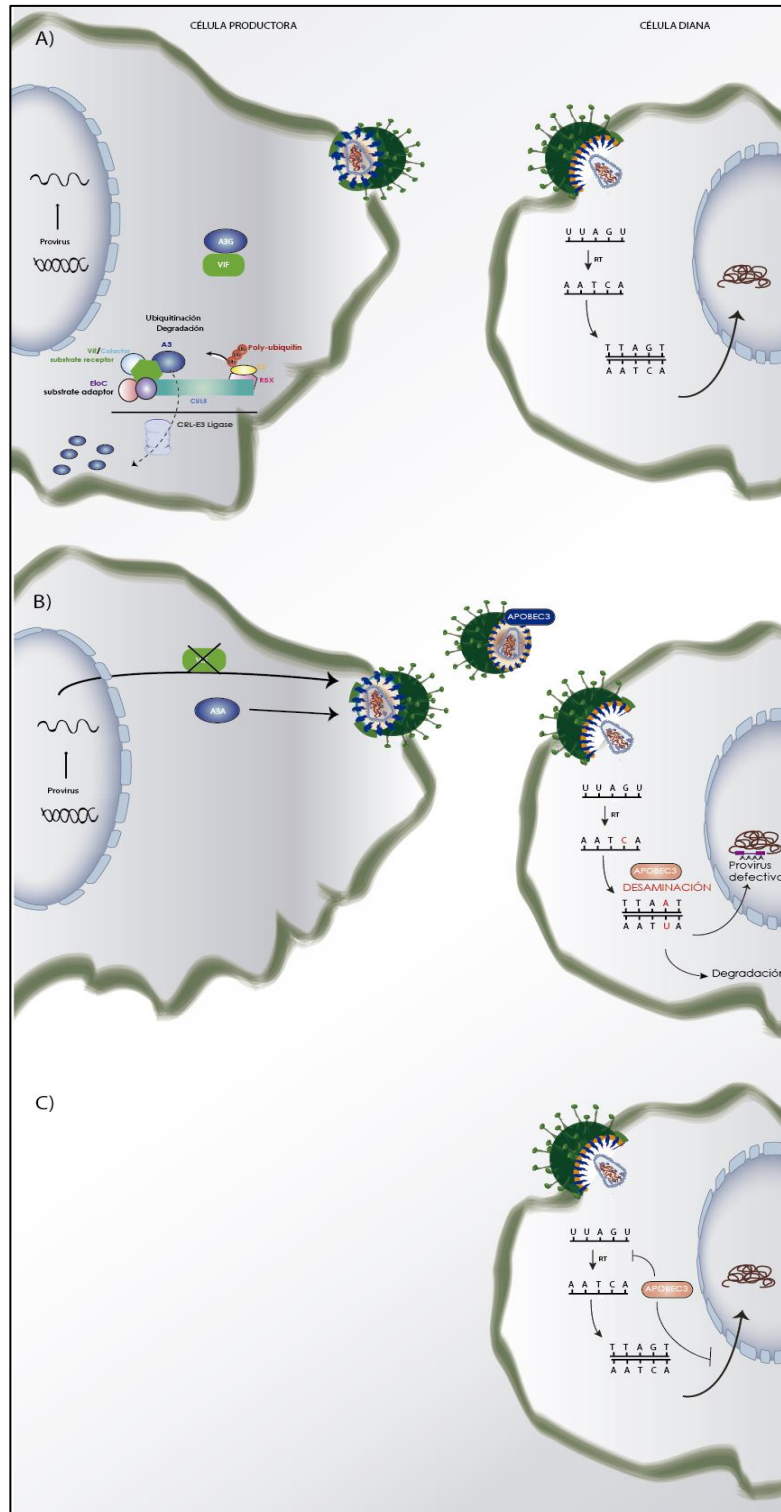


Figura 13. Mecanismos de acción de APOBEC3 y neutralización por Vif. A) APOBEC3G es secuestrado por Vif y degradado vía proteasoma en la célula productora, dando una infección productiva en la célula diana. B) APOBEC3A es incorporado en los viriones de nueva formación en la célula productora, APOBEC3 *passenger*, provocando hipermutaciones o la degradación del DNA proviral en la célula diana mediante desaminación. C) APOBEC3A *cellular*, de la propia célula diana inhibe diferentes puntos de la retrotranscripción o la integración mediante mecanismos independientes de desaminación.

7.4.5 APOBEC3 ovino

Los ovinos presentan tres genes APOBEC3 que codifican cuatro proteínas, A3Z1, A3Z2, A3Z3 y A3Z2Z3, todas ellas con actividad DNA citosina desaminasa (LaRue et al., 2008). En estudios filogenéticos y localización subcelular, se ha visto que A3Z1 corresponde a A3A, A3Z3 corresponde a A3H y A3Z2Z3 corresponde a A3F y A3G (Jonsson and Andresdottir, 2013).

En cuanto a la capacidad de los distintos A3 ovinos para inhibir la replicación de lentivirus, el más estudiado ha sido A3Z2Z3. Las proteínas ovinas A3Z2Z3, con doble dominio Z presentan actividad desaminasa en el dominio N-terminal. La expresión de A3Z2Z3 mediante transfección en células en cultivo restringe HIV-1, MLV y SRLV carentes de Vif (Jonsson et al., 2006; Kane et al., 2015; Larue et al., 2010). Esta restricción se puede atribuir tanto a mecanismos dependientes como independientes de la actividad desaminasa, ya que mutantes sin actividad desaminasa conservan una actividad antiviral significativa. Mientras que las proteínas A3 restringen un amplio rango de retrovirus y retroelementos, las proteínas Vif virales suelen contrarrestar la actividad antiviral de A3 de su propia especie, aunque pueden darse excepciones, ya que Vif de SRLV parece ser efectivo al degradar no sólo A3Z3 ovino sino también su homólogo en humanos, macacos, bovinos y gatos. Vif de BIV, en cambio, sólo es capaz de neutralizar A3Z3 de bovinos (Larue et al., 2010).

A pesar de su función conservada, los factores celulares requeridos para la degradación de APOBEC3 por los lentivirus son diversos. Vif de HIV-1 secuestra Cull5, *ElonguinB / C* y CBF- β para neutralizar A3 humanas (Jager et al., 2011; Zhang et al., 2011), mientras que Cull2, ELOB / C y RBX1, pero no CUL5 o CBF- β , son los utilizados por BIV (Zhang et al., 2014b). Vif de SRLV ha demostrado que neutraliza tanto A3Z2Z3 y A3Z3 ovino (Larue et al., 2010) reclutando Cul5 para facilitar su degradación en el proteasoma. Además, CBF- β no tiene efecto en la actividad de SRLV Vif (Ai et al., 2014; Kane et al., 2015). En cambio, requieren CYP A para forman el complejo estable de degradación llamado CRL (Kane et al., 2015; Yoshikawa et al., 2016). CYP A se une directamente a los residuos P21 y P24 de Vif manteniendo la estabilidad del complejo Vif-ELOB/C cumpliendo un papel análogo a CBF- β en HIV-1 (Kane et al., 2015). Mientras que solo el residuo P21 de Vif contribuye a su interacción con CYP A, en concreto con el motivo de dedo de zinc (C132-C134-C154-C157), P24 mediante su dominio hidrofóbico (141IR142), es necesario para reclutar a Cul5. Vif de SRLV carece del motivo HCCH de unión a Cul5 (Luo et al., 2005) aunque es capaz de inmunoprecipitar Cull5 para

degradar A3Z2Z3 vía proteasoma (Zhang et al., 2014a). En un estudio reciente se ha descrito que la secuencia en la proteína Vif de CAEV para reclutar ElonginB / C implica el motivo SLE (170SLE172) y que los residuos Y39 y L44 de CAEV Vif contribuyen a su interacción con A3Z2Z3 ovino (Zhao et al., 2019).

Esparza-Barquer y cols. han analizado los polimorfismos en dos poblaciones de ovinos, mostrando que en los genes A3Z2 y A3Z3 no existen polimorfismos; sin embargo, en el gen A3Z1 se han encontrado 16 polimorfismos y una delección de tres nucleótidos, que podrían ser resultado de la presión evolutiva ejercida por la infección con retrovirus. Este hecho podría indirectamente manifestar una interacción entre A3Z1 y lentivirus *in vivo*, sugiriendo una mayor importancia de la restricción por A3Z1 (Esparza-Baquer et al., 2015).

En pequeños rumiantes, la proteína A3Z1 análoga a A3A ha sido propuesta como marcador de macrófagos M1 resistentes a la infección por SRLV tras la estimulación con IFN- γ (Crespo et al., 2013). Así, A3A en humanos y A3Z1 en ovinos podrían ser factores de restricción importantes en la resistencia de los monocitos y su ausencia podría justificar la permisividad de los macrófagos, que actuarían como reservorio de la infección (Glaría, 2015).

8. Vacunación

El historial de vacunación frente SRLV comienza con los primeros intentos de administrar el virus completo inactivado por diferentes métodos, como calor, formalina o polietilenimina, en ausencia de adyuvantes, con adyuvante incompleto o completo de Freund o con hidróxido de aluminio. Estas formulaciones no confirieron protección tras el desafío, de hecho la alta producción de anticuerpos empeoró la artritis inducida por lentivirus (Cutlip et al., 1987; McGuire et al., 1986). Tras los ensayos con virus inactivados, se ensayaron diferentes proteínas recombinantes de SRLV. En un primer intento, la utilización de Env de CAEV en complejos inmunoestimuladores generaron una alta producción de anticuerpos frente a un CAEV heterólogo; sin embargo, no se evaluó la protección tras desafío *in vivo* (Kemp et al., 2000). Tras este ensayo, Gag de CAEV se utilizó para inmunizar, dando respuestas más fuertes en los animales vacunados, aunque con mayor carga proviral en comparación con los control en las etapas iniciales tras la infección experimental (Nenci et al., 2007). Los anticuerpos neutralizantes descritos en la literatura reconocen motivos presentes en la proteína Env y se han descrito mutantes de escape a la neutralización (Haflidadottir et al., 2008;

Laakso et al., 2007). La presencia de anticuerpos neutralizantes no siempre se ha relacionado con protección en experimentos de vacunación. Por ejemplo, en ensayos de inmunización con env se han detectado tras dos meses en el grupo control y no así en el vacunado (Gonzalez et al., 2005). Su producción puede ser además irregular tras una infección experimental (Andresdottir et al., 2002), por lo que no está claro su papel en la infección o en la protección.

También se han evaluado virus atenuados de SRLV obtenidos mediante la eliminación de genes seleccionados, principalmente *vif* y *tat*. La inmunización con Δvif no confiere protección, a pesar de una producción significativa de anticuerpos (Harmache et al., 1996). También se observan cambios histopatológicos en las articulaciones de animales inmunizados con Δtat CAEV Cork, a pesar de que el virus es indetectable (Harmache et al., 1998). Un clon molecular de baja patogenicidad, diferenciándose en 1% en la secuencia nucleotídica de un clon patógeno, muestra respuestas bajas de anticuerpos (Torsteinsdottir et al., 1997), con lesiones más leves en animales inmunizados, lo que sugiere una carga viral disminuida en comparación con los animales control (Petursson et al., 2005). La inmunización con virus naturalmente atenuados como la estirpe Roccaverano del genotipo E, carente de *vpr-like* y *dUTPase*, induce una respuesta de anticuerpos y linfoproliferativa específica de genotipo, pero una respuesta citotóxica principalmente dirigida frente a virus heterólogos y patogénicos como CAEV-Cork tras la infección experimental (Reina et al., 2011b).

La inmunización con plásmidos DNA induce respuestas humorales y celulares contra múltiples infecciones en diferentes hospedadores. Cheevers y colaboradores (Cheevers et al., 2001) obtuvieron resultados prometedores usando plásmidos *env* y *tat* junto con plásmidos que codifican IFN- γ caprino, mostrando una respuesta de anticuerpos y una menor carga proviral en los animales vacunados. Sin embargo, los animales vacunados no fueron protegidos frente a la infección (Cheevers et al., 2003). Env de VMV (estirpe Ev1) se administró en presencia de plásmidos conteniendo IFN- γ a ovejas en la mucosa vaginal utilizando pistola de genes, desarrollando una respuesta inmune protectora no duradera (Gonzalez et al., 2005). La inmunización de las mucosas del tracto respiratorio, utilizando complejos de complejos de DNA- polietilenimina PEI en la primera inmunización y un recuerdo con virus Vaccinia Ankara modificado expresando Gag y Env de VMV dio como resultado el desarrollo de respuestas humorales y celulares débiles, lográndose una disminución de la carga proviral en animales inmunizados con Env (Reina et al., 2008a). Alternativamente, cuando los genes *env* y *gag* fueron administrados por bombardeo epidérmico utilizando la misma

estrategia de inmunización y refuerzo, las respuestas inmunes celulares y humorales se hicieron más fuertes en comparación con las obtenidas con la administración de complejos PEI y comparable a los obtenidos después de la administración de la pistola génica en vaginal mucosa (Niesalla et al., 2009). La inclusión de plásmidos que codifican moléculas coestimuladoras junto con genes *gag* y *env*, desarrollaron respuestas inmunitarias mejoradas con la inserción de moléculas B7, detectándose virus únicamente en la mitad de los animales inmunizados, sugiriendo la eliminación de la infección (de Andres et al., 2009). También se ha evaluado un Vaccinia recombinante que expresa Env de CAEV induciendo una alta producción de anticuerpos, pero incapaces de proteger frente al desafío, con lesiones que fueron tan evidentes en los animales vacunados como en los controles (Cheevers et al., 2000). Sin embargo, a la hora de valorar la protección frente al desarrollo de signos microscópicos, se encontraron incluso en aquellos animales libres de virus, sugiriendo que la respuesta proliferativa e infiltrativa en los tejidos diana obedece a una respuesta efectiva y no a signos de la enfermedad. Además del huésped natural, también se han utilizado modelos de inmunización en murino, con plásmidos expresando la proteína Gag completa o sus subunidades p16 o p25 induciendo la producción de anticuerpos (Henriques et al., 2007).

Además del empleo de vacunas recombinantes, se han empleado vectores virales pseudotipados, basados en retrovirus como MLV o HIV con Env de SRLV se han probado *in vitro*, (Zeifelder and Bosch, 2001). Por último, una vacuna lentiviral frente HIV dirigida por LTR de CAEV, alcanzando altos niveles de expresión e induciendo altas respuestas de IFN- γ en ratones y macacos (Arrode-Bruses et al., 2012).

La inducción de respuestas innata no se ha evaluado y podría inducir respuestas potentes mediante la expresión de factores de restricción lentivirales.

9. Virus Sendai como vector en estrategias de vacunación

El virus Sendai (SeV), también conocido como virus parainfluenza murino, provoca una enfermedad respiratoria muy contagiosa que afecta a ratones, hámsters, ratas, cobayas y ocasionalmente cerdos. Forma parte del género *Respirovirus* de la familia *Paramyxoviridae* compuesta por el virus del sarampión (MeV), virus de las paperas (MuV), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus parainfluenza (PIV), virus sincitial respiratorio (RSV) y Nipah virus (Lamb and Kolakofsky, 1996). Los ratones afectados presentan una capa de pelo áspera, formación de costras en los ojos,

disnea, mortalidad en adultos, pérdida de peso y resorción fetal en animales gestantes. Su presencia era frecuente en ratones y ratas comerciales sin embargo actualmente parece estar eliminado (McInnes et al., 2011). Aunque SeV causa enfermedad en roedores, no consta que sea patógeno para los humanos o los rumiantes.

Los miembros de la familia *Paramyxoviridae* son virus recubiertos de membrana, cuyo genoma está compuesto por RNA monocatenario de sentido negativo. Este RNA se encuentra en una nucleocápside helicoidal bastante rígida, asociado a otras proteínas como la RNA polimerasa. La envoltura que rodea la nucleocápside es una membrana lipoproteica, formada por una bicapa lipídica que deriva de la membrana plasmática de la célula hospedadora. Dicha membrana lipídica contiene al menos dos glicoproteínas con forma de espícula, la proteína F o proteína de fusión y las proteínas de unión al receptor hemaglutinina-neuraminidasa o HN (Bowen and Lyles, 1981; Rott et al., 1963).

9.1 Genes y proteínas

El genoma de SeV está compuesto por una región líder 3' de aproximadamente 50 nucleótidos seguida por 6 genes en el orden 3' - (líder) -N-P-M-F-HN-L- (tráiler) -5. La región 5' de unos 50-161 nucleótidos, es esencial para la transcripción y la replicación de las proteínas accesorias y de las seis proteínas estructurales: las dos glicoproteínas de la superficie (HN y F), las tres proteínas de la nucleocápside (N, P, L) y la proteína M (**Figura 14**). Los RNAm monocistrónicos son transcritos por la RNA polimerasa viral, sin embargo, el gen P es excepcional porque da lugar a múltiples especies de proteínas mediante procesos de edición de RNA y mediante el uso de un marco de lectura abierto superpuesto. Los seis genes no se transcriben en la misma proporción, ya que la frecuencia de la transcripción inicial es imprecisa y depende de la identidad de la secuencia de inicio de la transcripción (Kato et al., 1999). Esto resulta en un gradiente de transcripciones de RNAm que se producen con la siguiente proporción: $N > P > M \geq F > HN > L$. Entre cada gen existe una región intergénica (GUU) y una secuencia de inicio de transcripción, por consiguiente, cuando se inserta un gen exógeno en el genoma, se ha de tener en cuenta la posición en que se coloca el inserto para determinar la expresión (Tokusumi et al., 2002). SeV depende de la "regla de seis", que especifica que el genoma viral debe ser de longitud hexámera para replicarse eficientemente (Calain and Roux, 1993).

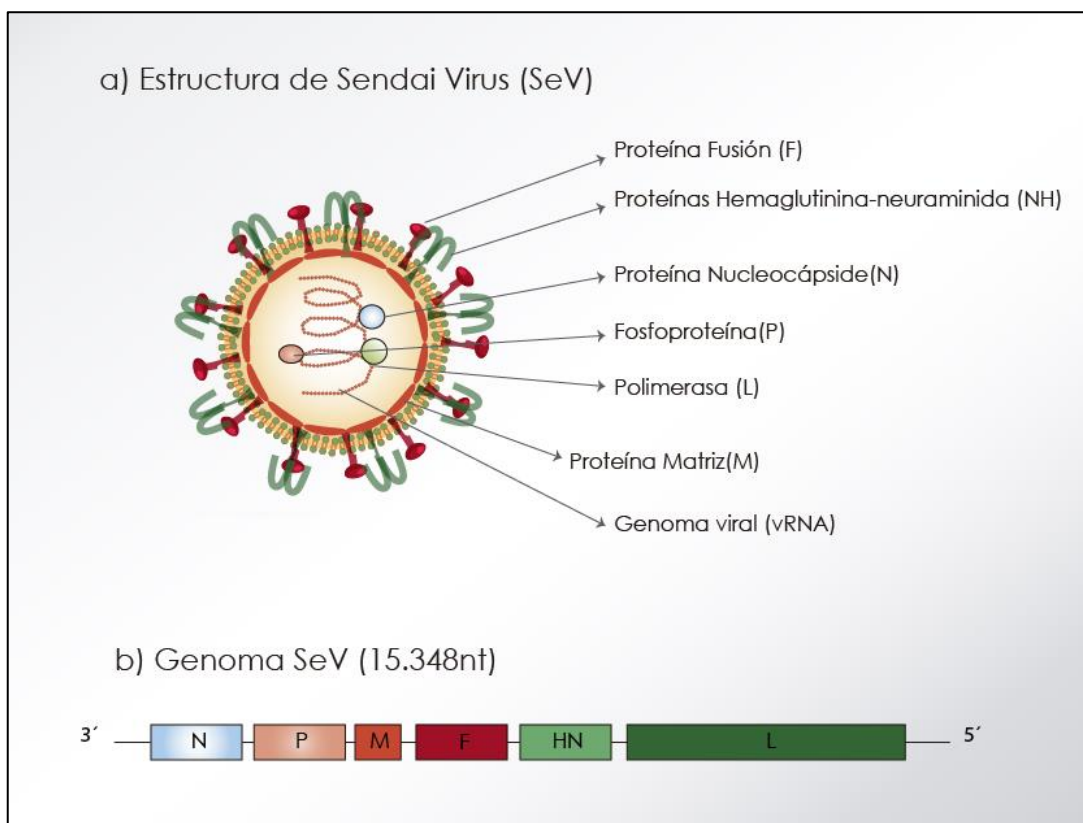


Figura 14. Estructura y genoma del virus Sendai. A) Virión de Sendai junto con sus principales componentes, entre ellos la cadena de RNA monocatenario, las proteínas de membrana F y NH, nucleocápside N; fosfoproteína P, polimerasa L y la proteína matriz (M). **B)** Genoma del virus Sendai mostrando los genes N, P, M, F, HN y L.

- a) Proteínas de nucleocápside **N, P, L**: la nucleoproteína N (45 kDa) es la principal proteína de la nucleocápside. Se localiza junto con las proteínas P (fosfoproteína) y L (RNA polimerasa) para formar el complejo de ribonucleoproteína (RNP), representado la unidad de replicación mínima para los Paramyxovirus. La proteína L (250kDa) es una RNA polimerasa responsable de la transcripción del genoma viral (Ogino et al., 2005). La fosfoproteína P (33 kDa) es una proteína altamente fosforilada en residuos de serina que, mediante la interacción con las proteínas N y L, promueve la formación del RNP, esencial para la transcripción y la replicación del RNA viral (Grosfeld et al., 1995).
- b) Proteína de matriz **M**: la proteína de la matriz M (45Kda) forma una capa en la cara interna de la envoltura. Es una proteína no glicosilada con un dominio hidrofóbico en la mitad C-terminal que ejerce como un elemento central organizador de la morfogénesis viral, a través de interacciones con las colas citoplásmicas de

glicoproteínas de la envoltura, la bicapa lipídica y la nucleocápside (Henderson et al., 2002; Marty et al., 2004).

- c) Glicoproteínas de la envoltura **HN** y **F**: SeV contiene dos glicoproteínas de membrana integradas dentro de la envoltura lipídica: la proteína de fusión (F) y la hemaglutinina-neuraminidasa (HN). F y HN son proteínas con ectodominio que se proyectan como picos perpendicularmente desde la superficie de la envoltura viral. Durante la entrada del virus, la proteína HN se une a ácido siálico, desencadenando cambio de pH y replegamiento causando la fusión con la membrana de la célula huésped (Lamb and Jardetzky, 2007; Russell et al., 2001). Todos los Paramyxovirus poseen una proteína de fusión que media la fusión de las membranas virales y celulares durante la entrada del virus (Russell and Luque, 2006).
- d) Proteínas accesorias **V** y **C**: SeV codifica dos proteínas accesorias, V y C, en los marcos de lectura alternativos del gen P (Lamb and Kolakofsky, 2001). La proteína C se traduce del marco de lectura -1 en relación con el marco de P produciendo un conjunto de proteínas, C', C, e Y con codones de iniciación alternativos (Curran and Kolakofsky, 1988; Gupta and Patwardhan, 1988). Se ha demostrado que las proteínas C tienen múltiples funciones en el ciclo viral, como la regulación de la replicación y la transcripción viral, incluida la regulación negativa de la síntesis de RNA, la inhibición de la respuesta del IFN tipo I (Curran et al., 1992; Grogan and Moyer, 2001) y la supresión de la apoptosis (Koyama et al., 2003). Además, La proteína C parece tener un papel importante en el ensamblaje viral y gemación del virus, anulándose la producción de virus en mutantes delecionados (Kato et al., 2004).

A su vez, la proteína accesoria V juega un papel esencial en la inhibición de la respuesta inmune mediante el bloqueo de la producción de tipo I y su vía de señalización. Interactúa con LGP2 y MDA5 para inhibir la vía de transducción involucrada en la activación del promotor IFN- β (Irie et al., 2012).

9.2 Ciclo de replicación

El ciclo de replicación de los Paramyxovirus tiene lugar en el citoplasma de la célula huésped. La entrada viral implica la unión del virión, gracias a moléculas de ácido siálico que sirven como receptores celulares para la proteína de membrana HN (Markwell et al., 1984a, b). La proteína de fusión F, debe catalizarse en dos subunidades ancladas por puentes disulfuro para adquirir su función biológica. Las proteasas

específicas del hospedador que se encuentran principalmente dentro del tracto respiratorio, son responsables de iniciar esa catálisis. Se cree que una serín-proteasa llamada "*Tryptase Clara*", es parcialmente responsable del tropismo respiratorio ya que es capaz de escindir la proteína viral F, activando así la entrada en la célula huésped (Tashiro et al., 1992). Tras el reconocimiento, la proteína media la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática celular y se produce la entrada de la nucleocápside en el citoplasma, donde tiene lugar la transcripción del genoma viral, que se lleva a cabo mediante la RNA polimerasa viral, generando un conjunto de mRNAs que se traducen en ribosomas celulares, de una manera secuencial desde un único promotor en el extremo 3' para generar mRNA capeados y poliadenilados. Tras la traducción de los primeros transcritos y acumulación de proteínas virales, el genoma viral se replica para producir un antígeno complementario (Calain and Roux, 1995). Finalmente, SeV emerge de la membrana plasmática de la célula huésped desde los sitios de ensamblaje correspondientes.

9.3 Tropismo e inducción de respuesta inmunitaria

Como modelo, SeV se ha utilizado ampliamente en estudios que han definido la mayoría de las propiedades biológicas, bioquímicas y moleculares básicas de los Paramyxovirus (Faisca and Desmecht, 2007), así como para identificar las proteínas del hospedador involucradas en el proceso de infección (Xu et al., 2005; Zhong et al., 2008). SeV es un excelente inductor de interferones y otras citoquinas como IL-2, IL-6 e IL-10 (Brownstein and Weir, 1987; Ertl et al., 1982), por lo que se ha empleado ampliamente en estudios sobre la respuesta inmune innata del hospedador.

El SeV se replica naturalmente en las células epiteliales respiratorias (Yonemitsu et al., 2000), además SeV puede inducir una fuerte expresión en el sistema cardiovascular, (Masaki et al., 2001), en el epitelio de la retina (Murakami et al., 2008), en los hepatocitos (Fujita et al., 2006), en el epitelio del colon (Goto et al., 2006), en neuronas (Li et al., 2000), en células dendríticas (Osterlund et al., 2005), en células madre hematopoyéticas humanas (Nishimura et al., 2011) y además se replica con altos títulos en cultivo celular y en huevos de gallina (Lida and Inoue, 2013). Este amplio rango de huésped depende en parte, de la distribución universal del ácido siálico en las células animales; también se ha sugerido la presencia de un receptor secundario ubicuo indispensable para la fusión de la membrana mediada por SeV (Eguchi et al., 2000).

Se ha descrito que las rutas de señalización de NF- κ B, IRF3 e IFN están afectadas por la infección con SeV (Elco et al., 2005; Peters et al., 2008). En un análisis proteómico en células HEK 293T infectadas con SeV se identificaron un total de 4699 proteínas, de las que 742 eran reguladas diferencialmente. Las proteínas reguladas estaban involucradas principalmente en la vía de señalización del IFN-I y en la respuesta de defensa a virus, lo que sugiere que estos procesos juegan un papel en la infección por SeV. Estudios funcionales realizados por los mismos autores, mostraron un aumento significativo de varios miembros de la familia TRIM y que pueden afectar la respuesta inmune innata inducida por SeV (Zhu et al., 2017).

RIG-I y MDA-5 responden a las especies de dsRNA y pppRNA que se generan en el citoplasma durante la replicación del RNA vírico (Hornung et al., 2006). La señalización inducida por SeV depende predominantemente de RIG-I (en oposición a MDA-5). En condiciones normales, se produce IFN- β en muy bajas cantidades durante la infección por SeV. Sin embargo, existen partículas defectivas, compuestas principalmente de genomas pequeños que ejercen como partículas defectivas interferentes (DI), se han identificado como ligando de RIG-I y que por sí solas son capaces de iniciar la cascada de activación (Strahle et al., 2006). Al mismo tiempo, la expresión independiente de la proteína C es capaz de inhibir la señalización inducida por pppRNAs o dsRNAs dependiente de RIG-I, para la transcripción de IFN- β (Strahle et al., 2007). La suplementación de la proteína C, en el contexto de la infección por SeV Δ C lleva a una reducción en el número de DI, lo que ha respaldado aún más el papel potencial de la proteína C como un regulador negativo de la generación y acumulación de DI (Sanchez-Aparicio et al., 2017).

Las DI generadas durante la replicación del virus son fuertes inductores de la maduración de las DC y de la expresión de citoquinas antivirales y proinflamatorias al desencadenar la señalización de la familia RIG-I. Las células dendríticas estimuladas con SeV que contienen DI, tienen capacidad para activar células T humanas pudiendo inducir inmunidad adaptativa en ratones. Además, un miRNA, mi324, derivado de SeV mantiene una fuerte actividad inmunoestimuladora *in vitro* e *in vivo*, a través de la inducción de altos niveles de expresión de IFN- β cuando se transfecta en las células, mejorar la producción de anticuerpos tras la inmunización intramuscular en ratones (Mercado-Lopez et al., 2013).

9.4 Vectores basados en SeV

Desde su aislamiento en Japón en 1953, el SeV ha sido utilizado como herramienta de investigación y en la industria, pero la aplicación de SeV como un vector viral recombinante a partir de cDNA genómico se estableció en la década de 1990 (Garcin et al., 1995), tras una estrategia innovadora que permitía la reconstitución del virus de la rabia a partir de cDNA en 1994, denominada genética reversa (Schnell et al., 1994). SeV tiene un genoma sencillo, con genes prescindibles para la expresión génica (F, HN y M) que permite su reemplazo con genes terapéuticos. Desde entonces, se han generado varios vectores de SeV. En la primera generación de vectores SeV, se instaló cDNA exógeno entre el extremo 3' y el gen N (Hasan et al., 1997). Estos vectores SeV eran replicativos pudiendo expresar el componente exógeno cuando se cultivaban en huevos de gallina fecundados (Moriya et al., 1998). Para aplicaciones médicas y otras aplicaciones prácticas, se desarrollaron vectores de SeV defectuosos en la replicación con supresión en el gen F (Li et al., 2000).

Los vectores SeV recombinantes tienen varias características únicas que los hace seguros en estrategias de vacunación, ya que no son tumorigénicos ni patógenos para los humanos y porque la fusión de la membrana mediada por el SeV se produce de manera eficiente con especificidad celular y de especie. SeV posee una replicación exclusivamente citoplasmática gracias a su propia RNA polimerasa sin intercalarse en el DNA genómico (Lida and Inoue, 2013), una potente capacidad para la expresión eficiente de genes de gran tamaño (> 3 kb) y la infección de un amplio rango de hospedadores, que le confiere cierta ventaja en comparación con otros vectores virales (Sakai et al., 1999). Además, se ha valorado *in vitro* e *in vivo* la infección en varios tipos celulares y hospedadores adaptando la producción a gran escala en huevos de gallina, (Lida and Inoue, 2013), abaratando los costes de producción.

El éxito de los vectores virales para inmunización depende en gran medida de la capacidad para albergar y expresar genes exógenos, una amplia capacidad para infectar células del hospedador, la baja patogenicidad y la inducción de fuertes respuestas inmunitarias. Hasta la fecha, se han examinado clínicamente vectores de SeV, en terapia génica para la isquemia crítica de las extremidades (Yonemitsu et al., 2013), en la terapia génica del cáncer y como vacuna viva atenuada.

Las aplicaciones de los vectores SeV a la terapia génica oncológica se han investigado en la etapa preclínica. Además de la estimulación de células dendríticas con el vector de SeV que expresa IFN- β (rSeV-IFN β) (Shibata et al., 2006), se han

desarrollado vectores de SeV recombinantes oncolíticos específicos de proteasas, generados por la eliminación del gen que M, reemplazo de los aminoácidos susceptibles a la tripsina del gen F con proteasas específicas; y el truncamiento del dominio citoplásmico del gen F. Como resultado, un estudio reciente demostró que el rSeV oncolítico dependiente de uroquinasas uPA (rSeV / dMFct14 (uPA2), denominado "BioKnife") mejora la actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo*, mostrando una destrucción celular específica de uPA a través de la fusión célula-célula (Kinoh et al., 2009). Se ha visto que BioKnife es eficaz en el tratamiento de cánceres intratables como los glioblastomas malignos y los mesoteliomas pleurales malignos (Morodomi et al., 2012).

SeV también ha sido utilizado en la reprogramación nuclear. El concepto de reprogramación nuclear se propuso por primera vez en la década de 1970, y se demostró mediante el descubrimiento de *MyoD*, un gen que codifica un factor de transcripción que induce la transición dinámica de los fibroblastos a los mioblastos (Davis et al., 1987). La reprogramación de los fibroblastos de la piel en células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) mediante la expresión ectópica de cuatro factores de reprogramación (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc) abrió una nueva era en este campo. Se creó un vector SeV adecuado para generar iPSCs (SeV-iPSCs) eliminando los genes M, F y HN prescindibles para la expresión génica e instalando cuatro genes de reprogramación en su lugar (Fusaki et al., 2009). Este vector está disponible comercialmente, CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit.

SeV también se ha utilizado como un sistema de administración para la eficiente edición de genes mediada por Cas9. La alta eficacia de la infección por el virus recombinante SeV-Cas9 da lugar a altas tasas de mutagénesis en líneas de monocitos y en cultivos primarios de monocitos humanos, sin necesidad de selección de células transducidas. Esto, junto con otros trabajos anteriores proponiendo SeV como un prometedor vector para terapia génica, abren la puerta al desarrollo de SeV como vectores para la administración eficiente de CRISPR / Cas9 sin el riesgo de integración en el genoma del huésped (Park et al., 2016).

9.5 Estrategias profilácticas y terapéuticas basadas en SeV

Los vectores de SeV son particularmente atractivos para el desarrollo de vacunas en humanos, ya que es un patógeno murino y nunca ha causado una enfermedad confirmada en humanos (Lamb and Kolakofsky, 2001), evitando la posibilidad de

revertir a su fenotipo patógeno original. Los vectores recombinantes de SeV se han investigado más intensamente como una plataforma vacunal para inducir la inmunidad de la mucosa frente virus respiratorios (Hurwitz, 2008).

SeV se investigó en un principio como una vacuna atenuada viva xenotrópica, ya que se sabía que tenía antigenicidad compartida con el virus de la parainfluenza humana tipo 1 (hPIV-1), un patógeno humano importante que causa neumonía y laringotraqueobronquitis. En los años 90, se evaluó la posibilidad de utilizar SeV como vacuna frente hPIV-1 en monos verdes africanos. SeV se administró vía intranasal induciendo una respuesta de anticuerpos específica de larga duración, sin causar síntomas clínicos aparentes. Estos resultados mostraron a SeV es una vacuna eficaz contra hPIV-1 en un modelo de primate, pudiendo constituir una vacuna práctica para uso en humano (Hurwitz et al., 1997), hecho que se confirmó en el avance un estudio clínico en el que tres dosis intranasales secuenciales de SeV *wild type*, indujeron inmunidad anti-hPIV-1 de manera efectiva sin ningún efecto adverso grave (Slobod et al., 2004). Este resultado enfatizó aún más la naturaleza no patógena de SeV para los humanos, en parte debido a la alta sensibilidad de la replicación de SeV a IFN (Bousse et al., 2006). Tras el ensayo en adultos, se ha evaluado la respuesta en niños de 3 a 6 años de edad seropositivos para hPIV1, mostrando un aumento en las respuestas de unión y neutralización de anticuerpos hacia hPIV-1 a las cuatro semanas. Los resultados alientan a las pruebas de administración de SeV en niños seronegativos jóvenes para proteger contra las enfermedades graves del tracto respiratorio causadas por infecciones por hPIV-1 (Adderson et al., 2015).

Años después se evaluó la posibilidad de utilizar SeV como componente vacunal principal para una vacuna contra el virus respiratorio sincitial (RSV), patógeno que causa infecciones graves del tracto respiratorio inferior en bebés. Los vectores producidos con el gen F o G de RSV insertado entre los genes F y HN de SeV ya han sido evaluados en ratas (Zhan et al., 2007) y se ha evaluado contra el RSV en monos verdes africanos, expresando la proteína F del RSV-subtipo A2. Tras la exposición intranasal se generan anticuerpos neutralizantes que se asocian con protección tras el desafío con RSV (Jones et al., 2012). Los anticuerpos específicos de RSV son incapaces de inhibir la vacuna SeVRSV, apoyando la validez de SeVRSV para ensayos clínicos (Jones et al., 2014).

También se ha valorado la eficacia de SeV recombinante frente al virus influenza A. El vector se produce con el gen HA como gen adicional (GP42-H1), es capaz de conferir protección total tras una inmunización intranasal en ratones, frente una

infección letal por el virus influenza, apoyando la hipótesis de vector seguro y efectivo (Le et al., 2011).

Recientemente, se ha propuesto una vacuna recombinante de SeV contra *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (SeV85AB). La inoculación de la vacuna en la mucosa provoca respuestas potentes de células T específicas de antígeno y un grado de protección contra el desafío con Mtb, similar al efecto de la actual vacuna en ratones, basada en una forma atenuada de *Mycobacterium bovis*, BCG. (Hu et al., 2017).

9.5.1 SeV y HIV

Los primeros estudios de SeV como vacuna frente a un lentivirus han sido prometedores en modelos animales. La administración de vacunas basadas en plásmidos de DNA en combinación con SeV recombinante, expresando Gag de HIV-1, junto con un vector que también lo expresa en adenovirus de serotipo 5 (rAd5-gag), resultó en una inducción eficiente de las respuestas inmunes específicas de Gag en ratones (Yu et al., 2008).

En macacos, SeV ha sido probado en ensayos indicando la seguridad y eficacia de la vacuna la infección por SIV. La vacuna formada por un virus SIV atenuado mediante la delección de *env* y *nef*, seguido del refuerzo con un SeV recombinante, que expresa la proteína Gag de SIV (SeV-Gag), induce respuestas CTL al controlar la infección tras el desafío con la cepa SHIV89.6P (Matano et al., 2004). Años después se evaluó la inmunogenicidad de esta vacuna SeV-Gag en presencia de anticuerpos neutralizantes anti-SeV, viendo que la administración intranasal es la más inmunogénica (Moriya et al., 2011).

El primer ensayo clínico de una vacuna recombinante SeV frente HIV se desarrolló por la *International AIDS Vaccine Initiative* y Dनावेक (*Development of an AIDS vaccine using Sendai virus vectors Vaccine*). Está basada en un vector SeV que expresa la proteína Gag de HIV-1 y un vector, basado en una cepa inactivada de adenovirus de serotipo 35 (Ad35-GRIN) con cuatro genes de HIV: *nef*, *gag*, *RT* e *IN*. El ensayo ha tenido lugar en Kenia, Ruanda y Reino Unido desde 2013. Los resultados preliminares han confirmado la seguridad de administración de SeV-Gag, mostrando su potencial para inducir respuestas celulares y humorales en humanos. El ensayo se ha basado en una primera inmunización con una dosis creciente de SeV-Gag administrada por vía intranasal, seguida de refuerzo con Ad35-GRIN administrado por vía intramuscular, alternándose ambas durante cuatro etapas. La respuesta mediada por

IFN- γ a largo plazo fue mayor en los grupos inmunizados con SeV-Gag y con refuerzo de Ad35-GRIN, mostrándose un aumento de las respuestas de células T CD8 y de anticuerpos (Nyombayire et al., 2017).

La seguridad y la inmunogenicidad de SeV son evidentes a partir de los estudios clínicos en humanos. Además, SeV se puede usar en combinación con otras vacunas, ya sea administrada al mismo tiempo o en protocolos de refuerzo.

Actualmente, no se ha aplicado SeV a infecciones por lentivirus en animales no primates.

REFERENCIAS

- Abe, H., Ochi, H., Maekawa, T., Hatakeyama, T., Tsuge, M., Kitamura, S., Kimura, T., Miki, D., Mitsui, F., Hiraga, N., Imamura, M., Fujimoto, Y., Takahashi, S., Nakamura, Y., Kumada, H., Chayama, K., 2009. Effects of structural variations of APOBEC3A and APOBEC3B genes in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 49, 1159-1168.
- Adderson, E., Branum, K., Sealy, R.E., Jones, B.G., Surman, S.L., Penkert, R., Freiden, P., Slobod, K.S., Gaur, A.H., Hayden, R.T., Allison, K., Howlett, N., Utech, J., Allay, J., Knight, J., Sleep, S., Meagher, M.M., Russell, C.J., Portner, A., Hurwitz, J.L., 2015. Safety and immunogenicity of an intranasal Sendai virus-based human parainfluenza virus type 1 vaccine in 3- to 6-year-old children. *Clinical and vaccine immunology* : CVI 22, 298-303.
- Adebayo, I.A., Olaleye, O.D., Awoniyi, T.A., 2010. Affinity (tropism) of caprine arthritis encephalitis virus for brain cells. *African journal of medicine and medical sciences* 39 Suppl, 89-93.
- Adedeji, A.O., Barr, B., Gomez-Lucia, E., Murphy, B., 2013. A polytropic caprine arthritis encephalitis virus promoter isolated from multiple tissues from a sheep with multisystemic lentivirus-associated inflammatory disease. *Viruses* 5, 2005-2018.
- Agnarsdottir, G., Thorsteinsdottir, H., Oskarsson, T., Matthiasdottir, S., Hafliadottir, B.S., Andresson, O.S., Andresdottir, V., 2000. The long terminal repeat is a determinant of cell tropism of maedi-visna virus. *J Gen Virol* 81, 1901-1905.
- Aguiar, R.S., Lovsin, N., Tanuri, A., Peterlin, B.M., 2008. Vpr.A3A chimera inhibits HIV replication. *J Biol Chem* 283, 2518-2525.
- Ai, Y., Zhu, D., Wang, C., Su, C., Ma, J., Ma, J., Wang, X., 2014. Core-binding factor subunit beta is not required for non-primate lentiviral Vif-mediated APOBEC3 degradation. *J Virol* 88, 12112-12122.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Alba, A., Allepuz, A., Serrano, E., Casal, J., 2008. Seroprevalence and spatial distribution of maedi-visna virus and pestiviruses in Catalonia (Spain). *Small Ruminant Research* 78, 80-86.
- Ali Al Ahmad, M.Z., Fieni, F., Martignat, L., Chatagnon, G., Baril, G., Bouvier, F., Chebloune, Y., 2005. Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. *Theriogenology* 64, 1656-1666.
- Alvarez, V., Daltabuit-Test, M., Arranz, J., Leginagoikoa, I., Juste, R.A., Amorena, B., de Andres, D., Lujan, L., Badiola, J.J., Berriatua, E., 2006. PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. *Res Vet Sci* 80, 226-234.
- Anderson, B.D., Harris, R.S., 2015. Transcriptional regulation of APOBEC3 antiviral immunity through the CBF-beta/RUNX axis. *Sci Adv* 1, e1500296.
- Andresdottir, V., Skraban, R., Matthiasdottir, S., Lutley, R., Agnarsdottir, G., Thorsteinsdottir, H., 2002. Selection of antigenic variants in maedi-visna virus infection. *J Gen Virol* 83, 2543-2551.
- Andresdottir, V., Tang, X., Agnarsdottir, G., Andresson, O.S., Georgsson, G., Skraban, R., Thorsteinsdottir, S., Rafnar, B., Benediktsdottir, E., Matthiasdottir, S., Arnadottir, S., Hognadottir, S., Palsson, P.A., Petursson, G., 1998. Biological and genetic differences between lung- and brain-derived isolates of maedi-visna virus. *Virus genes* 16, 281-293.
- Angelopoulou, K., Brellou, G.D., Vlemmas, I., 2006. Detection of maedi-visna virus in the kidneys of naturally infected sheep. *Journal of comparative pathology* 134, 329-335.
- Angelopoulou, K., Poutahidis, T., Brellou, G.D., Greenland, T., Vlemmas, I., 2008. A deletion in the R region of long terminal repeats in small ruminant lentiviruses is associated with decreased pathology in the lung. *Vet J* 175, 346-355.
- Arias, J.F., Koyama, T., Kinomoto, M., Tokunaga, K., 2012. Retroelements versus APOBEC3 family members: No great escape from the magnificent seven. *Front Microbiol* 3, 275.

- Arnaud, F., Black, S.G., Murphy, L., Griffiths, D.J., Neil, S.J., Spencer, T.E., Palmarini, M., 2010. Interplay between ovine bone marrow stromal cell antigen 2/tetherin and endogenous retroviruses. *J Virol* 84, 4415-4425.
- Arrode-Bruses, G., Hegde, R., Jin, Y., Liu, Z., Narayan, O., Chebloune, Y., 2012. Immunogenicity of a lentiviral-based DNA vaccine driven by the 5'LTR of the naturally attenuated caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) in mice and macaques. *Vaccine* 30, 2956-2962.
- Asin, J., Pascual-Alonso, M., Pinczowski, P., Gimeno, M., Perez, M., Muniesa, A., de Pablo-Maiso, L., de Blas, I., Lacasta, D., Fernandez, A., de Andres, D., Maria, G., Reina, R., Lujan, L., 2018. Cognition and behavior in sheep repetitively inoculated with aluminum adjuvant-containing vaccines or aluminum adjuvant only. *Pharmacol Res*.
- Badiola, J., Gonzalez, L., Gelabert, J., 1983. Demonstration of Maedi Visna in Spain. *Edinburgh*.
- Baldauf, H.M., Pan, X., Erikson, E., Schmidt, S., Daddacha, W., Burggraf, M., Schenkova, K., Ambiel, I., Wabnitz, G., Gramberg, T., Panitz, S., Flory, E., Landau, N.R., Sertel, S., Rutsch, F., Lasitschka, F., Kim, B., Konig, R., Fackler, O.T., Keppler, O.T., 2012. SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells. *Nat Med* 18, 1682-1687.
- Barquero, N., Arjona, A., Domenech, A., Toural, C., de las Heras, A., Fernandez-Garayzabal, J.F., Ruiz-Santa Quiteria, J.A., Gomez-Lucia, E., 2011. Diagnostic performance of PCR and ELISA on blood and milk samples and serological survey for small ruminant lentiviruses in central Spain. *Vet Rec* 168, 20.
- Barrero Domínguez, B., Luque, I., Maldonado, A., Huerta, B., Sánchez, M., Gomez Laguna, J., Astorga, R., 2017. Seroprevalence and risk factors of exposure to caprine arthritis-encephalitis virus in southern Spain. *Veterinary Record* 180, 226.
- Barros, S.C., Andresdottir, V., Fevereiro, M., 2005. Cellular specificity and replication rate of Maedi Visna virus in vitro can be controlled by LTR sequences. *Arch Virol* 150, 201-213.
- Barton, G.M., Kagan, J.C., 2009. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol* 9, 535-542.
- Begara, I., Lujan, L., Collie, D.D., Miller, H.R., Watt, N.J., 1996. Early pulmonary cell response during experimental maedi-visna virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 55, 115-126.
- Belkaid, Y., Naik, S., 2013. Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals. *Nat Immunol* 14, 646-653.
- Belov, L., Whalley, J.M., 1988. Virus-specific polypeptides of caprine arthritis-encephalitis virus recognized by monoclonal antibodies to virion proteins p24 and p14. *J Gen Virol* 69 (Pt 5), 1097-1103.
- Benavides, J., Fuertes, M., Garcia-Pariente, C., Otaola, J., Delgado, L., Giraldez, J., Garcia Marin, J.F., Carmen Ferreras, M., Perez, V., 2013. Impact of maedi-visna in intensively managed dairy sheep. *Vet J* 197, 607-612.
- Benavides, J., Gomez, N., Gelmetti, D., Ferreras, M.C., Garcia-Pariente, C., Fuertes, M., Garcia-Marin, J.F., Perez, V., 2006a. Diagnosis of the nervous form of Maedi-Visna infection with a high frequency in sheep in Castilla y Leon, Spain. *Vet Rec* 158, 230-235.
- Benavides, J., Gómez, N., Gelmetti, D., Ferreras, M.C., García-Pariente, C., Fuertes, M., García-Marín, J.F., Pérez, V., 2006b. Diagnosis of the nervous form of maedi-visna infection with a high frequency in sheep in Castilla y León, Spain. *Veterinary Record* 158, 230.
- Berger, G., Durand, S., Fargier, G., Nguyen, X.N., Cordeil, S., Bouaziz, S., Muriaux, D., Darlix, J.L., Cimarelli, A., 2011. APOBEC3A is a specific inhibitor of the early phases of HIV-1 infection in myeloid cells. *PLoS Pathog* 7, e1002221.
- Bergeron, J.R., Huthoff, H., Veselkov, D.A., Bevil, R.L., Simpson, P.J., Matthews, S.J., Malim, M.H., Sanderson, M.R., 2010. The SOCS-box of HIV-1 Vif interacts with ElonginBC by induced-folding to recruit its Cul5-containing ubiquitin ligase complex. *PLoS Pathog* 6, e1000925.
- Bertolotti, L., Mazzei, M., Puggioni, G., Carrozza, M.L., Dei Giudici, S., Muz, D., Juganaru, M., Patta, C., Tolari, F., Rosati, S., 2011. Characterization of new small ruminant lentivirus subtype B3 suggests animal trade within the Mediterranean Basin. *J Gen Virol* 92, 1923-1929.

- Bertoni G., B.B.A., 2010. *Lentivirus and Macrophages: Molecular and Cellular Interactions*, Caister Academic Press. Edition Norfolk, UK pp. 277-306.
- Best, S., Le Tissier, P., Towers, G., Stoye, J.P., 1996. Positional cloning of the mouse retrovirus restriction gene Fv1. *Nature* 382, 826-829.
- Biasin, M., Piacentini, L., Lo Caputo, S., Kanari, Y., Magri, G., Trabattoni, D., Naddeo, V., Lopalco, L., Clivio, A., Cesana, E., Fasano, F., Bergamaschi, C., Mazzotta, F., Miyazawa, M., Clerici, M., 2007. Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G: a possible role in the resistance to HIV of HIV-exposed seronegative individuals. *J Infect Dis* 195, 960-964.
- Bieniasz, P.D., 2004. Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nat Immunol* 5, 1109-1115.
- Bieniasz, P.D., 2012. An overview of intracellular interactions between immunodeficiency viruses and their hosts. *Aids* 26, 1243-1254.
- Biescas, E., Preziuso, S., Bulgin, M., DeMartini, J.C., 2005. Ovine lentivirus-associated leucomyelitis in naturally infected North American sheep. *Journal of comparative pathology* 132, 107-116.
- Bishop, K.N., Holmes, R.K., Sheehy, A.M., Davidson, N.O., Cho, S.J., Malim, M.H., 2004. Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Current biology : CB* 14, 1392-1396.
- Bishop, K.N., Verma, M., Kim, E.Y., Wolinsky, S.M., Malim, M.H., 2008. APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathog* 4, e1000231.
- Blackard, J.T., 2012. HIV compartmentalization: a review on a clinically important phenomenon. *Curr HIV Res* 10, 133-142.
- Blacklaws, B.A., 2012. Small ruminant lentiviruses: immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 35, 259-269.
- Blacklaws, B.A., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Watt, N.J., de Andres, D., Klein, D., Harkiss, G.D., 2004. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol* 101, 199-208.
- Bogerd, H.P., Wiegand, H.L., Doehle, B.P., Lueders, K.K., Cullen, B.R., 2006. APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. *Nucleic Acids Res* 34, 89-95.
- Bonifati, S., Daly, M.B., St Gelais, C., Kim, S.H., Hollenbaugh, J.A., Shepard, C., Kennedy, E.M., Kim, D.H., Schinazi, R.F., Kim, B., Wu, L., 2016. SAMHD1 controls cell cycle status, apoptosis and HIV-1 infection in monocytic THP-1 cells. *Virology* 495, 92-100.
- Borden, E.C., Sen, G.C., Uze, G., Silverman, R.H., Ransohoff, R.M., Foster, G.R., Stark, G.R., 2007. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 6, 975-990.
- Bousse, T., Chambers, R.L., Scroggs, R.A., Portner, A., Takimoto, T., 2006. Human parainfluenza virus type 1 but not Sendai virus replicates in human respiratory cells despite IFN treatment. *Virus Res* 121, 23-32.
- Bouzar, A.B., Guiguen, F., Morin, T., Villet, S., Fornazero, C., Garnier, C., Gallay, K., Gounel, F., Favier, C., Durand, J., Balleydier, S., Mornex, J.F., Narayan, O., Chebloune, Y., 2003. Specific G2 arrest of caprine cells infected with a caprine arthritis encephalitis virus expressing vpr and vpx genes from simian immunodeficiency virus. *Virology* 309, 41-52.
- Bowen, H.A., Lyles, D.S., 1981. Structure of Sendai viral proteins in plasma membranes of virus-infected cells. *J Virol* 37, 1079-1082.
- Brellou, G.D., Angelopoulou, K., Poutahidis, T., Vlemmas, I., 2007. Detection of maedi-visna virus in the liver and heart of naturally infected sheep. *Journal of comparative pathology* 136, 27-35.
- Brestoff, J.R., Artis, D., 2013. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat Immunol* 14, 676-684.
- Brinkhof, J.M., van Maanen, C., Wigger, R., Peterson, K., Houwers, D.J., 2008. Specific detection of small ruminant lentiviral nucleic acid sequences located in the proviral long terminal

- repeat and leader-gag regions using real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 147, 338-344.
- Brinkhof, J.M.A., Moll, L., van Maanen, C., Houwers, D.J., 2010. Use of serology and polymerase chain reaction for the rapid eradication of small ruminant lentivirus infections from a sheep flock: A case report. *Research in Veterinary Science* 88, 41-43.
- Brownstein, D.G., Weir, E.C., 1987. Immunostimulation in mice infected with Sendai virus. *American journal of veterinary research* 48, 1692-1696.
- Bruett, L., Barber, S.A., Clements, J.E., 2000. Characterization of a membrane-associated protein implicated in visna virus binding and infection. *Virology* 271, 132-141.
- Calain, P., Roux, L., 1993. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol* 67, 4822-4830.
- Calain, P., Roux, L., 1995. Functional characterisation of the genomic and antigenomic promoters of Sendai virus. *Virology* 212, 163-173.
- Caparros, E., Munoz, P., Sierra-Filardi, E., Serrano-Gomez, D., Puig-Kroger, A., Rodriguez-Fernandez, J.L., Mellado, M., Sancho, J., Zubiaur, M., Corbi, A.L., 2006. DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood* 107, 3950-3958.
- Capucchio, M.T., Sanna, E., Sanna, M.P., Farigu, S., Minelli, R., Guarda, F., 2003. Maedi-visna virus detection in ovine third eyelids. *Journal of comparative pathology* 129, 37-43.
- Cardinaux, L., Zahno, M.L., Deubelbeiss, M., Zanoni, R., Vogt, H.R., Bertoni, G., 2013. Virological and phylogenetic characterization of attenuated small ruminant lentivirus isolates eluding efficient serological detection. *Vet Microbiol* 162, 572-581.
- Carrozza, M.L., Mazzei, M., Bandecchi, P., Fraissier, C., Perez, M., Suzan-Monti, M., de Andres, D., Amorena, B., Rosati, S., Andresdottir, V., Lujan, L., Pepin, M., Blacklaws, B., Tolari, F., Harkiss, G.D., 2010. Development and comparison of strain specific gag and pol real-time PCR assays for the detection of Visna/maedi virus. *J Virol Methods* 165, 161-167.
- Cassetta, L., Kajaste-Rudnitski, A., Coradin, T., Saba, E., Della Chiara, G., Barbagallo, M., Graziano, F., Alfano, M., Cassol, E., Vicenzi, E., Poli, G., 2013. M1 polarization of human monocyte-derived macrophages restricts pre and postintegration steps of HIV-1 replication. *Aids* 27, 1847-1856.
- Caval, V., Suspene, R., Vartanian, J.P., Wain-Hobson, S., 2014. Orthologous mammalian APOBEC3A cytidine deaminases hypermutate nuclear DNA. *Mol Biol Evol* 31, 330-340.
- Celer, V., Jr., Celer, V., Nejedla, E., Bertoni, G., Peterhans, E., Zanoni, R.G., 2000. The detection of proviral DNA by semi-nested polymerase chain reaction and phylogenetic analysis of Czech Maedi-Visna isolates based on gag gene sequences. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47, 203-215.
- Clop, A., Huisman, A., van As, P., Sharaf, A., Derdak, S., Sanchez, A., 2016. Identification of genetic variation in the swine toll-like receptors and development of a porcine TLR genotyping array. *Genet Sel Evol* 48, 28.
- Colitti, B., Coradduzza, E., Puggioni, G., Capucchio, M.T., Reina, R., Bertolotti, L., Rosati, S., 2019. A new approach for Small Ruminant Lentivirus full genome characterization revealed the circulation of divergent strains. *PLoS One* 14, e0212585.
- Coticello, S.G., Thomas, C.J., Petersen-Mahrt, S.K., Neuberger, M.S., 2005. Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol Biol Evol* 22, 367-377.
- Cook, S.J., Cook, R.F., Montelaro, R.C., Issel, C.J., 2001. Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. *Vet Microbiol* 79, 93-109.
- Cork, L.C., Hadlow, W.J., Crawford, T.B., Gorham, J.R., Piper, R.C., 1974. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *J Infect Dis* 129, 134-141.
- Covino, D.A., Purificato, C., Catapano, L., Galluzzo, C.M., Gauzzi, M.C., Vella, S., Lefebvre, E., Seyedkazemi, S., Andreotti, M., Fantuzzi, L., 2018. APOBEC3G/3A Expression in Human

- Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Individuals Following Initiation of Antiretroviral Therapy Containing Cenicriviroc or Efavirenz. *Front Immunol* 9, 1839.
- Cowan, S., Hatzioannou, T., Cunningham, T., Muesing, M.A., Gottlinger, H.G., Bieniasz, P.D., 2002. Cellular inhibitors with Fv1-like activity restrict human and simian immunodeficiency virus tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11914-11919.
- Crane, S.E., Buzy, J., Clements, J.E., 1991. Identification of cell membrane proteins that bind visna virus. *J Virol* 65, 6137-6143.
- Crawford, T.B., Adams, D.S., Cheevers, W.P., Cork, L.C., 1980. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science* 207, 997-999.
- Crespo, H., Bertolotti, L., Juganaru, M., Glaria, I., de Andres, D., Amorena, B., Rosati, S., Reina, R., 2013. Small ruminant macrophage polarization may play a pivotal role on lentiviral infection. *Vet Res* 44, 83.
- Crespo, H., Bertolotti, L., Proffitti, M., Cascio, P., Cerruti, F., Acutis, P.L., de Andres, D., Reina, R., Rosati, S., 2016. Low proviral small ruminant lentivirus load as biomarker of natural restriction in goats. *Vet Microbiol* 192, 152-162.
- Crespo, H., Jauregui, P., Glaria, I., Sanjose, L., Polledo, L., Garcia-Marin, J.F., Lujan, L., de Andres, D., Amorena, B., Reina, R., 2012. Mannose receptor may be involved in small ruminant lentivirus pathogenesis. *Vet Res* 43, 43.
- Crespo, H., Reina, R., Glaria, I., Ramirez, H., de Andres, X., Jauregui, P., Lujan, L., Martinez-Pomares, L., Amorena, B., de Andres, D.F., 2011. Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection. *Vet Res* 42, 28.
- Cribier, A., Descours, B., Valadao, A.L., Laguet, N., Benkirane, M., 2013. Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1. *Cell Rep* 3, 1036-1043.
- Crow, Y.J., 2013. Aicardi-Goutieres syndrome. *Handb Clin Neurol* 113, 1629-1635.
- Cullen, B.R., 2006. Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors. *J Virol* 80, 1067-1076.
- Curran, J., Kolakofsky, D., 1988. Ribosomal initiation from an ACG codon in the Sendai virus P/C mRNA. *EMBO J* 7, 245-251.
- Curran, J., Marq, J.B., Kolakofsky, D., 1992. The Sendai virus nonstructural C proteins specifically inhibit viral mRNA synthesis. *Virology* 189, 647-656.
- Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., Brogden, K.A., Schmerr, M.J., 1987. Failure of experimental vaccines to protect against infection with ovine progressive pneumonia (maedi-visna) virus. *Vet Microbiol* 13, 201-204.
- Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., Schmerr, M.J., Brogden, K.A., 1988. Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep. *Vet Microbiol* 17, 237-250.
- Chaipan, C., Smith, J.L., Hu, W.S., Pathak, V.K., 2013. APOBEC3G restricts HIV-1 to a greater extent than APOBEC3F and APOBEC3DE in human primary CD4+ T cells and macrophages. *J Virol* 87, 444-453.
- Chang, J.S., Russell, G.C., Jann, O., Glass, E.J., Werling, D., Haig, D.M., 2009. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptors 1-10 in sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 127, 94-105.
- Chebloune, Y., Sheffer, D., Karr, B.M., Stephens, E., Narayan, O., 1996. Restrictive type of replication of ovine/caprine lentiviruses in ovine fibroblast cell cultures. *Virology* 222, 21-30.
- Cheevers, W.P., Beyer, J.C., Hotzel, I., 2001. Plasmid DNA encoding caprine interferon gamma inhibits antibody response to caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) surface protein encoded by a co-administered plasmid expressing CAEV env and tat genes. *Vaccine* 19, 3209-3215.
- Cheevers, W.P., Hotzel, I., Beyer, J.C., Kumpula-McWhirter, N., 2000. Immune response to caprine arthritis-encephalitis virus surface protein induced by coimmunization with recombinant

- vaccinia viruses expressing the caprine arthritis-encephalitis virus envelope gene and caprine interleukin-12. *Vaccine* 18, 2494-2503.
- Cheevers, W.P., Snekvik, K.R., Trujillo, J.D., Kumpula-McWhirter, N.M., Pretty On Top, K.J., Knowles, D.P., 2003. Prime-boost vaccination with plasmid DNA encoding caprine-arthritis encephalitis lentivirus env and viral SU suppresses challenge virus and development of arthritis. *Virology* 306, 116-125.
- Chen, H., Lilley, C.E., Yu, Q., Lee, D.V., Chou, J., Narvaiza, I., Landau, N.R., Weitzman, M.D., 2006. APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons. *Current biology : CB* 16, 480-485.
- Chiu, Y.L., Soros, V.B., Kreisberg, J.F., Stopak, K., Yonemoto, W., Greene, W.C., 2005. Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature* 435, 108-114.
- Chow, J., Lee, S.M., Shen, Y., Khosravi, A., Mazmanian, S.K., 2010. Host-bacterial symbiosis in health and disease. *Adv Immunol* 107, 243-274.
- da Costa, K.S., Leal, E., dos Santos, A.M., Lima e Lima, A.H., Alves, C.N., Lameira, J., 2014. Structural analysis of viral infectivity factor of HIV type 1 and its interaction with A3G, EloC and EloB. *PLoS One* 9, e89116.
- Da Silva Teixeira, M.F., Lambert, V., Mselli-Lakahl, L., Chettab, A., Chebloune, Y., Mornex, J.F., 1997. immortalization of caprine fibroblasts permissive for replication of small ruminant lentiviruses. *American journal of veterinary research* 58, 579-584.
- Daddacha, W., Koyen, A.E., Bastien, A.J., Head, P.E., Dhere, V.R., Nabeta, G.N., Connolly, E.C., Werner, E., Madden, M.Z., Daly, M.B., Minten, E.V., Whelan, D.R., Schlafstein, A.J., Zhang, H., Anand, R., Doronio, C., Withers, A.E., Shepard, C., Sundaram, R.K., Deng, X., Dynan, W.S., Wang, Y., Bindra, R.S., Cejka, P., Rothenberg, E., Doetsch, P.W., Kim, B., Yu, D.S., 2017. SAMHD1 Promotes DNA End Resection to Facilitate DNA Repair by Homologous Recombination. *Cell Rep* 20, 1921-1935.
- Dahlberg, J.E., Gaskin, J.M., Perk, K., 1981. Morphological and immunological comparison of caprine arthritis encephalitis and ovine progressive pneumonia viruses. *J Virol* 39, 914-919.
- Dang, Y., Abudu, A., Son, S., Harjes, E., Spearman, P., Matsuo, H., Zheng, Y.H., 2011. Identification of a single amino acid required for APOBEC3 antiretroviral cytidine deaminase activity. *J Virol* 85, 5691-5695.
- Davis, R.L., Weintraub, H., Lassar, A.B., 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987-1000.
- de Andres, D., Klein, D., Watt, N.J., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Blacklaws, B.A., Harkiss, G.D., 2005. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol* 107, 49-62.
- de Andres, X., Ramirez, H., Bertolotti, L., San Roman, B., Glaria, I., Crespo, H., Jauregui, P., Minguijon, E., Juste, R., Leginagoikoa, I., Perez, M., Lujan, L., Badiola, J.J., Polledo, L., Garcia-Marin, J.F., Riezu, J.I., Borrás-Cuesta, F., de Andres, D., Rosati, S., Reina, R., Amorena, B., 2013. An insight into a combination of ELISA strategies to diagnose small ruminant lentivirus infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 152, 277-288.
- de Andres, X., Reina, R., Ciriza, J., Crespo, H., Glaria, I., Ramirez, H., Grillo, M.J., Perez, M.M., Andresdottir, V., Rosati, S., Suzan-Monti, M., Lujan, L., Blacklaws, B.A., Harkiss, G.D., de Andres, D., Amorena, B., 2009. Use of B7 costimulatory molecules as adjuvants in a prime-boost vaccination against Visna/Maedi ovine lentivirus. *Vaccine* 27, 4591-4600.
- de Pablo-Maiso, L., Gómez-Arrebola, C., Bertolotti, L., Rosati, S., Farriols, R., de Andrés, D., Reina, R. 2017. Epidemiología molecular y distribución geográfica de SRLV en el mediterráneo In XVII Jornadas sobre Producción Animal, ITEA, A., ed. (Zaragoza).
- Delebecque, F., Suspene, R., Calattini, S., Casartelli, N., Saib, A., Froment, A., Wain-Hobson, S., Gessain, A., Vartanian, J.P., Schwartz, O., 2006. Restriction of foamy viruses by APOBEC cytidine deaminases. *J Virol* 80, 605-614.
- Desimmie, B.A., Delviks-Frankenberry, K.A., Burdick, R.C., Qi, D., Izumi, T., Pathak, V.K., 2014. Multiple APOBEC3 restriction factors for HIV-1 and one Vif to rule them all. *J Mol Biol* 426, 1220-1245.

- Desrosiers, R.C., Lifson, J.D., Gibbs, J.S., Czajak, S.C., Howe, A.Y., Arthur, L.O., Johnson, R.P., 1998. Identification of highly attenuated mutants of simian immunodeficiency virus. *J Virol* 72, 1431-1437.
- Eckstein, D.A., Penn, M.L., Korin, Y.D., Scripture-Adams, D.D., Zack, J.A., Kreisberg, J.F., Roederer, M., Sherman, M.P., Chin, P.S., Goldsmith, M.A., 2001. HIV-1 actively replicates in naive CD4(+) T cells residing within human lymphoid tissues. *Immunity* 15, 671-682.
- Eguchi, A., Kondoh, T., Kosaka, H., Suzuki, T., Momota, H., Masago, A., Yoshida, T., Taira, H., Ishii-Watabe, A., Okabe, J., Hu, J., Miura, N., Ueda, S., Suzuki, Y., Taki, T., Hayakawa, T., Nakanishi, M., 2000. Identification and characterization of cell lines with a defect in a post-adsorption stage of Sendai virus-mediated membrane fusion. *J Biol Chem* 275, 17549-17555.
- Elco, C.P., Guenther, J.M., Williams, B.R., Sen, G.C., 2005. Analysis of genes induced by Sendai virus infection of mutant cell lines reveals essential roles of interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and interferon but not toll-like receptor 3. *J Virol* 79, 3920-3929.
- Eltahir, Y.M., Dovas, C.I., Papanastassopoulou, M., Koumbati, M., Giadinis, N., Vergheze-Nikolakaki, S., Koptopoulos, G., 2006. Development of a semi-nested PCR using degenerate primers for the generic detection of small ruminant lentivirus proviral DNA. *J Virol Methods* 135, 240-246.
- Erhouma, E., Guiguen, F., Chebloune, Y., Gauthier, D., Lakhal, L.M., Greenland, T., Mornex, J.F., Leroux, C., Alogninouwa, T., 2008. Small ruminant lentivirus proviral sequences from wild ibexes in contact with domestic goats. *J Gen Virol* 89, 1478-1484.
- Ertl, H.C., Brown, E.G., Finberg, R.W., 1982. Sendai virus-specific T cell clones II. Induction of interferon production by Sendai virus-specific T helper cell clones. *Eur J Immunol* 12, 1051-1053.
- Esparza-Baquer, A., Larruskain, A., Mateo-Abad, M., Minguíjon, E., Juste, R.A., Benavides, J., Perez, V., Jugo, B.M., 2015. SNPs in APOBEC3 cytosine deaminases and their association with Visna/Maedi disease progression. *Vet Immunol Immunopathol* 163, 125-133.
- Evans, D.T., Serra-Moreno, R., Singh, R.K., Guatelli, J.C., 2010. BST-2/tetherin: a new component of the innate immune response to enveloped viruses. *Trends Microbiol* 18, 388-396.
- Extramiana, B., González, L., Cortabarría, N., García, M., Juste, R., 2002. Evaluation of a PCR technique for the detection of Maedi Visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. *Small Rum Res* 44, 109-117.
- Faisca, P., Desmecht, D., 2007. Sendai virus, the mouse parainfluenza type 1: a longstanding pathogen that remains up-to-date. *Res Vet Sci* 82, 115-125.
- Fieni, F., Pellerin, J.L., Roux, C., Poulin, N., Baril, G., Fatet, A., Valas, S., Chatagnon, G., Mermillod, P., Guignot, F., 2012. Can caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) be transmitted by in vitro fertilization with experimentally infected sperm? *Theriogenology* 77, 644-651.
- Fletcher, A.J., Hue, S., Schaller, T., Pillay, D., Towers, G.J., 2010. Hare TRIM5alpha restricts divergent retroviruses and exhibits significant sequence variation from closely related lagomorpha TRIM5 genes. *J Virol* 84, 12463-12468.
- Fluri, A., Nenci, C., Zahno, M.L., Vogt, H.R., Charan, S., Busato, A., Pancino, G., Peterhans, E., Obexer-Ruff, G., Bertoni, G., 2006. The MHC-haplotype influences primary, but not memory, immune responses to an immunodominant peptide containing T- and B-cell epitopes of the caprine arthritis encephalitis virus Gag protein. *Vaccine* 24, 597-606.
- Franzdottir, S.R., Olafsdottir, K., Jonsson, S.R., Strobel, H., Andresson, O.S., Andressdottir, V., 2016. Two mutations in the vif gene of maedi-visna virus have different phenotypes, indicating more than one function of Vif. *Virology* 488, 37-42.
- Fujita, S., Eguchi, A., Okabe, J., Harada, A., Sasaki, K., Ogiwara, N., Inoue, Y., Ito, T., Matsuda, H., Kataoka, K., Kato, A., Hasegawa, M., Nakanishi, M., 2006. Sendai virus-mediated gene delivery into hepatocytes via isolated hepatic perfusion. *Biol Pharm Bull* 29, 1728-1734.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., Hasegawa, M., 2009. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85, 348-362.

- Gabuzda, D.H., Lawrence, K., Langhoff, E., Terwilliger, E., Dorfman, T., Haseltine, W.A., Sodroski, J., 1992. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J Virol* 66, 6489-6495.
- Ganser-Pornillos, B.K., Chandrasekaran, V., Pornillos, O., Sodroski, J.G., Sundquist, W.I., Yeager, M., 2011. Hexagonal assembly of a restricting TRIM5 α protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 534-539.
- Garcin, D., Pelet, T., Calain, P., Roux, L., Curran, J., Kolakofsky, D., 1995. A highly recombinogenic system for the recovery of infectious Sendai paramyxovirus from cDNA: generation of a novel copy-back nondefective interfering virus. *EMBO J* 14, 6087-6094.
- Gay, N.J., Keith, F.J., 1991. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351, 355-356.
- Geijtenbeek, T.B., van Kooyk, Y., 2003. DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission. *Curr Top Microbiol Immunol* 276, 31-54.
- Gendelman, H.E., Narayan, O., Kennedy-Stoskopf, S., Kennedy, P.G., Ghotbi, Z., Clements, J.E., Stanley, J., Pezeshkpour, G., 1986. Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *J Virol* 58, 67-74.
- Geraghty, R.J., Talbot, K.J., Callahan, M., Harper, W., Panganiban, A.T., 1994. Cell type-dependence for Vpu function. *J Med Primatol* 23, 146-150.
- Germain, K., Valas, S., 2006. Distribution and heterogeneity of small ruminant lentivirus envelope subtypes in naturally infected French sheep. *Virus Res.*
- Gifford, R.J., 2012. Viral evolution in deep time: lentiviruses and mammals. *Trends Genet* 28, 89-100.
- Gjerset, B., Storset, A.K., Rimstad, E., 2006. Genetic diversity of small-ruminant lentiviruses: characterization of Norwegian isolates of Caprine arthritis encephalitis virus. *J Gen Virol* 87, 573-580.
- Glaria, I., 2015. Base genética del tropismo de Lentivirus de Pequeños Rumiantes y estudio de la resistencia innata por APOBEC3. Universidad Pública de Navarra. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Pamplona.
- Glaria, I., Reina, R., Crespo, H., de Andres, X., Ramirez, H., Biescas, E., Perez, M.M., Badiola, J., Lujan, L., Amorena, B., de Andres, D., 2009. Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep. *Vet Microbiol* 138, 156-162.
- Glaria, I., Reina, R., Ramirez, H., de Andres, X., Crespo, H., Jauregui, P., Salazar, E., Lujan, L., Perez, M.M., Benavides, J., Perez, V., Polledo, L., Garcia-Marin, J.F., Riezu, J.I., Borrás, F., Amorena, B., de Andres, D., 2012. Visna/Maedi virus genetic characterization and serological diagnosis of infection in sheep from a neurological outbreak. *Vet Microbiol* 155, 137-146.
- Gogolewski, R.P., Adams, D.S., McGuire, T.C., Banks, K.L., Cheevers, W.P., 1985. Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. *J Gen Virol* 66 (Pt 6), 1233-1240.
- Goila-Gaur, R., Khan, M.A., Miyagi, E., Kao, S., Strebel, K., 2007. Targeting APOBEC3A to the viral nucleoprotein complex confers antiviral activity. *Retrovirology* 4, 61.
- Goila-Gaur, R., Strebel, K., 2008. HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* 5, 51.
- Gomez-Lucia, E., Barquero, N., Domenech, A., 2018. Maedi-Visna virus: current perspectives. *Vet Med (Auckl)* 9, 11-21.
- Gomez-Lucia, E., Rowe, J., Collar, C., Murphy, B., 2013. Diversity of caprine arthritis-encephalitis virus promoters isolated from goat milk and passaged in vitro. *Vet J* 196, 431-438.
- Gomez-Lucia, E., Sanjosé, L., Crespo, O., Reina, R., Glaria, I., Ballesteros, N., Amorena, B., Doménech, A., 2014. Modulation of the long terminal repeat promoter activity of small ruminant lentiviruses by steroids. *Vet J.*
- Gonzalez, B., Reina, R., Garcia, I., Andres, S., Glaria, I., Alzueta, M., Mora, M.I., Jugo, B.M., Arrieta-Aguirre, I., de la Lastra, J.M., Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., Esteban, M., Grillo, M.J.,

- Blacklaws, B.A., Harkiss, G.D., Chebloune, Y., Lujan, L., de Andres, D., Amorena, B., 2005. Mucosal immunization of sheep with a Maedi-Visna virus (MVV) env DNA vaccine protects against early MVV productive infection. *Vaccine* 23, 4342-4352.
- Gonzalez, L., Gelabert, J.L., Marco, J.C., Saez de Okariz, C., 1987. Caprine arthritis-encephalitis in the Basque country, Spain. *Vet Rec* 120, 102-109.
- Goto, T., Morishita, M., Nishimura, K., Nakanishi, M., Kato, A., Ehara, J., Takayama, K., 2006. Novel mucosal insulin delivery systems based on fusogenic liposomes. *Pharm Res* 23, 384-391.
- Green, A.M., Dineen, A.S., Kulej, K., Szeto, J.H., Weitzman, M.D., 2019. Abstract 3495: The CCT chaperonin is a regulator of mutagenic APOBEC3A activity. *Cancer Research* 79, 3495-3495.
- Green, A.M., Landry, S., Budagyan, K., Avgousti, D.C., Shalhout, S., Bhagwat, A.S., Weitzman, M.D., 2016. APOBEC3A damages the cellular genome during DNA replication. *Cell Cycle* 15, 998-1008.
- Grego, E., Profiti, M., Giammarioli, M., Giannino, L., Rutili, D., Woodall, C., Rosati, S., 2002. Genetic heterogeneity of small ruminant lentiviruses involves immunodominant epitope of capsid antigen and affects sensitivity of single-strain-based immunoassay. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 9, 828-832.
- Griffin, D.E., Narayan, O., Adams, R.J., 1978. Early immune responses in visna, a slow viral disease of sheep. *J Infect Dis* 138, 340-350.
- Grogan, C.C., Moyer, S.A., 2001. Sendai virus wild-type and mutant C proteins show a direct correlation between L polymerase binding and inhibition of viral RNA synthesis. *Virology* 288, 96-108.
- Grosfeld, H., Hill, M.G., Collins, P.L., 1995. RNA replication by respiratory syncytial virus (RSV) is directed by the N, P, and L proteins; transcription also occurs under these conditions but requires RSV superinfection for efficient synthesis of full-length mRNA. *J Virol* 69, 5677-5686.
- Grossi, P., Giudice, C., Bertolotti, I., Cioccarelli, G., Brocchi, E., Cammarata, G., Gelmetti, D., 2005. Immunohistochemical detection of the p27 capsid protein of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in bone-marrow cells of seropositive goats. *Journal of comparative pathology* 133, 197-200.
- Gudmundsson, B., Bjarnadottir, H., Kristjansdottir, S., Jonsson, J.J., 2003. Quantitative assays for maedi-visna virus genetic sequences and mRNA's based on RT-PCR with real-time FRET measurements. *Virology* 307, 135-142.
- Gudmundsson, B., Jonsson, S.R., Olafsson, O., Agnarsdottir, G., Matthiasdottir, S., Georgsson, G., Torsteinsdottir, S., Svansson, V., Kristbjornsdottir, H.B., Franzdottir, S.R., Andresson, O.S., Andresdottir, V., 2005. Simultaneous mutations in CA and Vif of Maedi-Visna virus cause attenuated replication in macrophages and reduced infectivity in vivo. *J Virol* 79, 15038-15042.
- Guiguen, F., Mselli-Lakhal, L., Durand, J., Du, J., Favier, C., Fornazero, C., Grezel, D., Balleydier, S., Hausmann, E., Chebloune, Y., 2000. Experimental infection of Mouflon-domestic sheep hybrids with caprine arthritis-encephalitis virus. *American journal of veterinary research* 61, 456-461.
- Guo, F., Cen, S., Niu, M., Yang, Y., Gorelick, R.J., Kleiman, L., 2007. The interaction of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid inhibits tRNA^{3Lys} annealing to viral RNA. *J Virol* 81, 11322-11331.
- Gupta, K.C., Patwardhan, S., 1988. ACG, the initiator codon for a Sendai virus protein. *J Biol Chem* 263, 8553-8556.
- Gupta, R.K., Hue, S., Schaller, T., Verschoor, E., Pillay, D., Towers, G.J., 2009. Mutation of a single residue renders human tetherin resistant to HIV-1 Vpu-mediated depletion. *PLoS Pathog* 5, e1000443.
- Hafliadottir, B.S., Matthiasdottir, S., Agnarsdottir, G., Torsteinsdottir, S., Petursson, G., Andresson, O.S., Andresdottir, V., 2008. Mutational analysis of a principal neutralization domain of visna/maedi virus envelope glycoprotein. *J Gen Virol* 89, 716-721.

- Harmache, A., Bouyac, M., Audoly, G., Hieblot, C., Peveri, P., Vigne, R., Suzan, M., 1995. The vif gene is essential for efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication cycle. *J Virol* 69, 3247-3257.
- Harmache, A., Russo, P., Vitu, C., Guiguen, F., Mornex, J.F., Pepin, M., Vigne, R., Suzan, M., 1996. Replication in goats in vivo of caprine arthritis-encephalitis virus deleted in vif or tat genes: possible use of these deletion mutants as live vaccines. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12, 409-411.
- Harmache, A., Vitu, C., Guiguen, F., Russo, P., Bertoni, G., Pepin, M., Vigne, R., Suzan, M., 1998. Priming with tat-deleted caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) proviral DNA or live virus protects goats from challenge with pathogenic CAEV. *J Virol* 72, 6796-6804.
- Harris, R.S., 2008. Enhancing immunity to HIV through APOBEC. *Nat Biotechnol* 26, 1089-1090.
- Harris, R.S., Bishop, K.N., Sheehy, A.M., Craig, H.M., Petersen-Mahrt, S.K., Watt, I.N., Neuberger, M.S., Malim, M.H., 2003. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113, 803-809.
- Harris, R.S., Liddament, M.T., 2004. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol* 4, 868-877.
- Hasan, M.K., Kato, A., Shioda, T., Sakai, Y., Yu, D., Nagai, Y., 1997. Creation of an infectious recombinant Sendai virus expressing the firefly luciferase gene from the 3' proximal first locus. *J Gen Virol* 78 (Pt 11), 2813-2820.
- Hatai, H., Lepelley, A., Zeng, W., Hayden, M.S., Ghosh, S., 2016. Toll-Like Receptor 11 (TLR11) Interacts with Flagellin and Profilin through Disparate Mechanisms. *PLoS One* 11, e0148987.
- Hatzioannou, T., Cowan, S., Goff, S.P., Bieniasz, P.D., Towers, G.J., 2003. Restriction of multiple divergent retroviruses by Lv1 and Ref1. *EMBO J* 22, 385-394.
- Hatzioannou, T., Perez-Caballero, D., Yang, A., Cowan, S., Bieniasz, P.D., 2004. Retrovirus resistance factors Ref1 and Lv1 are species-specific variants of TRIM5alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10774-10779.
- He, Z., Zhang, W., Chen, G., Xu, R., Yu, X.F., 2008. Characterization of conserved motifs in HIV-1 Vif required for APOBEC3G and APOBEC3F interaction. *J Mol Biol* 381, 1000-1011.
- Heaton, M.P., Clawson, M.L., Chitko-Mckown, C.G., Leymaster, K.A., Smith, T.P., Harhay, G.P., White, S.N., Herrmann-Hoesing, L.M., Mousel, M.R., Lewis, G.S., Kalbfleisch, T.S., Keen, J.E., Laegreid, W.W., 2012. Reduced lentivirus susceptibility in sheep with TMEM154 mutations. *PLoS genetics* 8, e1002467.
- Henderson, G., Murray, J., Yeo, R.P., 2002. Sorting of the respiratory syncytial virus matrix protein into detergent-resistant structures is dependent on cell-surface expression of the glycoproteins. *Virology* 300, 244-254.
- Henriques, A.M., Fevereiro, M., Prazeres, D.M., Monteiro, G.A., 2007. Development of a candidate DNA vaccine against Maedi-Visna virus. *Vet Immunol Immunopathol* 119, 222-232.
- Herrmann-Hoesing, L.M., 2010. Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 22, 843-855.
- Herrmann, L.M., Cheevers, W.P., McGuire, T.C., Adams, D.S., Hutton, M.M., Gavin, W.G., Knowles, D.P., 2003. Competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus: diagnostic tool for successful eradication. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 10, 267-271.
- Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H., Johnson, P.R., 1989. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 339, 389-392.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., Ezekowitz, R.A., 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.

- Hollenbaugh, J.A., Tao, S., Lenzi, G.M., Ryu, S., Kim, D.H., Diaz-Griffero, F., Schinazi, R.F., Kim, B., 2014. dNTP pool modulation dynamics by SAMHD1 protein in monocyte-derived macrophages. *Retrovirology* 11, 63.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., Endres, S., Hartmann, G., 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314, 994-997.
- Hotzel, I., Cheevers, W., 2002. Differential receptor usage of small ruminant lentiviruses in ovine and caprine cells: host range but not cytopathic phenotype is determined by receptor usage. *Virology* 301, 21-31.
- Houwens, D.J., 1990. Economic importance, epidemiology and control. *Maedi-visna and related diseases*. Edited by G. P, tursson and R. Hoff-Jorgensen. Kluwer Academic Publishers. Boston., 83-117.
- Hrecka, K., Hao, C., Gierszewska, M., Swanson, S.K., Kesik-Brodacka, M., Srivastava, S., Florens, L., Washburn, M.P., Skowronski, J., 2011. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* 474, 658-661.
- Hu, Z., Wong, K.W., Zhao, H.M., Wen, H.L., Ji, P., Ma, H., Wu, K., Lu, S.H., Li, F., Li, Z.M., Shu, T., Xu, J.Q., Lowrie, D.B., Fan, X.Y., 2017. Sendai Virus Mucosal Vaccination Establishes Lung-Resident Memory CD8 T Cell Immunity and Boosts BCG-Primed Protection against TB in Mice. *Mol Ther* 25, 1222-1233.
- Huang, J., Sun, Y., Liu, Y., Xiao, H., Zhuang, S., 2012. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA. *Arch Virol* 157, 1463-1469.
- Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G., Wain-Hobson, S., 1990. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* 345, 356-359.
- Hultquist, J.F., Binka, M., LaRue, R.S., Simon, V., Harris, R.S., 2012. Vif proteins of human and simian immunodeficiency viruses require cellular CBFbeta to degrade APOBEC3 restriction factors. *J Virol* 86, 2874-2877.
- Hultquist, J.F., Lengyel, J.A., Refsland, E.W., LaRue, R.S., Lackey, L., Brown, W.L., Harris, R.S., 2011. Human and rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, and APOBEC3H demonstrate a conserved capacity to restrict Vif-deficient HIV-1. *J Virol* 85, 11220-11234.
- Hurwitz, J.L., 2008. Development of recombinant Sendai virus vaccines for prevention of human parainfluenza and respiratory syncytial virus infections. *Pediatr Infect Dis J* 27, S126-128.
- Hurwitz, J.L., Soike, K.F., Sangster, M.Y., Portner, A., Sealy, R.E., Dawson, D.H., Coleclough, C., 1997. Intranasal Sendai virus vaccine protects African green monkeys from infection with human parainfluenza virus-type one. *Vaccine* 15, 533-540.
- Huthoff, H., Malim, M.H., 2007. Identification of amino acid residues in APOBEC3G required for regulation by human immunodeficiency virus type 1 Vif and Virion encapsidation. *J Virol* 81, 3807-3815.
- Irie, T., Kiyotani, K., Igarashi, T., Yoshida, A., Sakaguchi, T., 2012. Inhibition of interferon regulatory factor 3 activation by paramyxovirus V protein. *J Virol* 86, 7136-7145.
- Jager, S., Kim, D.Y., Hultquist, J.F., Shindo, K., LaRue, R.S., Kwon, E., Li, M., Anderson, B.D., Yen, L., Stanley, D., Mahon, C., Kane, J., Franks-Skiba, K., Cimermancic, P., Burlingame, A., Sali, A., Craik, C.S., Harris, R.S., Gross, J.D., Krogan, N.J., 2011. Vif hijacks CBF-beta to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature* 481, 371-375.
- Janahi, E.M., McGarvey, M.J., 2013. The inhibition of hepatitis B virus by APOBEC cytidine deaminases. *J Viral Hepat* 20, 821-828.
- Jarmuz, A., Chester, A., Bayliss, J., Gisbourne, J., Dunham, I., Scott, J., Navaratnam, N., 2002. An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* 79, 285-296.
- Jauregui, P., Crespo, H., Glaria, I., Lujan, L., Contreras, A., Rosati, S., de Andres, D., Amorena, B., Towers, G.J., Reina, R., 2012. Ovine TRIM5alpha can restrict visna/maedi virus. *J Virol* 86, 9504-9509.

- Jauregui, P., Landau, N.R., 2018. DNA damage induces a SAMHD1-mediated block to the infection of macrophages by HIV-1. *Sci Rep* 8, 4153.
- Jauregui, P., Logue, E.C., Schultz, M.L., Fung, S., Landau, N.R., 2015. Degradation of SAMHD1 by Vpx Is Independent of Uncoating. *J Virol* 89, 5701-5713.
- Jolly, P.E., Gangopadhyay, A., Chen, S., Reddy, P.G., Weiss, H.L., Sapp, W.J., 1997. Changes in the leukocyte phenotype profile of goats infected with the caprine arthritis encephalitis virus. *Vet Immunol Immunopathol* 56, 97-106.
- Jones, B.G., Sealy, R.E., Rudraraju, R., Traina-Dorge, V.L., Finneyfrock, B., Cook, A., Takimoto, T., Portner, A., Hurwitz, J.L., 2012. Sendai virus-based RSV vaccine protects African green monkeys from RSV infection. *Vaccine* 30, 959-968.
- Jones, B.G., Sealy, R.E., Surman, S.L., Portner, A., Russell, C.J., Slobod, K.S., Dormitzer, P.R., DeVincenzo, J., Hurwitz, J.L., 2014. Sendai virus-based RSV vaccine protects against RSV challenge in an in vivo maternal antibody model. *Vaccine* 32, 3264-3273.
- Jonsson, S.R., Andresdottir, V., 2013. Host restriction of lentiviruses and viral countermeasures: APOBEC3 and Vif. *Viruses* 5, 1934-1947.
- Jonsson, S.R., Hache, G., Stenglein, M.D., Fahrenkrug, S.C., Andresdottir, V., Harris, R.S., 2006. Evolutionarily conserved and non-conserved retrovirus restriction activities of artiodactyl APOBEC3F proteins. *Nucleic Acids Res* 34, 5683-5694.
- Jouvenet, N., Neil, S.J., Zhadina, M., Zang, T., Kratovac, Z., Lee, Y., McNatt, M., Hatzioannou, T., Bieniasz, P.D., 2009. Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin. *J Virol* 83, 1837-1844.
- Kamata, M., Nagaoka, Y., Chen, I.S., 2009. Reassessing the role of APOBEC3G in human immunodeficiency virus type 1 infection of quiescent CD4+ T-cells. *PLoS Pathog* 5, e1000342.
- Kane, J.R., Stanley, D.J., Hultquist, J.F., Johnson, J.R., Mietrach, N., Binning, J.M., Jonsson, S.R., Barelier, S., Newton, B.W., Johnson, T.L., Franks-Skiba, K.E., Li, M., Brown, W.L., Gunnarsson, H.I., Adalbjornsdottir, A., Fraser, J.S., Harris, R.S., Andresdottir, V., Gross, J.D., Krogan, N.J., 2015. Lineage-Specific Viral Hijacking of Non-canonical E3 Ubiquitin Ligase Cofactors in the Evolution of Vif Anti-APOBEC3 Activity. *Cell Rep* 11, 1236-1250.
- Kao, S., Goila-Gaur, R., Miyagi, E., Khan, M.A., Opi, S., Takeuchi, H., Strebel, K., 2007. Production of infectious virus and degradation of APOBEC3G are separable functional properties of human immunodeficiency virus type 1 Vif. *Virology* 369, 329-339.
- Kato, A., Cortese-Grogan, C., Moyer, S.A., Sugahara, F., Sakaguchi, T., Kubota, T., Otsuki, N., Kohase, M., Tashiro, M., Nagai, Y., 2004. Characterization of the amino acid residues of sendai virus C protein that are critically involved in its interferon antagonism and RNA synthesis down-regulation. *Journal of virology* 78, 7443-7454.
- Kato, A., Kiyotani, K., Hasan, M.K., Shioda, T., Sakai, Y., Yoshida, T., Nagai, Y., 1999. Sendai virus gene start signals are not equivalent in reinitiation capacity: moderation at the fusion protein gene. *J Virol* 73, 9237-9246.
- Kawai, T., Akira, S., 2007. TLR signaling. *Semin Immunol* 19, 24-32.
- Keckesova, Z., Ylinen, L.M., Towers, G.J., 2004. The human and African green monkey TRIM5alpha genes encode Ref1 and Lv1 retroviral restriction factor activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10780-10785.
- Kemp, R.K., Knowles, D.P., Perry, L.L., McGuire, T.C., Besser, T.E., Cheevers, W.P., 2000. Crossreactive neutralizing antibodies induced by immunization with caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. *Vaccine* 18, 1282-1287.
- Khan, M.A., Goila-Gaur, R., Opi, S., Miyagi, E., Takeuchi, H., Kao, S., Strebel, K., 2007. Analysis of the contribution of cellular and viral RNA to the packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions. *Retrovirology* 4, 48.
- Kikuchi, T., Iwabu, Y., Tada, T., Kawana-Tachikawa, A., Koga, M., Hosoya, N., Nomura, S., Brumme, Z.L., Jessen, H., Pereyra, F., Trocha, A., Walker, B.D., Iwamoto, A., Tokunaga, K., Miura, T.,

2015. Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein is attenuated in elite controllers. *J Virol* 89, 4992-5001.
- Kim, B., Nguyen, L.A., Daddacha, W., Hollenbaugh, J.A., 2012. Tight interplay among SAMHD1 protein level, cellular dNTP levels, and HIV-1 proviral DNA synthesis kinetics in human primary monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 287, 21570-21574.
- Kinoh, H., Inoue, M., Komaru, A., Ueda, Y., Hasegawa, M., Yonemitsu, Y., 2009. Generation of optimized and urokinase-targeted oncolytic Sendai virus vectors applicable for various human malignancies. *Gene Ther* 16, 392-403.
- Kirkland, P.D., Batty, E.M., 1987. Caprine arthritis-encephalitis virus: an efficient method for the large scale production of serological antigens. *J Virol Methods* 16, 323-326.
- Knowles, D.P., Evermann J.F., Shropshire C., Vandreschalie J., Bradway D., Gezon H.M., and Cheevers W.P., 1994. Evaluation of Agar Gel Immunodiffusion Serology Using Caprine and Ovine Lentiviral Antigens for Detection of Antibody to Caprine Arthritis-Encephalitis Virus. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 243-245.
- Knowles, D.P., Jr., 1997. Laboratory diagnostic tests for retrovirus infections of small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13, 1-11.
- Kohnken, R., Kodigepalli, K.M., Wu, L., 2015. Regulation of deoxynucleotide metabolism in cancer: novel mechanisms and therapeutic implications. *Mol Cancer* 14, 176.
- Kokawa, S., Oba, M., Hirata, T., Tamaki, S., Omura, M., Tsuchiaka, S., Nagai, M., Omatsu, T., Mizutani, T., 2017. Molecular characteristics and prevalence of small ruminant lentiviruses in goats in Japan. *Arch Virol* 162, 3007-3015.
- Koning, F.A., Goujon, C., Bauby, H., Malim, M.H., 2011. Target cell-mediated editing of HIV-1 cDNA by APOBEC3 proteins in human macrophages. *J Virol* 85, 13448-13452.
- Koning, F.A., Newman, E.N., Kim, E.Y., Kunstman, K.J., Wolinsky, S.M., Malim, M.H., 2009. Defining APOBEC3 expression patterns in human tissues and hematopoietic cell subsets. *J Virol* 83, 9474-9485.
- Koyama, A.H., Irie, H., Kato, A., Nagai, Y., Adachi, A., 2003. Virus multiplication and induction of apoptosis by Sendai virus: role of the C proteins. *Microbes Infect* 5, 373-378.
- Kreisberg, J.F., Yonemoto, W., Greene, W.C., 2006. Endogenous factors enhance HIV infection of tissue naive CD4 T cells by stimulating high molecular mass APOBEC3G complex formation. *J Exp Med* 203, 865-870.
- Kristbjornsdottir, H.B., Andresdottir, V., Svansson, V., Torsteinsdottir, S., Matthiasdottir, S., Andresson, O.S., 2004. The vif gene of maedi-visna virus is essential for infectivity in vivo and in vitro. *Virology* 318, 350-359.
- L'Homme, Y., Leboeuf, A., Arsenault, J., Fras, M., 2015. Identification and characterization of an emerging small ruminant lentivirus circulating recombinant form (CRF). *Virology* 475, 159-171.
- Laakso, M.M., Lee, F.H., Haggarty, B., Agrawal, C., Nolan, K.M., Biscione, M., Romano, J., Jordan, A.P., Leslie, G.J., Meissner, E.G., Su, L., Hoxie, J.A., Doms, R.W., 2007. V3 loop truncations in HIV-1 envelope impart resistance to coreceptor inhibitors and enhanced sensitivity to neutralizing antibodies. *PLoS Pathog* 3, e117.
- Lacerenza, D., Giammarioli, M., Grego, E., Marini, C., Profiti, M., Rutili, D., Rosati, S., 2006. Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. *Vet Immunol Immunopathol* 112, 264-271.
- Lago, N., Lopez, C., Panadero, R., Cienfuegos, S., Pato, J., Prieto, A., Diaz, P., Mourazos, N., Fernandez, G., 2012. Seroprevalence and risk factors associated with Visna/Maedi virus in semi-intensive lamb-producing flocks in northwestern Spain. *Prev Vet Med* 103, 163-169.
- Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E.C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., Pancino, G., Priet, S., Canard, B., Laguet, N., Benkirane, M., Transy, C., Landau, N.R., Kim, B., Margottin-Goguet, F., 2012. SAMHD1 restricts the

- replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol* 13, 223-228.
- Lamara, A., Fieni, F., Mselli-Lakhal, L., Tainturier, D., Chebloune, Y., 2001. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells. *Virus Res* 79, 165-172.
- Lamara, A., Fieni, F., Mselli-Lakhal, L., Tainturier, D., Chebloune, Y., 2002. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Virus Res* 87, 69-77.
- Lamb, R.A., Jardetzky, T.S., 2007. Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F. *Curr Opin Struct Biol* 17, 427-436.
- Lamb, R.A., Kolakofsky, D., 1996. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. , Vol Fields Virology Philadelphia: . In B. N. Fields, D. M. Knipe, & P. M. Howley (Eds.)
- Lamb, R.A., Kolakofsky, D., 2001. Paramyxoviridae: the viruses and their replication., Lippincott, Williams & Wilkins Co., Philadelphia, Pa., p. 1305-1340. pp.
- Landry, S., Narvaiza, I., Linfesty, D.C., Weitzman, M.D., 2011. APOBEC3A can activate the DNA damage response and cause cell-cycle arrest. *EMBO Rep* 12, 444-450.
- Larruskain, A., Bernales, I., Lujan, L., de Andres, D., Amorena, B., Jugo, B.M., 2013. Expression analysis of 13 ovine immune response candidate genes in Visna/Maedi disease progression. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 36, 405-413.
- Larruskain, A., Minguíjon, E., Garcia-Etxebarria, K., Moreno, B., Arostegui, I., Juste, R.A., Jugo, B.M., 2010. MHC class II DRB1 gene polymorphism in the pathogenesis of Maedi-Visna and pulmonary adenocarcinoma viral diseases in sheep. *Immunogenetics* 62, 75-83.
- LaRue, R.S., Jonsson, S.R., Silverstein, K.A., Lajoie, M., Bertrand, D., El-Mabrouk, N., Hotzel, I., Andresdottir, V., Smith, T.P., Harris, R.S., 2008. The artiodactyl APOBEC3 innate immune repertoire shows evidence for a multi-functional domain organization that existed in the ancestor of placental mammals. *BMC Mol Biol* 9, 104.
- Larue, R.S., Lengyel, J., Jonsson, S.R., Andresdottir, V., Harris, R.S., 2010. Lentiviral Vif degrades the APOBEC3Z3/APOBEC3H protein of its mammalian host and is capable of cross-species activity. *J Virol* 84, 8193-8201.
- Le Tortorec, A., Neil, S.J., 2009. Antagonism to and intracellular sequestration of human tetherin by the human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein. *J Virol* 83, 11966-11978.
- Le, T.V., Mironova, E., Garcin, D., Compans, R.W., 2011. Induction of influenza-specific mucosal immunity by an attenuated recombinant Sendai virus. *PLoS One* 6, e18780.
- Lechat, E., Milhau, N., Brun, P., Bellaton, C., Greenland, T., Mornex, J.F., Le Jan, C., 2005. Goat endothelial cells may be infected in vitro by transmigration of caprine arthritis-encephalitis virus-infected leucocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 104, 257-263.
- Lee, J., Malmberg, J.L., Wood, B.A., Hladky, S., Troyer, R., Roelke, M., Cunningham, M., McBride, R., Vickers, W., Boyce, W., Boydston, E., Seriesys, L., Riley, S., Crooks, K., VandeWoude, S., 2017. Feline Immunodeficiency Virus Cross-Species Transmission: Implications for Emergence of New Lentiviral Infections. *J Virol* 91.
- Leginagoikoa, I., Juste, R.A., Barandika, J., Amorena, B., De Andres, D., Lujan, L., Badiola, J., Berriatua, E., 2006. Extensive rearing hinders Maedi-Visna Virus (MVV) infection in sheep. *Vet Res* 37, 767-778.
- Leginagoikoa, I., Minguíjon, E., Berriatua, E., Juste, R.A., 2009. Improvements in the detection of small ruminant lentivirus infection in the blood of sheep by PCR. *J Virol Methods* 156, 145-149.
- Leitner, G., Krifucks, O., Weisblit, L., Lavi, Y., Bernstein, S., Merin, U., 2010. The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. *Vet J* 183, 328-331.
- Leroux, C., Chastang, J., Greenland, T., Mornex, J.F., 1997a. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch Virol* 142, 1125-1137.

- Leroux, C., Lerondelle, C., Chastang, J., Mornex, J.F., 1997b. RT-PCR detection of lentiviruses in milk or mammary secretions of sheep or goats from infected flocks. *Vet Res* 28, 115-121.
- Li, H.O., Zhu, Y.F., Asakawa, M., Kuma, H., Hirata, T., Ueda, Y., Lee, Y.S., Fukumura, M., Iida, A., Kato, A., Nagai, Y., Hasegawa, M., 2000. A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. *J Virol* 74, 6564-6569.
- Li, X.Y., Guo, F., Zhang, L., Kleiman, L., Cen, S., 2007. APOBEC3G inhibits DNA strand transfer during HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem* 282, 32065-32074.
- Lida, A., Inoue, M., 2013. Concept and technology underlying Sendai virus (SeV) vector development. Springer, Tokyo, Japan.
- Lim, E.S., Fregoso, O.I., McCoy, C.O., Matsen, F.A., Malik, H.S., Emerman, M., 2012. The ability of primate lentiviruses to degrade the monocyte restriction factor SAMHD1 preceded the birth of the viral accessory protein Vpx. *Cell Host Microbe* 11, 194-204.
- Linehan, S.A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., 2000. Mannose receptor and scavenger receptor: two macrophage pattern recognition receptors with diverse functions in tissue homeostasis and host defense. *Adv Exp Med Biol* 479, 1-14.
- Liu, P., Hudson, L.C., Tompkins, M.B., Vahlenkamp, T.W., Meeker, R.B., 2006. Compartmentalization and evolution of feline immunodeficiency virus between the central nervous system and periphery following intracerebroventricular or systemic inoculation. *Journal of neurovirology* 12, 307-321.
- Loo, Y.M., Gale, M., Jr., 2011. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 34, 680-692.
- Lucifora, J., Xia, Y., Reisinger, F., Zhang, K., Stadler, D., Cheng, X., Sprinzl, M.F., Koppensteiner, H., Makowska, Z., Volz, T., Remouchamps, C., Chou, W.M., Thasler, W.E., Huser, N., Durantel, D., Liang, T.J., Munk, C., Heim, M.H., Browning, J.L., Dejardin, E., Dandri, M., Schindler, M., Heikenwalder, M., Protzer, U., 2014. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science* 343, 1221-1228.
- Luján, L., Badiola, J.J., García Marín, J.F., Moreno, B., Vargas, M.A., Fernández de Luco, D., Pérez, V., 1993. Seroprevalence of maedi-visna infection in sheep in the north-east of Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 15, 181-190.
- Lujan, L., Begara, I., Collie, D., Watt, N.J., 1994a. Ovine lentivirus (maedi-visna virus) protein expression in sheep alveolar macrophages. *Vet Pathol* 31, 695-703.
- Lujan, L., Begara, I., Collie, D.D.S., Watt, N.J., 1994b. Ovine lentivirus (maedi-visna virus) protein expression in sheep alveolar macrophages. *Veterinary Pathology* 31, 695-703.
- Luo, K., Wang, T., Liu, B., Tian, C., Xiao, Z., Kappes, J., Yu, X.F., 2007. Cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3F interact with human immunodeficiency virus type 1 integrase and inhibit proviral DNA formation. *J Virol* 81, 7238-7248.
- Luo, K., Xiao, Z., Ehrlich, E., Yu, Y., Liu, B., Zheng, S., Yu, X.F., 2005. Primate lentiviral virion infectivity factors are substrate receptors that assemble with cullin 5-E3 ligase through a HCCH motif to suppress APOBEC3G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11444-11449.
- Lyall, J.W., Solanky, N., Tiley, L.S., 2000. Restricted species tropism of maedi-visna virus strain EV-1 is not due to limited receptor distribution. *J Gen Virol* 81, 2919-2927.
- Mahieux, R., Suspene, R., Delebecque, F., Henry, M., Schwartz, O., Wain-Hobson, S., Vartanian, J.P., 2005. Extensive editing of a small fraction of human T-cell leukemia virus type 1 genomes by four APOBEC3 cytidine deaminases. *J Gen Virol* 86, 2489-2494.
- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., Trono, D., 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424, 99-103.
- Mariani, R., Chen, D., Schrofelbauer, B., Navarro, F., Konig, R., Bollman, B., Munk, C., Nymark-McMahon, H., Landau, N.R., 2003. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* 114, 21-31.

- Marino, D., Perkovic, M., Hain, A., Jaguva Vasudevan, A.A., Hofmann, H., Hanschmann, K.M., Muhlebach, M.D., Schumann, G.G., Konig, R., Cichutek, K., Haussinger, D., Munk, C., 2016. APOBEC4 Enhances the Replication of HIV-1. *PLoS One* 11, e0155422.
- Markwell, M.A., Fredman, P., Svennerholm, L., 1984a. Receptor ganglioside content of three hosts for Sendai virus. MDBK, HeLa, and MDCK cells. *Biochim Biophys Acta* 775, 7-16.
- Markwell, M.A., Fredman, P., Svennerholm, L., 1984b. Specific gangliosides are receptors for Sendai virus. Proteins in lipid samples can mask positive biological effects. *Adv Exp Med Biol* 174, 369-379.
- Martinez-Navalon, B., Peris, C., Gomez, E.A., Peris, B., Roche, M.L., Caballero, C., Goyena, E., Berriatua, E., 2013. Quantitative estimation of the impact of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production by dairy goats. *Vet J* 197, 311-317.
- Marty, A., Meanger, J., Mills, J., Shields, B., Ghildyal, R., 2004. Association of matrix protein of respiratory syncytial virus with the host cell membrane of infected cells. *Arch Virol* 149, 199-210.
- Masaki, I., Yonemitsu, Y., Komori, K., Ueno, H., Nakashima, Y., Nakagawa, K., Fukumura, M., Kato, A., Hasan, M.K., Nagai, Y., Sugimachi, K., Hasegawa, M., Sueishi, K., 2001. Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer to vasculature: a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system. *FASEB J* 15, 1294-1296.
- Matano, T., Kobayashi, M., Igarashi, H., Takeda, A., Nakamura, H., Kano, M., Sugimoto, C., Mori, K., Iida, A., Hirata, T., Hasegawa, M., Yuasa, T., Miyazawa, M., Takahashi, Y., Yasunami, M., Kimura, A., O'Connor, D.H., Watkins, D.I., Nagai, Y., 2004. Cytotoxic T lymphocyte-based control of simian immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial. *J Exp Med* 199, 1709-1718.
- Mathur, R., Oh, H., Zhang, D., Park, S.G., Seo, J., Koblansky, A., Hayden, M.S., Ghosh, S., 2012. A mouse model of Salmonella typhi infection. *Cell* 151, 590-602.
- Mbisa, J.L., Barr, R., Thomas, J.A., Vandegraaff, N., Dorweiler, I.J., Svarovskaia, E.S., Brown, W.L., Mansky, L.M., Gorelick, R.J., Harris, R.S., Engelman, A., Pathak, V.K., 2007. Human immunodeficiency virus type 1 cDNAs produced in the presence of APOBEC3G exhibit defects in plus-strand DNA transfer and integration. *J Virol* 81, 7099-7110.
- McGuire, K., Jones, M., Werling, D., Williams, J.L., Glass, E.J., Jann, O., 2006. Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. *Animal genetics* 37, 47-50.
- McGuire, T.C., Adams, D.S., Johnson, G.C., Klevjer-Anderson, P., Barbee, D.D., Gorham, J.R., 1986. Acute arthritis in caprine arthritis-encephalitis virus challenge exposure of vaccinated or persistently infected goats. *American journal of veterinary research* 47, 537-540.
- McInnes, E.F., Rasmussen, L., Fung, P., Auld, A.M., Alvarez, L., Lawrence, D.A., Quinn, M.E., del Fierro, G.M., Vassallo, B.A., Stevenson, R., 2011. Prevalence of viral, bacterial and parasitological diseases in rats and mice used in research environments in Australasia over a 5-y period. *Lab Anim (NY)* 40, 341-350.
- McNatt, M.W., Zang, T., Hatzioannou, T., Bartlett, M., Fofana, I.B., Johnson, W.E., Neil, S.J., Bieniasz, P.D., 2009. Species-specific activity of HIV-1 Vpu and positive selection of tetherin transmembrane domain variants. *PLoS Pathog* 5, e1000300.
- Medzhitov, R., 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819-826.
- Mercado-Lopez, X., Cotter, C.R., Kim, W.K., Sun, Y., Munoz, L., Tapia, K., Lopez, C.B., 2013. Highly immunostimulatory RNA derived from a Sendai virus defective viral genome. *Vaccine* 31, 5713-5721.
- Michiels, R., Van Mael, E., Quinet, C., Adjadj, N.R., Cay, A.B., De Regge, N., 2018. Comparative Analysis of Different Serological and Molecular Tests for the Detection of Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs) in Belgian Sheep and Goats. *Viruses* 10.
- Mikula, I., Bhide, M., Pastorekova, S., Mikula, I., 2010. Characterization of ovine TLR7 and TLR8 protein coding regions, detection of mutations and Maedi Visna virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 138, 51-59.

- Mikula, I., Jr., Mikula, I., Sr., 2011. Characterization of ovine Toll-like receptor 9 protein coding region, comparative analysis, detection of mutations and maedi visna infection. *Dev Comp Immunol* 35, 182-192.
- Milhau, N., Bellaton, C., Balleydier, S., Gaonach, M., Le Jan, C., 2003. In vitro infection of aortic endothelial cells by caprine arthritis encephalitis virus enhances in vitro transmigration of peripheral blood leukocytes and modulates their phenotypic expression. *Vet Res* 34, 273-284.
- Minardi da Cruz, J.C., Singh, D.K., Lamara, A., Chebloune, Y., 2013. Small ruminant lentiviruses (SRLVs) break the species barrier to acquire new host range. *Viruses* 5, 1867-1884.
- Miyagi, E., Kao, S., Yedavalli, V., Strelbel, K., 2014. CBFbeta enhances de novo protein biosynthesis of its binding partners HIV-1 Vif and RUNX1 and potentiates the Vif-induced degradation of APOBEC3G. *J Virol* 88, 4839-4852.
- Modolo, J.R., Stachissini, A.V.M., Padovani, C.R., Araujo Júnior, J.P., Castro, R.S., Ravazzolo, A.P., Leite, B.L.S., 2009. PCR associated with agar gel immunodiffusion assay improve caprine arthritis-encephalitis (CAEV) control. *Small Ruminant Research* 81, 18-20.
- Mohanram, V., Skold, A.E., Bachle, S.M., Pathak, S.K., Spetz, A.L., 2013. IFN- α induces APOBEC3G, F, and A in immature dendritic cells and limits HIV-1 spread to CD4+ T cells. *J Immunol* 190, 3346-3353.
- Mordasini, F., Vogt, H.R., Zahno, M.L., Maeschli, A., Nenci, C., Zanoni, R., Peterhans, E., Bertoni, G., 2006. Analysis of the antibody response to an immunodominant epitope of the envelope glycoprotein of a lentivirus and its diagnostic potential. *J Clin Microbiol* 44, 981-991.
- Morin, T., Guiguen, F., Bouzar, B.A., Villet, S., Greenland, T., Grezel, D., Gounel, F., Gallay, K., Garnier, C., Durand, J., Alogninouwa, T., Mselli-Lakhal, L., Mornex, J.F., Chebloune, Y., 2003. Clearance of a productive lentivirus infection in calves experimentally inoculated with caprine arthritis-encephalitis virus. *J Virol* 77, 6430-6437.
- Moriya, C., Horiba, S., Kurihara, K., Kamada, T., Takahara, Y., Inoue, M., Iida, A., Hara, H., Shu, T., Hasegawa, M., Matano, T., 2011. Intranasal Sendai viral vector vaccination is more immunogenic than intramuscular under pre-existing anti-vector antibodies. *Vaccine* 29, 8557-8563.
- Moriya, C., Shioda, T., Tashiro, K., Nagasawa, T., Ikegawa, M., Ohnishi, Y., Kato, A., Hu, H., Xin, X., Hasan, M.K., Maekawa, M., Takebe, Y., Sakai, Y., Honjo, T., Nagai, Y., 1998. Large quantity production with extreme convenience of human SDF-1 α and SDF-1 β by a Sendai virus vector. *FEBS Lett* 425, 105-111.
- Morodomi, Y., Yano, T., Kinoh, H., Harada, Y., Saito, S., Kyuragi, R., Yoshida, K., Onimaru, M., Shoji, F., Yoshida, T., Ito, K., Shikada, Y., Maruyama, R., Hasegawa, M., Maehara, Y., Yonemitsu, Y., 2012. BioKnife, a uPA activity-dependent oncolytic Sendai virus, eliminates pleural spread of malignant mesothelioma via simultaneous stimulation of uPA expression. *Mol Ther* 20, 769-777.
- Mselli-Lakhal, L., Favier, C., Leung, K., Guiguen, F., Grezel, D., Miossec, P., Mornex, J.F., Narayan, O., Querat, G., Chebloune, Y., 2000. Lack of functional receptors is the only barrier that prevents caprine arthritis-encephalitis virus from infecting human cells. *J Virol* 74, 8343-8348.
- Mselli-Lakhal, L., Guiguen, F., Fornazero, C., Du, J., Favier, C., Durand, J., Grezel, D., Balleydier, S., Mornex, J.F., Chebloune, Y., 1999. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. *Virology* 259, 67-73.
- Mselli-Lakhal, L., Guiguen, F., Fornazero, C., Favier, C., Durand, J., Grezel, D., Moussa, A., Mornex, J.F., Chebloune, Y., 2001. Immortalized goat milk epithelial cell lines replicate CAEV at high level. *Vet Res* 32, 429-440.
- Murakami, Y., Ikeda, Y., Yonemitsu, Y., Tanaka, S., Kondo, H., Okano, S., Kohno, R., Miyazaki, M., Inoue, M., Hasegawa, M., Ishibashi, T., Sueishi, K., 2008. Newly-developed Sendai virus vector for retinal gene transfer: reduction of innate immune response via deletion of all envelope-related genes. *J Gene Med* 10, 165-176.

- Murphy, B., Hillman, C., Castillo, D., Vapniarsky, N., Rowe, J., 2012. The presence or absence of the gamma-activated site determines IFN gamma-mediated transcriptional activation in CAEV promoters cloned from the mammary gland and joint synovium of a single CAEV-infected goat. *Virus Res* 163, 537-545.
- Murphy, B., Jasmer, D.P., White, S.N., Knowles, D., 2007. Localization of a TNF-activated transcription site and interactions with the gamma activated site within the CAEV U3 70 base pair repeat. *Virology* 364, 196-207.
- Murphy, B., McElliott, V., Vapniarsky, N., Oliver, A., Rowe, J., 2010. Tissue tropism and promoter sequence variation in caprine arthritis encephalitis virus infected goats. *Virus Res* 151, 177-184.
- Murphy, B.G., Hotzel, I., Jasmer, D.P., Davis, W.C., Knowles, D., 2006. TNFalpha and GM-CSF-induced activation of the CAEV promoter is independent of AP-1. *Virology* 352, 188-199.
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J., 1999. *Veterinary virology*. Academic press.
- Murphy, K.M., Ouyang, W., Farrar, J.D., Yang, J., Ranganath, S., Asnagli, H., Afkarian, M., Murphy, T.L., 2000. Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol* 18, 451-494.
- Mussil, B., Saueremann, U., Motzkus, D., Stahl-Hennig, C., Sopper, S., 2011. Increased APOBEC3G and APOBEC3F expression is associated with low viral load and prolonged survival in simian immunodeficiency virus infected rhesus monkeys. *Retrovirology* 8, 77.
- Mussil, B., Suspene, R., Aynaud, M.M., Gauvrit, A., Vartanian, J.P., Wain-Hobson, S., 2013. Human APOBEC3A isoforms translocate to the nucleus and induce DNA double strand breaks leading to cell stress and death. *PLoS One* 8, e73641.
- Muz, D., Oguzoglu, T.C., Rosati, S., Reina, R., Bertolotti, L., Burgu, I., 2013. First molecular characterization of visna/maedi viruses from naturally infected sheep in Turkey. *Archives of Virology* 158, 559-570.
- Nagel-Alne, G.E., Asheim, L.J., Hardaker, J.B., Sølverød, L., Lindheim, D., Valle, P.S., 2014. The Norwegian Healthier Goats programme—A financial cost-benefit analysis. *Preventive veterinary medicine* 114, 96-105.
- Narayan, O., Clements, J.E., Griffin, D.E., Wolinsky, J.S., 1981. Neutralizing antibody spectrum determines the antigenic profiles of emerging mutants of visna virus. *Infection and immunity* 32, 1045-1050.
- Narayan, O., Griffin, D.E., Clements, J.E., 1978. Virus mutation during 'slow infection': temporal development and characterization of mutants of visna virus recovered from sheep. *J Gen Virol* 41, 343-352.
- Narayan, O., Kennedy-Stoskopf, S., Sheffer, D., Griffin, D.E., Clements, J.E., 1983. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infection and immunity* 41, 67-73.
- Narayan, O., Wolinsky, J.S., Clements, J.E., Strandberg, J.D., Griffin, D.E., Cork, L.C., 1982. Slow virus replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goats. *J Gen Virol* 59, 345-356.
- Narvaiza, I., Linfesty, D.C., Greener, B.N., Hakata, Y., Pintel, D.J., Logue, E., Landau, N.R., Weitzman, M.D., 2009. Deaminase-independent inhibition of parvoviruses by the APOBEC3A cytidine deaminase. *PLoS Pathog* 5, e1000439.
- Navarro, F., Bollman, B., Chen, H., Konig, R., Yu, Q., Chiles, K., Landau, N.R., 2005. Complementary function of the two catalytic domains of APOBEC3G. *Virology* 333, 374-386.
- Neil, S.J., Zang, T., Bieniasz, P.D., 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425-430.
- Nenci, C., Zahno, M.L., Vogt, H.R., Obexer-Ruff, G., Doherr, M.G., Zaroni, R., Peterhans, E., Bertoni, G., 2007. Vaccination with a T-cell-priming Gag peptide of caprine arthritis encephalitis virus enhances virus replication transiently in vivo. *J Gen Virol* 88, 1589-1593.

- Neogi, U., Shet, A., Sahoo, P.N., Bontell, I., Ekstrand, M.L., Banerjee, A.C., Sonnerborg, A., 2013. Human APOBEC3G-mediated hypermutation is associated with antiretroviral therapy failure in HIV-1 subtype C-infected individuals. *J Int AIDS Soc* 16, 18472.
- Niavarani, A., Currie, E., Rey, Y., Anjos-Afonso, F., Horswell, S., Griessinger, E., Luis Sardina, J., Bonnet, D., 2015. APOBEC3A is implicated in a novel class of G-to-A mRNA editing in WT1 transcripts. *PLoS One* 10, e0120089.
- Niesalla, H., de Andres, X., Barbezange, C., Fraissier, C., Reina, R., Arnarson, H., Biescas, E., Mazzei, M., McNeilly, T.N., Liu, C., Watkins, C., Perez, M., Carrozza, M.L., Bandecchi, P., Solano, C., Crespo, H., Glaria, I., Huard, C., Shaw, D.J., de Blas, I., de Andres, D., Tolari, F., Rosati, S., Suzan-Monti, M., Andresdottir, V., Torsteinsdottir, S., Petursson, G., Badiola, J., Lujan, L., Pepin, M., Amorena, B., Blacklaws, B., Harkiss, G.D., 2009. Systemic DNA immunization against ovine lentivirus using particle-mediated epidermal delivery and modified vaccinia Ankara encoding the gag and/or env genes. *Vaccine* 27, 260-269.
- Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Alexandrov, L.B., Petljak, M., Butler, A.P., Bolli, N., Davies, H.R., Knappskog, S., Martin, S., Papaemmanuil, E., Ramakrishna, M., Shlien, A., Simonic, I., Xue, Y., Tyler-Smith, C., Campbell, P.J., Stratton, M.R., 2014. Association of a germline copy number polymorphism of APOBEC3A and APOBEC3B with burden of putative APOBEC-dependent mutations in breast cancer. *Nat Genet* 46, 487-491.
- Nishimura, K., Sano, M., Ohtaka, M., Furuta, B., Umemura, Y., Nakajima, Y., Ikehara, Y., Kobayashi, T., Segawa, H., Takayasu, S., Sato, H., Motomura, K., Uchida, E., Kanayasu-Toyoda, T., Asashima, M., Nakauchi, H., Yamaguchi, T., Nakanishi, M., 2011. Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem* 286, 4760-4771.
- Nisole, S., Stoye, J.P., Saib, A., 2005. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 3, 799-808.
- Nitta, T., Lee, S., Ha, D., Arias, M., Kozak, C.A., Fan, H., 2012. Moloney murine leukemia virus glyco-gag facilitates xenotropic murine leukemia virus-related virus replication through human APOBEC3-independent mechanisms. *Retrovirology* 9, 58.
- Noguera-Julian, M., Cozzi-Lepri, A., Di Giallonardo, F., Schuurman, R., Daumer, M., Aitken, S., Ceccherini-Silberstein, F., D'Arminio Monforte, A., Geretti, A.M., Booth, C.L., Kaiser, R., Michalik, C., Jansen, K., Masquelier, B., Bellecave, P., Kouyos, R.D., Castro, E., Furrer, H., Schultze, A., Gunthard, H.F., Brun-Vezinet, F., Metzner, K.J., Paredes, R., group, C.M.H.-V.W., 2016. Contribution of APOBEC3G/F activity to the development of low-abundance drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants. *Clin Microbiol Infect* 22, 191-200.
- Nyombayire, J., Anzala, O., Gazzard, B., Karita, E., Bergin, P., Hayes, P., Kopycinski, J., Omosa-Manyonyi, G., Jackson, A., Bizimana, J., Farah, B., Sayeed, E., Parks, C.L., Inoue, M., Hironaka, T., Hara, H., Shu, T., Matano, T., Dally, L., Barin, B., Park, H., Gilmour, J., Lombardo, A., Excler, J.L., Fast, P., Laufer, D.S., Cox, J.H., Team, S.S., 2017. First-in-Human Evaluation of the Safety and Immunogenicity of an Intranasally Administered Replication-Competent Sendai Virus-Vectored HIV Type 1 Gag Vaccine: Induction of Potent T-Cell or Antibody Responses in Prime-Boost Regimens. *J Infect Dis* 215, 95-104.
- Ogino, T., Kobayashi, M., Iwama, M., Mizumoto, K., 2005. Sendai virus RNA-dependent RNA polymerase L protein catalyzes cap methylation of virus-specific mRNA. *J Biol Chem* 280, 4429-4435.
- Ohmine, S., Sakuma, R., Sakuma, T., Thatava, T., Takeuchi, H., Ikeda, Y., 2011. The antiviral spectra of TRIM5alpha orthologues and human TRIM family proteins against lentiviral production. *PLoS One* 6, e16121.
- Okeoma, C.M., Lovsin, N., Peterlin, B.M., Ross, S.R., 2007. APOBEC3 inhibits mouse mammary tumour virus replication in vivo. *Nature* 445, 927-930.
- Olech, M., Rachid, A., Croise, B., Kuzmak, J., Valas, S., 2012. Genetic and antigenic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in Poland. *Virus Res* 163, 528-536.

- Olivier, M., Berthon, P., Chastang, J., Cordier, G., Lantier, F., 2001. Establishment and characterisation of ovine blood monocyte-derived cell lines. *Vet Immunol Immunopathol* 82, 139-151.
- Ooms, M., Krikoni, A., Kress, A.K., Simon, V., Munk, C., 2012. APOBEC3A, APOBEC3B, and APOBEC3H haplotype 2 restrict human T-lymphotropic virus type 1. *J Virol* 86, 6097-6108.
- Opi, S., Kao, S., Goila-Gaur, R., Khan, M.A., Miyagi, E., Takeuchi, H., Strebel, K., 2007. Human immunodeficiency virus type 1 Vif inhibits packaging and antiviral activity of a degradation-resistant APOBEC3G variant. *J Virol* 81, 8236-8246.
- Oskarsson, T., Hreggvidsdottir, H.S., Agnarsdottir, G., Matthiasdottir, S., Ogmundsdottir, M.H., Jonsson, S.R., Georgsson, G., Ingvarsson, S., Andresson, O.S., Andresdottir, V., 2007. Duplicated sequence motif in the long terminal repeat of maedi-visna virus extends cell tropism and is associated with neurovirulence. *J Virol* 81, 4052-4057.
- Osterlund, P., Veckman, V., Siren, J., Klucher, K.M., Hiscott, J., Matikainen, S., Julkunen, I., 2005. Gene expression and antiviral activity of alpha/beta interferons and interleukin-29 in virus-infected human myeloid dendritic cells. *J Virol* 79, 9608-9617.
- Palsson, P.A., 1978. Maedi/Visna, a slow virus disease. *Bull Off int Epiz* 89, 465-475.
- Panei, C.J., Gos, M.L., Valera, A.R., Galosi, C.M., Echeverria, M.G., 2017. First isolation and nucleotide comparison of the gag gene of the caprine arthritis encephalitis virus circulating in naturally infected goats from Argentina. *Open veterinary journal* 7, 32-35.
- Park, A., Hong, P., Won, S.T., Thibault, P.A., Vigant, F., Oguntuyo, K.Y., Taft, J.D., Lee, B., 2016. Sendai virus, an RNA virus with no risk of genomic integration, delivers CRISPR/Cas9 for efficient gene editing. *Mol Ther Methods Clin Dev* 3, 16057.
- Patton, K.M., Bildfell, R.J., Anderson, M.L., Cebra, C.K., Valentine, B.A., 2012. Fatal Caprine arthritis encephalitis virus-like infection in 4 Rocky Mountain goats (*Oreamnos americanus*). *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 24, 392-396.
- Pauls, E., Ruiz, A., Riveira-Munoz, E., Permanyer, M., Badia, R., Clotet, B., Keppler, O.T., Ballana, E., Este, J.A., 2014. p21 regulates the HIV-1 restriction factor SAMHD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E1322-1324.
- Peeters, M., Sharp, P.M., 2000. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *Aids* 14 Suppl 3, S129-140.
- Peluso, R., Haase, A., Stowring, L., Edwards, M., Ventura, P., 1985. A Trojan Horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes. *Virology* 147, 231-236.
- Peng, G., Greenwell-Wild, T., Nares, S., Jin, W., Lei, K.J., Rangel, Z.G., Munson, P.J., Wahl, S.M., 2007. Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression. *Blood* 110, 393-400.
- Peng, G., Lei, K.J., Jin, W., Greenwell-Wild, T., Wahl, S.M., 2006. Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity. *J Exp Med* 203, 41-46.
- Pepin, M., Vitu, C., Russo, P., Mornex, J.F., Peterhans, E., 1998. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Vet Res* 29, 341-367.
- Perez-Caballero, D., Zang, T., Ebrahimi, A., McNatt, M.W., Gregory, D.A., Johnson, M.C., Bieniasz, P.D., 2009. Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell* 139, 499-511.
- Perez, M., Biescas, E., de Andres, X., Leginagoikoa, I., Salazar, E., Berriatua, E., Reina, R., Bolea, R., de Andres, D., Juste, R.A., Cancer, J., Gracia, J., Amorena, B., Badiola, J.J., Lujan, L., 2010. Visna/maedi virus serology in sheep: survey, risk factors and implementation of a successful control programme in Aragon (Spain). *Vet J* 186, 221-225.
- Perez, M., Munoz, J.A., Biescas, E., Salazar, E., Bolea, R., de Andres, D., Amorena, B., Badiola, J.J., Reina, R., Lujan, L., 2013. Successful Visna/maedi control in a highly infected ovine dairy flock using serologic segregation and management strategies. *Prev Vet Med* 112, 423-427.

- Perry, L.L., Wilkerson, M.J., Hullinger, G.A., Cheevers, W.P., 1995. Depressed CD4+ T lymphocyte proliferative response and enhanced antibody response to viral antigen in chronic lentivirus-induced arthritis. *J Infect Dis* 171, 328-334.
- Peterhans, E., Greenland, T., Badiola, J., Harkiss, G., Bertoni, G., Amorena, B., Eliaszewicz, M., Juste, R.A., Krassnig, R., Lafont, J.P., Lenihan, P., Petursson, G., Pritchard, G., Thorley, J., Vitu, C., Mornex, J.F., Pepin, M., 2004. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet Res* 35, 257-274.
- Peters, K., Chattopadhyay, S., Sen, G.C., 2008. IRF-3 activation by Sendai virus infection is required for cellular apoptosis and avoidance of persistence. *J Virol* 82, 3500-3508.
- Peterson, K., Brinkhof, J., Houwers, D.J., Colenbrander, B., Gadella, B.M., 2008. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology* 69, 433-442.
- Petursson, G., Matthiasdottir, S., Svansson, V., Andresdottir, V., Georgsson, G., Martin, A.H., Agnarsdottir, G., Gisladdottir, E., Arnadottir, S., Hognadottir, S., Jonsson, S.R., Andresson, O.S., Torsteinsdottir, S., 2005. Mucosal vaccination with an attenuated maedi-visna virus clone. *Vaccine* 23, 3223-3228.
- Pham, P., Landolph, A., Mendez, C., Li, N., Goodman, M.F., 2013. A biochemical analysis linking APOBEC3A to disparate HIV-1 restriction and skin cancer. *J Biol Chem* 288, 29294-29304.
- Pinczowski, P., Sanjose, L., Gimeno, M., Crespo, H., Glaria, I., Amorena, B., de Andres, D., Perez, M., Reina, R., Lujan, L., 2017. Small Ruminant Lentiviruses in Sheep: Pathology and Tropism of 2 Strains Using the Bone Marrow Route. *Vet Pathol* 54, 413-424.
- Pisoni, G., Bertoni, G., Manarolla, G., Vogt, H.R., Scaccabarozzi, L., Locatelli, C., Moroni, P., 2010. Genetic analysis of small ruminant lentiviruses following lactogenic transmission. *Virology* 407, 91-99.
- Pisoni, G., Moroni, P., Turin, L., Bertoni, G., 2007. Compartmentalization of small ruminant lentivirus between blood and colostrum in infected goats. *Virology*.
- Pisoni, G., Quasso, A., Moroni, P., 2005. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology* 339, 147-152.
- Pizzato, M., Erlwein, O., Bonsall, D., Kaye, S., Muir, D., McClure, M.O., 2009. A one-step SYBR Green I-based product-enhanced reverse transcriptase assay for the quantitation of retroviruses in cell culture supernatants. *J Virol Methods* 156, 1-7.
- Pryciak, P.M., Varmus, H.E., 1992. Fv-1 restriction and its effects on murine leukemia virus integration in vivo and in vitro. *J Virol* 66, 5959-5966.
- Querat, G., Barban, V., Sauze, N., Filippi, P., Vigne, R., Russo, P., Vitu, C., 1984. Highly lytic and persistent lentiviruses naturally present in sheep with progressive pneumonia are genetically distinct. *J Virol* 52, 672-679.
- Rambaut, A., Posada, D., Crandall, K.A., Holmes, E.C., 2004. The causes and consequences of HIV evolution. *Nat Rev Genet* 5, 52-61.
- Ramirez, H., Reina, R., Bertolotti, L., Cenoz, A., Glaria, I., Hernandez, M.M., Andres, X.d., Crespo, H., Jauregui, P., Benavides, J., Polledo, L., Perez, V., Garcia-Marin, J.F., Rosati, S., Amorena, B., Andres Cara, D.F.d., 2012. Study of compartmentalization in the visna clinical form of small ruminant lentivirus infection in sheep. *BMC Veterinary Research* 8.
- Reddy, K., Ooms, M., Letko, M., Garrett, N., Simon, V., Ndung'u, T., 2016. Functional characterization of Vif proteins from HIV-1 infected patients with different APOBEC3G haplotypes. *Aids* 30, 1723-1729.
- Reddy, P.G., Sapp, W.J., Heneine, W., 1993. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31, 3042-3043.
- Reddy, T.R., Kraus, G., Yamada, O., Looney, D.J., Suhasini, M., Wong-Staal, F., 1995. Comparative analyses of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2 Vif mutants. *J Virol* 69, 3549-3553.

- Refsland, E.W., Hultquist, J.F., Harris, R.S., 2012. Endogenous origins of HIV-1 G-to-A hypermutation and restriction in the nonpermissive T cell line CEM2n. *PLoS Pathog* 8, e1002800.
- Refsland, E.W., Stenglein, M.D., Shindo, K., Albin, J.S., Brown, W.L., Harris, R.S., 2010. Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues: implications for HIV-1 restriction. *Nucleic Acids Res* 38, 4274-4284.
- Reina, R., Barbezange, C., Niesalla, H., de Andres, X., Arnarson, H., Biescas, E., Mazzei, M., Fraiser, C., McNeilly, T.N., Liu, C., Perez, M., Carrozza, M.L., Bandecchi, P., Solano, C., Crespo, H., Glaria, I., Huard, C., Shaw, D.J., de Blas, I., de Andres, D., Tolari, F., Rosati, S., Suzan-Monti, M., Andresdottir, V., Torsteinsdottir, S., Petursson, G., Lujan, L., Pepin, M., Amorena, B., Blacklaws, B., Harkiss, G.D., 2008a. Mucosal immunization against ovine lentivirus using PEI-DNA complexes and modified vaccinia Ankara encoding the gag and/or env genes. *Vaccine* 26, 4494-4505.
- Reina, R., Berriatua, E., Lujan, L., Juste, R., Sanchez, A., de Andres, D., Amorena, B., 2008b. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update. *Vet J*.
- Reina, R., Bertolotti, L., Giudici, S.D., Puggioni, G., Ponti, N., Profiti, M., Patta, C., Rosati, S., 2010. Small ruminant lentivirus genotype E is widespread in Sarda goat. *Veterinary Microbiology* 144, 24-31.
- Reina, R., Glaria, I., Benavides, J., de Andres, X., Crespo, H., Solano, C., Perez, V., Lujan, L., Perez, M.M., Perez de la Lastra, J.M., Rosati, S., Blacklaws, B., Harkiss, G., de Andres, D., Amorena, B., 2007. Association of CD80 and CD86 expression levels with disease status of Visna/Maedi virus infected sheep. *Viral Immunol* 20, 609-622.
- Reina, R., Glaria, I., Cianca, S., Crespo, H., de Andres, X., Goni, C., Lasarte, J.M., Lujan, L., Amorena, B., de Andres, D.F., 2011a. Use of small ruminant lentivirus-infected rams for artificial insemination. *Veterinary Journal* 189, 106-107.
- Reina, R., Grego, E., Bertolotti, L., De Meneghi, D., Rosati, S., 2009a. Genome analysis of small-ruminant lentivirus genotype E: a caprine lentivirus with natural deletions of the dUTPase subunit, vpr-like accessory gene, and 70-base-pair repeat of the U3 region. *J Virol* 83, 1152-1155.
- Reina, R., Grego, E., Bertolotti, L., De Meneghi, D., Rosati, S., 2009b. Genome Analysis of Small-Ruminant Lentivirus Genotype E: a Caprine Lentivirus with Natural Deletions of the dUTPase Subunit, vpr-Like Accessory Gene, and 70-Base-Pair Repeat of the U3 Region. *Journal of virology* 83, 1152-1155.
- Reina, R., Grego, E., Profiti, M., Glaria, I., Robino, P., Quasso, A., Amorena, B., Rosati, S., 2009c. Development of specific diagnostic test for small ruminant lentivirus genotype E. *Veterinary Microbiology* 138, 251-257.
- Reina, R., Juganaru, M.M., Profiti, M., Cascio, P., Cerruti, F., Bertolotti, L., De Meneghi, D., Amorena, B., Rosati, S., 2011b. Immunological parameters in goats experimentally infected with SRLV genotype E, strain Roccaverano. *Vet Immunol Immunopathol* 139, 237-244.
- Reina, R., Mora, M.I., Glaria, I., Garcia, I., Solano, C., Lujan, L., Badiola, J.J., Contreras, A., Berriatua, E., Juste, R., Mamoun, R.Z., Rolland, M., Amorena, B., de Andres, D., 2006. Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Res* 121, 189-198.
- Reports, N.a., 2014. Animal health: Concern about 'out of sight, out of mind' attitude to maedi visna *Veterinary Record* 174, 645
- Richardson, S.R., Narvaiza, I., Planegger, R.A., Weitzman, M.D., Moran, J.V., 2014. APOBEC3A deaminates transiently exposed single-strand DNA during LINE-1 retrotransposition. *Elife* 3, e02008.
- Ritchie, C., Hosie, B., 2010. Increase in maedi-visna breakdowns. *Vet Rec* 167, 389.
- Ritchie, C., Hosie, B., 2014. Concern over maedi visna breakdowns. *Vet Rec* 175, 50-51.
- Roberts, J.D., Bebenek, K., Kunkel, T.A., 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 242, 1171-1173.

- Rosati, S., Kwang, J., Keen, J.E., 1995. Genome analysis of North American small ruminant lentiviruses by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 7, 437-443.
- Rott, R., Waterson, A.P., Reda, I.M., 1963. Characterization of "Soluble" Antigens Derived from Cells Infected with Sendai and Newcastle Disease Viruses. *Virology* 21, 663-665.
- Russell, C.J., Jardetzky, T.S., Lamb, R.A., 2001. Membrane fusion machines of paramyxoviruses: capture of intermediates of fusion. *EMBO J* 20, 4024-4034.
- Russell, C.J., Luque, L.E., 2006. The structural basis of paramyxovirus invasion. *Trends Microbiol* 14, 243-246.
- Russell, R.A., Moore, M.D., Hu, W.S., Pathak, V.K., 2009a. APOBEC3G induces a hypermutation gradient: purifying selection at multiple steps during HIV-1 replication results in levels of G-to-A mutations that are high in DNA, intermediate in cellular viral RNA, and low in virion RNA. *Retrovirology* 6, 16.
- Russell, R.A., Smith, J., Barr, R., Bhattacharyya, D., Pathak, V.K., 2009b. Distinct domains within APOBEC3G and APOBEC3F interact with separate regions of human immunodeficiency virus type 1 Vif. *J Virol* 83, 1992-2003.
- Ryan, S., Tiley, L., McConnell, I., Blacklaws, B., 2000. Infection of dendritic cells by the Maedi-Visna lentivirus. *J Virol* 74, 10096-10103.
- Ryoo, J., Choi, J., Oh, C., Kim, S., Seo, M., Kim, S.Y., Seo, D., Kim, J., White, T.E., Brandariz-Nunez, A., Diaz-Griffero, F., Yun, C.H., Hollenbaugh, J.A., Kim, B., Baek, D., Ahn, K., 2014. The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. *Nat Med* 20, 936-941.
- Sadler, H.A., Stenglein, M.D., Harris, R.S., Mansky, L.M., 2010. APOBEC3G contributes to HIV-1 variation through sublethal mutagenesis. *J Virol* 84, 7396-7404.
- Sakai, Y., Kiyotani, K., Fukumura, M., Asakawa, M., Kato, A., Shioda, T., Yoshida, T., Tanaka, A., Hasegawa, M., Nagai, Y., 1999. Accommodation of foreign genes into the Sendai virus genome: sizes of inserted genes and viral replication. *FEBS Lett* 456, 221-226.
- Sakuma, R., Ohmine, S., Ikeda, Y., 2010. Determinants for the rhesus monkey TRIM5alpha-mediated block of the late phase of HIV-1 replication. *J Biol Chem* 285, 3784-3793.
- Sakuma, T., Noda, T., Urata, S., Kawaoka, Y., Yasuda, J., 2009. Inhibition of Lassa and Marburg virus production by tetherin. *J Virol* 83, 2382-2385.
- Saltarelli, M., Querat, G., Konings, D.A., Vigne, R., Clements, J.E., 1990. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology* 179, 347-364.
- Saman, E., Van Eynde, G., Lujan, L., Extramiana, B., Harkiss, G., Tolari, F., Gonzalez, L., Amorena, B., Watt, N., Badiola, J., 1999. A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 6, 734-740.
- Sanchez-Aparicio, M.T., Garcin, D., Rice, C.M., Kolakofsky, D., Garcia-Sastre, A., Baum, A., 2017. Loss of Sendai virus C protein leads to accumulation of RIG-I immunostimulatory defective interfering RNA. *J Gen Virol* 98, 1282-1293.
- Sanchez, A.B., Rodriguez, D., Garzon, A., Amorena, B., Esteban, M., Rodriguez, J.R., 2002. Visna/maedi virus Env protein expressed by a vaccinia virus recombinant induces cell-to-cell fusion in cells of different origins in the apparent absence of Env cleavage: role of glycosylation and of proteoglycans. *Arch Virol* 147, 2377-2392.
- Sanchez, J.H., Martinez, H.A., Garcia, M.M., Garrido, G., Gomez, L., Aguilar, J.A., de Andres, D.F., Reina, R., Ramirez, H., 2016. The presence of small ruminant lentiviruses in Mexican Pelibuey sheep. *Theriogenology* 86, 1953-1957 e1951.
- Sanjose, L., Crespo, H., Blatti-Cardinaux, L., Glaria, I., Martinez-Carrasco, C., Berriatua, E., Amorena, B., De Andres, D., Bertoni, G., Reina, R., 2016. Post-entry blockade of small ruminant lentiviruses by wild ruminants. *Vet Res* 47, 1.
- Santoni de Sio, F.R., Trono, D., 2009. APOBEC3G-depleted resting CD4+ T cells remain refractory to HIV1 infection. *PLoS One* 4, e6571.

- Santry, L.A., de Jong, J., Gold, A.C., Walsh, S.R., Menzies, P.I., Wootton, S.K., 2013. Genetic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in naturally infected sheep and goats in Ontario, Canada. *Virus Res* 175, 30-44.
- Sarafidou, T., Stamatis, C., Kalozoumi, G., Spyrou, V., Fthenakis, G.C., Billinis, C., Mamuris, Z., 2013. Toll like receptor 9 (TLR9) polymorphism G520R in sheep is associated with seropositivity for Small Ruminant Lentivirus. *PLoS One* 8, e63901.
- Sargan, D.R., Bennet, I.D., Cousens, C., Roy, D.J., Blacklaws, B.A., Dalziel, R.G., Watt, N.J., McConnell, I., 1991. Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi-visna virus. *J Gen Virol* 72 (Pt 8), 1893-1903.
- Schaller, T., Hue, S., Towers, G.J., 2007. An active TRIM5 protein in rabbits indicates a common antiviral ancestor for mammalian TRIM5 proteins. *J Virol* 81, 11713-11721.
- Schmitt, K., Guo, K., Algaier, M., Ruiz, A., Cheng, F., Qiu, J., Wissing, S., Santiago, M.L., Stephens, E.B., 2011. Differential virus restriction patterns of rhesus macaque and human APOBEC3A: implications for lentivirus evolution. *Virology* 419, 24-42.
- Schnell, M.J., Mebatsion, T., Conzelmann, K.K., 1994. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J* 13, 4195-4203.
- Schrofelbauer, B., Senger, T., Manning, G., Landau, N.R., 2006. Mutational alteration of human immunodeficiency virus type 1 Vif allows for functional interaction with nonhuman primate APOBEC3G. *J Virol* 80, 5984-5991.
- Seplyarskiy, V.B., Andrianova, M.A., Bazykin, G.A., 2017. APOBEC3A/B-induced mutagenesis is responsible for 20% of heritable mutations in the TpCpW context. *Genome Res* 27, 175-184.
- Shah, C., Boni, J., Huder, J.B., Vogt, H.R., Muhlherr, J., Zanoni, R., Miserez, R., Lutz, H., Schupbach, J., 2004a. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology* 319, 12-26.
- Shah, C., Huder, J.B., Boni, J., Schonmann, M., Muhlherr, J., Lutz, H., Schupbach, J., 2004b. Direct evidence for natural transmission of small-ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. *J Virol* 78, 7518-7522.
- Sharma, S., Patnaik, S.K., Taggart, R.T., Kannisto, E.D., Enriquez, S.M., Gollnick, P., Baysal, B.E., 2015. APOBEC3A cytidine deaminase induces RNA editing in monocytes and macrophages. *Nat Commun* 6, 6881.
- Sharp, P.M., Bailes, E., Gao, F., Beer, B.E., Hirsch, V.M., Hahn, B.H., 2000. Origins and evolution of AIDS viruses: estimating the time-scale. *Biochem Soc Trans* 28, 275-282.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., Malim, M.H., 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646-650.
- Shepherd, V.L., Lane, K.B., Abdolrasulnia, R., 1997. Ingestion of *Candida albicans* down-regulates mannose receptor expression on rat macrophages. *Arch Biochem Biophys* 344, 350-356.
- Shibata, S., Okano, S., Yonemitsu, Y., Onimaru, M., Sata, S., Nagata-Takeshita, H., Inoue, M., Zhu, T., Hasegawa, M., Moroi, Y., Furue, M., Sueishi, K., 2006. Induction of efficient antitumor immunity using dendritic cells activated by recombinant Sendai virus and its modulation by exogenous IFN-beta gene. *J Immunol* 177, 3564-3576.
- Si, Z., Vandegraaff, N., O'Huigin, C., Song, B., Yuan, W., Xu, C., Perron, M., Li, X., Marasco, W.A., Engelman, A., Dean, M., Sodroski, J., 2006. Evolution of a cytoplasmic tripartite motif (TRIM) protein in cows that restricts retroviral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7454-7459.
- Sider, L.H., Heaton, M.P., Chitko-McKown, C.G., Harhay, G.P., Smith, T.P., Leymaster, K.A., Laegreid, W.W., Clawson, M.L., 2013. Small ruminant lentivirus genetic subgroups associate with sheep TMEM154 genotypes. *Vet Res* 44, 64.
- Sigurdardottir, B., Thormar, H., 1964. Isolation of a Viral Agent from the Lungs of Sheep Affected with Maedi. *J Infect Dis* 114, 55-60.

- Sigurdsson, B., Grimsson, H., Pálsson, P.A., 1952. Maedi, a chronic, progressive infection of sheep's lungs. *J Infect Dis* 90, 233-241.
- Sigurdsson B, T.H., Pálsson P, 1960. Cultivation of visna virus in tissue culture. *Archiv für die gesamte Virusforschung* 10.
- Sihvonen, L., 1981. Early immune responses in experimental maedi. *Res Vet Sci* 30, 217-222.
- Sihvonen, L., 1984. Late immune responses in experimental maedi. *Veterinary Microbiology* 9, 205-213.
- Silvas, T.V., Hou, S., Myint, W., Nalivaika, E., Somasundaran, M., Kelch, B.A., Matsuo, H., Kurt Yilmaz, N., Schiffer, C.A., 2018. Substrate sequence selectivity of APOBEC3A implicates intra-DNA interactions. *Sci Rep* 8, 7511.
- Simon, J.H., Gaddis, N.C., Fouchier, R.A., Malim, M.H., 1998. Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype. *Nat Med* 4, 1397-1400.
- Singh, D.K., Chebloune, Y., Mselli-Lakhal, L., Karr, B.M., Narayan, O., 1999. Ovine lentivirus-infected macrophages mediate productive infection in cell types that are not susceptible to infection with cell-free virus. *J Gen Virol* 80 (Pt 6), 1437-1444.
- Singh, I., McConnell, I., Dalziel, R., Blacklaws, B.A., 2006. Serum containing ovine IgG2 antibody specific for maedi visna virus envelope glycoprotein mediates antibody dependent cellular cytotoxicity. *Vet Immunol Immunopathol* 113, 357-366.
- Slobod, K.S., Shenep, J.L., Lujan-Zilbermann, J., Allison, K., Brown, B., Scroggs, R.A., Portner, A., Coleclough, C., Hurwitz, J.L., 2004. Safety and immunogenicity of intranasal murine parainfluenza virus type 1 (Sendai virus) in healthy human adults. *Vaccine* 22, 3182-3186.
- Smith, H.C., Bennett, R.P., Kizilyer, A., McDougall, W.M., Prohaska, K.M., 2012. Functions and regulation of the APOBEC family of proteins. *Semin Cell Dev Biol* 23, 258-268.
- Smith, J.L., Pathak, V.K., 2010. Identification of specific determinants of human APOBEC3F, APOBEC3C, and APOBEC3DE and African green monkey APOBEC3F that interact with HIV-1 Vif. *J Virol* 84, 12599-12608.
- Smyth, R.P., Davenport, M.P., Mak, J., 2012. The origin of genetic diversity in HIV-1. *Virus Res* 169, 415-429.
- Song, B., Gold, B., O'Huigin, C., Javanbakht, H., Li, X., Stremlau, M., Winkler, C., Dean, M., Sodroski, J., 2005. The B30.2(SPRY) domain of the retroviral restriction factor TRIM5alpha exhibits lineage-specific length and sequence variation in primates. *J Virol* 79, 6111-6121.
- Sonza, S., Maerz, A., Deacon, N., Meanger, J., Mills, J., Crowe, S., 1996. Human immunodeficiency virus type 1 replication is blocked prior to reverse transcription and integration in freshly isolated peripheral blood monocytes. *J Virol* 70, 3863-3869.
- Soros, V.B., Yonemoto, W., Greene, W.C., 2007. Newly synthesized APOBEC3G is incorporated into HIV virions, inhibited by HIV RNA, and subsequently activated by RNase H. *PLoS Pathog* 3, e15.
- SRUC. Premium Sheep and Goat Health Schemes (Greycrook, St. Boswells, Melrose, Scotland's Rural College).
- Stanley, B.J., Ehrlich, E.S., Short, L., Yu, Y., Xiao, Z., Yu, X.F., Xiong, Y., 2008. Structural insight into the human immunodeficiency virus Vif SOCS box and its role in human E3 ubiquitin ligase assembly. *J Virol* 82, 8656-8663.
- Stavrou, S., Crawford, D., Blouch, K., Browne, E.P., Kohli, R.M., Ross, S.R., 2014. Different modes of retrovirus restriction by human APOBEC3A and APOBEC3G in vivo. *PLoS Pathog* 10, e1004145.
- Stenglein, M.D., Burns, M.B., Li, M., Lengyel, J., Harris, R.S., 2010. APOBEC3 proteins mediate the clearance of foreign DNA from human cells. *Nat Struct Mol Biol* 17, 222-229.
- Stonos, N., Wootton, S.K., Karrow, N., 2014. Immunogenetics of small ruminant lentiviral infections. *Viruses* 6, 3311-3333.

- Storset, A.K., Teig, A., Rimstad, E., 1996. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus RNA in macrophages by in situ hybridization using fluorescein-labelled single-stranded RNA probes. *Vet Microbiol* 52, 25-35.
- Strahle, L., Garcin, D., Kolakofsky, D., 2006. Sendai virus defective-interfering genomes and the activation of interferon-beta. *Virology* 351, 101-111.
- Strahle, L., Marq, J.B., Brini, A., Hausmann, S., Kolakofsky, D., Garcin, D., 2007. Activation of the beta interferon promoter by unnatural Sendai virus infection requires RIG-I and is inhibited by viral C proteins. *J Virol* 81, 12227-12237.
- Strebel, K., Daugherty, D., Clouse, K., Cohen, D., Folks, T., Martin, M.A., 1987. The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* 328, 728-730.
- Strebel, K., Klimkait, T., Martin, M.A., 1988. A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science* 241, 1221-1223.
- Stremlau, M., Owens, C.M., Perron, M.J., Kiessling, M., Autissier, P., Sodroski, J., 2004. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427, 848-853.
- Stremlau, M., Perron, M., Lee, M., Li, Y., Song, B., Javanbakht, H., Diaz-Griffero, F., Anderson, D.J., Sundquist, W.I., Sodroski, J., 2006. Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5514-5519.
- Suspene, R., Aynaud, M.M., Guetard, D., Henry, M., Eckhoff, G., Marchio, A., Pineau, P., Dejean, A., Vartanian, J.P., Wain-Hobson, S., 2011a. Somatic hypermutation of human mitochondrial and nuclear DNA by APOBEC3 cytidine deaminases, a pathway for DNA catabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4858-4863.
- Suspene, R., Aynaud, M.M., Koch, S., Padeloup, D., Labetoulle, M., Gaertner, B., Vartanian, J.P., Meyerhans, A., Wain-Hobson, S., 2011b. Genetic editing of herpes simplex virus 1 and Epstein-Barr herpesvirus genomes by human APOBEC3 cytidine deaminases in culture and in vivo. *J Virol* 85, 7594-7602.
- Suspene, R., Rusniok, C., Vartanian, J.P., Wain-Hobson, S., 2006. Twin gradients in APOBEC3 edited HIV-1 DNA reflect the dynamics of lentiviral replication. *Nucleic Acids Res* 34, 4677-4684.
- Synge, B.A., Ritchie, C.M., 2010. Elimination of small ruminant lentivirus infection from sheep flocks and goat herds aided by health schemes in Great Britain. *Vet Rec* 167, 739-743.
- Tahirov, T.H., Bushweller, J., 2017. Structure and Biophysics of CBFbeta/RUNX and Its Translocation Products. *Adv Exp Med Biol* 962, 21-31.
- Takeda, E., Nakagawa, S., Nakaya, Y., Tanaka, A., Miyazawa, T., Yasuda, J., 2012. Identification and functional analysis of three isoforms of bovine BST-2. *PLoS One* 7, e41483.
- Takeda, K., Akira, S., 2004. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16, 3-9.
- Takeda, K., Akira, S., 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17, 1-14.
- Tashiro, M., Seto, J.T., Choosakul, S., Yamakawa, M., Klenk, H.D., Rott, R., 1992. Budding site of Sendai virus in polarized epithelial cells is one of the determinants for tropism and pathogenicity in mice. *Virology* 187, 413-422.
- Taura, M., Song, E., Ho, Y.C., Iwasaki, A., 2019. Apobec3A maintains HIV-1 latency through recruitment of epigenetic silencing machinery to the long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 2282-2289.
- Taylor, B.J., Nik-Zainal, S., Wu, Y.L., Stebbings, L.A., Raine, K., Campbell, P.J., Rada, C., Stratton, M.R., Neuberger, M.S., 2013. DNA deaminases induce break-associated mutation showers with implication of APOBEC3B and 3A in breast cancer kataegis. *Elife* 2, e00534.
- Terai, C., Carson, D.A., 1991. Pyrimidine nucleotide and nucleic acid synthesis in human monocytes and macrophages. *Exp Cell Res* 193, 375-381.
- Thielen, B.K., Klein, K.C., Walker, L.W., Rieck, M., Buckner, J.H., Tomblinson, G.W., Lingappa, J.R., 2007. T cells contain an RNase-insensitive inhibitor of APOBEC3G deaminase activity. *PLoS Pathog* 3, 1320-1334.

- Thielen, B.K., McNevin, J.P., McElrath, M.J., Hunt, B.V., Klein, K.C., Lingappa, J.R., 2010. Innate immune signaling induces high levels of TC-specific deaminase activity in primary monocyte-derived cells through expression of APOBEC3A isoforms. *J Biol Chem* 285, 27753-27766.
- Thormar, H., 2013. The origin of lentivirus research: Maedi-visna virus. *Curr HIV Res* 11, 2-9.
- Tiley, L.S., Malim, M.H., Cullen, B.R., 1991. Conserved functional organization of the human immunodeficiency virus type 1 and visna virus Rev proteins. *J Virol* 65, 3877-3881.
- Tokusumi, T., Iida, A., Hirata, T., Kato, A., Nagai, Y., Hasegawa, M., 2002. Recombinant Sendai viruses expressing different levels of a foreign reporter gene. *Virus Res* 86, 33-38.
- Tomonaga, K., Norimine, J., Shin, Y.S., Fukasawa, M., Miyazawa, T., Adachi, A., Toyosaki, T., Kawaguchi, Y., Kai, C., Mikami, T., 1992. Identification of a feline immunodeficiency virus gene which is essential for cell-free virus infectivity. *J Virol* 66, 6181-6185.
- Toohey, K.L., Haase, A.T., 1994. The rev gene of visna virus is required for productive infection. *Virology* 200, 276-280.
- Torsteinsdottir, S., Agnarsdottir, G., Matthiasdottir, S., Rafnar, B., Andresdottir, V., Andresson, O.S., Staskus, K., Petursson, G., Palsson, P.A., Georgsson, G., 1997. In vivo and in vitro infection with two different molecular clones of visna virus. *Virology* 229, 370-380.
- Towers, G., Bock, M., Martin, S., Takeuchi, Y., Stoye, J.P., Danos, O., 2000. A conserved mechanism of retrovirus restriction in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12295-12299.
- Towers, G.J., 2007. The control of viral infection by tripartite motif proteins and cyclophilin A. *Retrovirology* 4, 40.
- Travassos, C.E., Benoît, C., Valas, S., da Silva, A.G., Perrin, G., 1999. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Ruminant Research* 32, 101-106.
- Trujillo, J.D., Hotzel, K.J., Snekvik, K.R., Cheevers, W.P., 2004. Antibody response to the surface envelope of caprine arthritis-encephalitis lentivirus: disease status is predicted by SU antibody isotype. *Virology* 325, 129-136.
- Tu, P.A., Shiu, J.S., Lee, S.H., Pang, V.F., Wang, D.C., Wang, P.H., 2017. Development of a recombinase polymerase amplification lateral flow dipstick (RPA-LFD) for the field diagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infection. *J Virol Methods* 243, 98-104.
- Turelli, P., Mangeat, B., Jost, S., Vianin, S., Trono, D., 2004. Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G. *Science* 303, 1829.
- Valas, S., Benoit, C., Guionaud, C., Perrin, G., Mamoun, R.Z., 1997. North American and French caprine arthritis-encephalitis viruses emerge from ovine maedi-visna viruses. *Virology* 237, 307-318.
- Valle-Casuso, J.C., Allouch, A., David, A., Lenzi, G.M., Studdard, L., Barre-Sinoussi, F., Muller-Trutwin, M., Kim, B., Pancino, G., Saez-Cirion, A., 2017. p21 Restricts HIV-1 in Monocyte-Derived Dendritic Cells through the Reduction of Deoxynucleoside Triphosphate Biosynthesis and Regulation of SAMHD1 Antiviral Activity. *J Virol* 91.
- Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R.L., Mitchell, R., Johnson, M.C., Stephens, E.B., Guatelli, J., 2008. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* 3, 245-252.
- Vartanian, J.P., Guetard, D., Henry, M., Wain-Hobson, S., 2008. Evidence for editing of human papillomavirus DNA by APOBEC3 in benign and precancerous lesions. *Science* 320, 230-233.
- Vartanian, J.P., Meyerhans, A., Asjo, B., Wain-Hobson, S., 1991. Selection, recombination, and G--A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes. *J Virol* 65, 1779-1788.
- Vazquez-Perez, J.A., Ormsby, C.E., Hernandez-Juan, R., Torres, K.J., Reyes-Teran, G., 2009. APOBEC3G mRNA expression in exposed seronegative and early stage HIV infected

- individuals decreases with removal of exposure and with disease progression. *Retrovirology* 6, 23.
- Venkatesh, S., Bieniasz, P.D., 2013. Mechanism of HIV-1 virion entrapment by tetherin. *PLoS Pathog* 9, e1003483.
- Vermeire, J., Naessens, E., Vanderstraeten, H., Landi, A., Iannucci, V., Van Nuffel, A., Taghon, T., Pizzato, M., Verhasselt, B., 2012. Quantification of reverse transcriptase activity by real-time PCR as a fast and accurate method for titration of HIV, lenti- and retroviral vectors. *PLoS One* 7, e50859.
- Vigerust, D.J., Egan, B.S., Shepherd, V.L., 2005. HIV-1 Nef mediates post-translational down-regulation and redistribution of the mannose receptor. *J Leukoc Biol* 77, 522-534.
- Villet, S., Bouzar, B.A., Morin, T., Verdier, G., Legras, C., Chebloune, Y., 2003a. Maedi-visna virus and caprine arthritis encephalitis virus genomes encode a Vpr-like but no Tat protein. *J Virol* 77, 9632-9638.
- Villet, S., Faure, C., Bouzar, B.A., Morin, T., Verdier, G., Chebloune, Y., Legras, C., 2003b. Lack of trans-activation function for Maedi Visna virus and Caprine arthritis encephalitis virus Tat proteins. *Virology* 307, 317-327.
- Wagner, J.M., Roganowicz, M.D., Skorupka, K., Alam, S.L., Christensen, D., Doss, G., Wan, Y., Frank, G.A., Ganser-Pornillos, B.K., Sundquist, W.I., Pornillos, O., 2016. Mechanism of B-box 2 domain-mediated higher-order assembly of the retroviral restriction factor TRIM5alpha. *Elife* 5.
- Wang, X.L., Wang, K., Han, G.C., Zeng, S.M., 2013. A potential autocrine role for interferon tau in ovine trophectoderm. *Reprod Domest Anim* 48, 819-825.
- Wen, H., Miao, E.A., Ting, J.P., 2013. Mechanisms of NOD-like receptor-associated inflammasome activation. *Immunity* 39, 432-441.
- White, S.N., Mousel, M.R., Herrmann-Hoesing, L.M., Reynolds, J.O., Leymaster, K.A., Neibergs, H.L., Lewis, G.S., Knowles, D.P., 2012. Genome-wide association identifies multiple genomic regions associated with susceptibility to and control of ovine lentivirus. *PLoS One* 7, e47829.
- White, S.N., Mousel, M.R., Reynolds, J.O., Herrmann-Hoesing, L.M., Knowles, D.P., 2014. Deletion variant near ZNF389 is associated with control of ovine lentivirus in multiple sheep flocks. *Animal genetics* 45, 297-300.
- White, S.N., Mousel, M.R., Reynolds, J.O., Lewis, G.S., Herrmann-Hoesing, L.M., 2009. Common promoter deletion is associated with 3.9-fold differential transcription of ovine CCR5 and reduced proviral level of ovine progressive pneumonia virus. *Animal genetics* 40, 583-589.
- White, T.E., Brandariz-Nunez, A., Valle-Casuso, J.C., Amie, S., Nguyen, L.A., Kim, B., Tuzova, M., Diaz-Griffero, F., 2013. The retroviral restriction ability of SAMHD1, but not its deoxynucleotide triphosphohydrolase activity, is regulated by phosphorylation. *Cell Host Microbe* 13, 441-451.
- Wiegand, H.L., Cullen, B.R., 2007. Inhibition of alpharetrovirus replication by a range of human APOBEC3 proteins. *J Virol* 81, 13694-13699.
- Xiao, Z., Xiong, Y., Zhang, W., Tan, L., Ehrlich, E., Guo, D., Yu, X.F., 2007. Characterization of a novel Cullin5 binding domain in HIV-1 Vif. *J Mol Biol* 373, 541-550.
- Xu, L.G., Wang, Y.Y., Han, K.J., Li, L.Y., Zhai, Z., Shu, H.B., 2005. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* 19, 727-740.
- Yan, N., Chen, Z.J., 2012. Intrinsic antiviral immunity. *Nat Immunol* 13, 214-222.
- Yonemitsu, Y., Kitson, C., Ferrari, S., Farley, R., Griesenbach, U., Judd, D., Steel, R., Scheid, P., Zhu, J., Jeffery, P.K., Kato, A., Hasan, M.K., Nagai, Y., Masaki, I., Fukumura, M., Hasegawa, M., Geddes, D.M., Alton, E.W., 2000. Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nat Biotechnol* 18, 970-973.
- Yonemitsu, Y., Matsumoto, T., Itoh, H., Okazaki, J., Uchiyama, M., Yoshida, K., Onimaru, M., Onohara, T., Inoguchi, H., Kyuragi, R., Shimokawa, M., Ban, H., Tanaka, M., Inoue, M., Shu,

- T., Hasegawa, M., Nakanishi, Y., Maehara, Y., 2013. DVC1-0101 to treat peripheral arterial disease: a Phase I/IIa open-label dose-escalation clinical trial. *Mol Ther* 21, 707-714.
- Yoneyama, M., Fujita, T., 2004. [RIG-I: critical regulator for virus-induced innate immunity]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 49, 2571-2578.
- Yoshikawa, R., Izumi, T., Nakano, Y., Yamada, E., Moriwaki, M., Misawa, N., Ren, F., Kobayashi, T., Koyanagi, Y., Sato, K., 2016. Small ruminant lentiviral Vif proteins commonly utilize cyclophilin A, an evolutionarily and structurally conserved protein, to degrade ovine and caprine APOBEC3 proteins. *Microbiol Immunol* 60, 427-436.
- Yu, S., Feng, X., Shu, T., Matano, T., Hasegawa, M., Wang, X., Ma, H., Li, H., Li, Z., Zeng, Y., 2008. Potent specific immune responses induced by prime-boost-boost strategies based on DNA, adenovirus, and Sendai virus vectors expressing gag gene of Chinese HIV-1 subtype B. *Vaccine* 26, 6124-6131.
- Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P., Yu, X.F., 2003. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 302, 1056-1060.
- Yu, Y., Xiao, Z., Ehrlich, E.S., Yu, X., Yu, X.F., 2004. Selective assembly of HIV-1 Vif-Cul5-ElonginB-ElonginC E3 ubiquitin ligase complex through a novel SOCS box and upstream cysteines. *Genes Dev* 18, 2867-2872.
- Zanoni, R.G., 1998. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *J Gen Virol* 79 (Pt 8), 1951-1961.
- Zanoni, R.G., Cordano, P., Nauta, I.M., Peterhans, E., 1996. PCR for the detection of lentiviruses from small ruminants. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde* 138, 93-98.
- Zanoni, R.G., Vogt, H.R., Pohl, B., Bottcher, J., Bommeli, W., Peterhans, E., 1994. An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. *Zentralbl Veterinarmed B* 41, 662-669.
- Zeilfelder, U., Bosch, V., 2001. Properties of wild-type, C-terminally truncated, and chimeric maedi-visna virus glycoprotein and putative pseudotyping of retroviral vector particles. *J Virol* 75, 548-555.
- Zhan, X., Hurwitz, J.L., Krishnamurthy, S., Takimoto, T., Boyd, K., Scroggs, R.A., Surman, S., Portner, A., Slobod, K.S., 2007. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein expressed by recombinant Sendai virus elicits B-cell and T-cell responses in cotton rats and confers protection against RSV subtypes A and B. *Vaccine* 25, 8782-8793.
- Zhang, F., Wilson, S.J., Landford, W.C., Virgen, B., Gregory, D., Johnson, M.C., Munch, J., Kirchhoff, F., Bieniasz, P.D., Hatziioannou, T., 2009. Nef proteins from simian immunodeficiency viruses are tetherin antagonists. *Cell Host Microbe* 6, 54-67.
- Zhang, J., Wu, J., Wang, W., Wu, H., Yu, B., Wang, J., Lv, M., Wang, X., Zhang, H., Kong, W., Yu, X., 2014a. Role of cullin-elonginB-elonginC E3 complex in bovine immunodeficiency virus and maedi-visna virus Vif-mediated degradation of host A3Z2-Z3 proteins. *Retrovirology* 11, 77.
- Zhang, W., Du, J., Evans, S.L., Yu, Y., Yu, X.F., 2011. T-cell differentiation factor CBF-beta regulates HIV-1 Vif-mediated evasion of host restriction. *Nature* 481, 376-379.
- Zhang, W., Wang, H., Li, Z., Liu, X., Liu, G., Harris, R.S., Yu, X.F., 2014b. Cellular requirements for bovine immunodeficiency virus Vif-mediated inactivation of bovine APOBEC3 proteins. *J Virol* 88, 12528-12540.
- Zhang, Z., Watt, N.J., Hopkins, J., Harkiss, G., Woodall, C.J., 2000. Quantitative analysis of maedi-visna virus DNA load in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *J Virol Methods* 86, 13-20.
- Zhao, Z., Li, Z., Huan, C., Wang, H., Su, X., Zhang, W., 2019. CAEV Vif Hijacks ElonginB/C, CYP A and Cullin5 to Assemble the E3 Ubiquitin Ligase Complex Stepwise to Degrade oaA3Z2-Z3. *Frontiers in Microbiology* 10.
- Zheng, Y.H., Jeang, K.T., Tokunaga, K., 2012. Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction. *Retrovirology* 9, 112.

- Zhong, B., Yang, Y., Li, S., Wang, Y.Y., Li, Y., Diao, F., Lei, C., He, X., Zhang, L., Tien, P., Shu, H.B., 2008. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* 29, 538-550.
- Zhu, S.L., Chen, X., Wang, L.J., Wan, W.W., Xin, Q.L., Wang, W., Xiao, G., Zhang, L.K., 2017. Global quantitative proteomic analysis profiles host protein expression in response to Sendai virus infection. *Proteomics* 17.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV) causan infecciones persistentes en ovinos y caprinos de todo el mundo, aumentando la tasa de reposición y disminuyendo el valor comercial de los rebaños. No se dispone de tratamientos ni de estrategias de vacunación que permitan la erradicación, por lo que el control de la infección se realiza mediante diagnóstico serológico. Se han implementado con éxito diferentes planes de control en todo el mundo, identificando animales seropositivos; sin embargo, la presencia de mutantes de escape al diagnóstico serológico, así como la alta variabilidad genética del virus, reflejada en el considerable número de genotipos y subtipos, dificultan la implantación de este tipo de medidas de manera satisfactoria en los distintos países afectados.

Las diferentes estrategias de inmunización han conseguido estimular la producción de respuestas B y T específicas, induciendo, en el mejor de los casos, grados de protección parcial, pero en ningún caso inmunidad esterilizante.

A través de una estrategia de *Caballo de Troya*, el genoma del virus se integra en el de los monocitos, causando una infección persistente indetectable para el sistema inmune. Tras la maduración de los monocitos a macrófagos y dependiendo del ambiente de citoquinas, el virus comienza a replicar, modificando profundamente la respuesta inmune de las células infectadas (principalmente macrófagos y células dendríticas). La producción de virus es variable, dependiendo del tipo de diferenciación macrofágica. Así, en macrófagos antiinflamatorios o M2, los SRLV se reproducen de manera muy eficiente. Sin embargo, en macrófagos proinflamatorios o M1, se reduce considerablemente la producción viral. Se han relacionado algunas proteínas de la inmunidad innata, que actuarían como factores de restricción lentiviral, en este proceso de maduración.

Desde hace relativamente poco tiempo la respuesta inmune innata está tomando protagonismo en la lucha frente a los diferentes lentivirus. En concreto, se han caracterizado diferentes proteínas inducibles por interferón capaces de unirse a diferentes determinantes virales (RNA, cápside, envoltura, etc.) e interrumpir el ciclo viral de manera directa.

Esta tesis doctoral pretende contribuir a la caracterización de los mecanismos moleculares implicados en la maduración de monocitos y de macrófagos que determinan la resistencia a la infección por SRLV, en busca de dianas profilácticas y/o terapéuticas. En concreto, se aborda el estudio de las proteínas APOBEC3 implicadas en

la maduración macrofágica y la activación de la vía del interferón como bloqueo de la infección por SRLV, a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar el papel de las proteínas APOBEC3 en el proceso de maduración de monocito (resistente) a macrófago (susceptible), así como en macrófagos M1 (resistentes) y M2 (susceptibles).
2. Estudiar el perfil de resistencia/sensibilidad de células ovinas transfectadas con APOBEC3 a SRLV (virus homólogos) y HIV (virus heterólogos).
3. Investigar el papel de la proteína viral Vif y sus cofactores en la degradación de las proteínas APOBEC3 ovinas.
4. Estudiar la activación de la respuesta inmune innata en células ovinas, y su efecto sobre la infección por SRLV, empleando un vector no replicativo del virus de Sendai.

CHAPTER I

***Characterization of Ovine A3Z1 Restriction Properties against Small
Ruminant Lentiviruses (SRLVs)***

ABSTRACT

Intrinsic factors of the innate immune system include the apolipoprotein B editing enzyme catalytic polypeptide-like 3 (APOBEC3) protein family. APOBEC3 inhibits replication of different virus families by cytosine deamination of viral DNA and a not fully characterized cytosine deamination-independent mechanism. Sheep are susceptible to small ruminant lentivirus (SRLVs) infection and contain three APOBEC3 genes encoding four proteins (A3Z1, Z2, Z3 and Z2-Z3) with yet not deeply described antiviral properties. Using sheep blood monocytes and in vitro-derived macrophages, we found that A3Z1 expression is associated with lower viral replication in this cellular type. A3Z1 transcripts may also contain spliced variants (A3Z1Tr) lacking the cytidine deaminase motif. A3Z1 exogenous expression in fully permissive fibroblast-like cells restricted SRLVs infection while A3Z1Tr allowed infection. A3Z1Tr was induced after SRLVs infection or stimulation of blood-derived macrophages with interferon gamma (IFN- γ). Interaction between truncated isoform and native A3Z1 protein was detected as well as incorporation of both proteins into virions. A3Z1 and A3Z1Tr interacted with SRLVs Vif, but this interaction was not associated with degradative properties. Similar A3Z1 truncated isoforms were also present in human and monkey cells suggesting a conserved alternative splicing regulation in primates. A3Z1-mediated retroviral restriction could be constrained by different means, including gene expression and specific alternative splicing regulation, leading to truncated protein isoforms lacking a cytidine-deaminase motif.

de Pablo-Maiso, L.; Glaria, I.; Crespo, H.; Nistal-Villán, E.; Andrésdóttir, V.; de Andrés, D.; Amorena, B.; Reina, R. Characterization of Ovine A3Z1 Restriction Properties against Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs). *Viruses* 2017, 9, 345.

INTRODUCTION

Apolipoprotein B editing enzyme catalytic polypeptide-like 3 (APOBEC3; A3) proteins are cytidine deaminases capable of inhibiting replication of several retroviruses, DNA viruses, long terminal repeat (LTR) and non-LTR retroelements, and even eliminate experimentally transfected plasmid DNA (Harris and Dudley, 2015). The A3 family contains seven paralogs in humans (A3A-A3H) and is part of the activation-induced cytidine deaminase-AID/APOBEC gene family, which shares the characteristic zinc (Zn^{2+})-coordinating catalytic motif (His-X-Glu-X23-28-Pro-Cys-X2-4-Cys). Each A3 protein contains one or two Z-coordinating motif-containing domains, giving rise to a new classification based on the quantity and quality of the Z domains (LaRue et al., 2009).

The complete picture of A3-mediated viral restriction mechanism is dependent on the targeted virus and not fully understood. Regarding lentiviruses, A3 main activity is to mutate nascent lentiviral cDNA after the clearance of RNA from the DNA/RNA hybrid. Such mutations generate highly deaminated non-functioning viral genomes that can be processed by the cellular DNA repairing system. A3 incorporated into virions (passenger A3) is the main cause of deamination evidenced by viral reverse transcripts displaying a high frequency of G-A mutations. However, A3G, A3F and A3A have also been shown to reduce virus infectivity in a cytosine-deaminase independent manner (Bishop et al., 2006; Narvaiza et al., 2009).

Several studies have found signatures of A3 editing activity on retroviral genomes clearly demonstrating that A3 proteins edit lentiviral DNA *in vivo* (Stavrou et al., 2014). Among them, A3G and A3F have been the most studied due to both high antiviral activity *in vitro* and high expression levels in human T cells. A3A with a single Z1 motif has a negligible antiviral activity against human immunodeficiency virus (HIV-1) *in vitro* (Hultquist et al., 2011). However, A3A is involved in the antiviral state of lentivirus target cells such as monocyte/macrophages or dendritic cells with proven antiviral activity *in vivo* (Peng et al., 2007).

The protein in small ruminants homologous to human A3A is called A3Z1. A3Z1 induction in ovine and caprine blood-derived macrophages is achieved upon treatment with interferon ($IFN-\gamma$), and has been proposed as a marker of the M1 profile of macrophage differentiation which is in turn, able to restrict HIV-1 and Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs) replication at a post-entry step (Cassetta et al., 2013; Crespo et al., 2013).

SRLV are present all over the world in sheep, goats and wild ungulates and cause a multisystemic disease exerting meningoencephalitis, arthritis, pneumonitis and/or mastitis (Leroux et al., 1995; Leroux et al., 1997). SRLVs main target cells are from the monocyte/macrophage lineage but monocytes restrict viral replication until they differentiate into tissue macrophages, in which viral replication and protein expression are induced (Narayan et al., 1983). Besides the required *gag*, *pol* and *env* genes, SRLVs encode a series of accessory genes such as *vif*, *tat* or *vpr*-like and *rev* (Pepin et al., 1998). Among them, the accessory protein Vif has been extensively studied as the main A3 antagonist. HIV-1 Vif expression counteracts the hA3 antiviral effect by targeting the protein for degradation by the proteasome, preventing its incorporation into the virion (Liu et al., 2005; Marin et al., 2003; Sheehy et al., 2003). SRLVs Vif can mediate degradation of sheep A3Z3 and A3Z3 orthologs in humans, macaques, cows and cats (Larue et al., 2010).

Sheep encode four functionally active A3 proteins (Z1, Z2, Z3 and Z2Z3) (LaRue et al., 2008), whose cytosine deaminase enzymatic activity is not required for full levels of retrovirus restriction (Jonsson et al., 2006). Artiodactyl A3Z2Z3 proteins, besides being fully resistant to HIV-1 Vif activity, have shown a broad antiviral restriction against HIV-1 and Murine Leukemia Virus (MLV) inhibiting their infectivity by 8 and 4-fold respectively (Jonsson et al., 2006).

In this study, we have explored A3 expression in the ovine monocyte to macrophage maturation process and its influence on SRLVs replication. A3Z1 downregulation (and not A3Z2, Z3 or Z2Z3) correlated with increased SRLVs viral replication in monocyte-derived and M2-polarized macrophages. In contrast, high A3Z1 expression levels correlate with SRLVs virus restriction in monocytes and M1-macrophages. Besides the full protein, additional A3Z1 truncated protein forms lacking the cytidine deaminase motif (A3Z1Tr) were detected following immune stimulation with IFN- γ , interleukin 4 (IL-4) or infection with SRLVs. Both proteins were efficiently incorporated into virions but restriction was only exerted by A3Z1, and was independent of viral Vif, despite protein-protein interaction.

MATERIAL AND METHODS

This project has been approved by the local Ethics Committee for the use of animal samples from the University of Zaragoza (Government of Aragon), reference number PI15/14, and project AGL2013-49137-C3-R (2014-2017). Requirements of the Spanish (RED53/2013) and the European Union (2010/63) animal protection policies were fulfilled.

Samples and Cells

Lung samples were collected in RNAlater buffer (Qiagen, Hilden, Germany) at necropsy from two sheep of the Rasa Aragonesa and Assaf breeds after euthanasia by intravenous injection of barbiturate overdose followed by exsanguination. For the caprine counterpart, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-blood by Lymphoprep gradient centrifugation ($\delta = 1.077$; Asix-Shield, Oslo, Norway) from one Murciano-Granadina goat.

PBMCs from SRLVs-free Rasa Aragonesa sheep, checked by serology and PCR, were seeded in two wells at 10^6 cells/well in 6-well plates and monocytes were isolated by adherence in RPMI complete medium (1% of vitamins, 10 mM sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids, 1% L-glutamine, 50 μ M β -mercaptoethanol, 1% antibiotics/antimycotics mix). One replica was kept in TRI Reagent® (Invitrogen, Carlsbad, CA) after three days of culture (monocytes) for further RNA extraction. Another replica was allowed to differentiate into blood-derived macrophages (BDM) for twelve days of culture in RPMI complete medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). BDM maturation using IFN- γ and IL-4, hallmark cytokines of the M1 and M2 profiles respectively, was also carried out as previously described [8]. BDMs were collected for RNA extraction and RT-PCR was carried out using specific primers for M1 (APOBEC3Z1, A3Z1) and M2 markers (Mannose Receptor, MR; and Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin, DC-SIGN), and for A3Z1 and A3Z1Tr quantification (**Table 1**).

Human embryonic kidney (HEK)-293T cell, T-immortalized goat embryo fibroblast cell line TIGEF (kindly provided by Dr. Yahia Chebloune), and ovine skin fibroblast OSF, were used for propagation of viral stocks and/or for restriction studies in vitro.

PBMCs from four human samples, isolated from a dialysis filter, and two from different *Cynomolgus* monkeys were kindly provided by Dr. Sandra Hervás (CIMA, Pamplona, Spain).

Table 1. Primer pairs used. CDS: Coding DNA sequence; UTR: Untranslated region; Sequences are listed 5' to 3'; Restriction enzyme recognition sites are underlined. Hs: *Homo sapiens*. MR: Mannose Receptor. DC-SIGN: Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin. LTR: long terminal repeat. POL: SRLV pol gene.

| Name | Sequence | Localization | Amplicon Size (nt) |
|-------------------|---------------------------------------|--------------|--------------------|
| A3Z1-Out-Fw | AGGACTCGGAGCCAGGGACGA | Z1 3'-UTR | 621 |
| A3Z1-Out-Rv | TCCTGCCATCTTAGAGAGGCTG | Z1 5'-UTR | |
| A3A-Hs-Fw | ATGGAAGCCAGCCCAGCATC | A3A met | 600 |
| A3A-Hs-Rv | TCAGTTTCCCTGATTCTGGAG | A3A stop | |
| qA3Z1-Fw | TCCGTTCTTGAATCTGGAC | Z1 CDS | 151 |
| qA3Z1-Rv | GTATAGATGCGGGAGGCAAA | Z1 CDS | |
| qA3Z2-Fw | TTGAACCACCTGTCTTTCC | Z2 3'-UTR | 188 |
| qA3Z2-Rv | CAGGCTTCAGGGTTGTTGTT | Z2 3'-UTR | |
| qA3Z3-Fw | GGGCGAGGAGATTGTGTTT | Z3 CDS | 182 |
| qA3Z3-Rv | AAGCAGCCTTTGTCAAGCAT | Z3 CDS | |
| qA3Z2-Z3-Fw | CAGGCCTTGGAAGAACTGA | Z2 CDS | 151 |
| qA3Z2-Z3-Rv | CCTCCGGTAGTAAGGTGGTG | Z3 CDS | |
| qA3Z1Tr-Fw3 | GCTTTGTGCGCAACAAGAAA | Z1 CDS | 85 |
| MR qPCR-Fw | TGGCAAATCCAGTTGTTAAGATGTT | MR CDS | 91 |
| MR qPCR-Rv | AGAATGTTGAATACTGTGCGAGTT | MR CDS | |
| DC-SIGN-Fw | GGTCCGGAGTCTGACTGAAGTT | DC CDS | 73 |
| DC-SIGN-Rv | GGTCAGGCGCTGTAGGATCTC | DC CDS | |
| β -actin-Fw | CTCACGGAGCGTGGCTACA | Actin CDS | 88 |
| β -actin-Rv | GCCATCTCCTGCTCGAAGTC | Actin CDS | |
| A3Z1-EcoRI-Fw | TTTGAATTCGCCACCATGGATGAAAACACCTTCACTG | Z1 met | 588 |
| A3Z1-XhoI-Rv | TTTCTCGAGCTACTATCAGTTTGTGCTGAGCCCTGA | Z1 stop | |
| LTR-Fw | TGACACAGCAAATGTAACCGCAA | LTR | 5126 |
| SP33-Rv | CTTCCCCTTCCCAGAGTACCTGAG | POL | |

RNA Extraction and cDNA Synthesis

Tissue samples (10 mg) were homogenized in a Micro-Dismembrator U using steel beads (Sartorius, Göttingen, Germany). Total RNA isolation from PBMC, BDM and lung samples was performed by chloroform extraction and isopropanol precipitation. RNA was treated with TurboDNaseI (Invitrogen, Carlsbad, CA) and purified by extraction with phenol acid, chloroform, and ethanol precipitation. Total RNA (1 µg) was retrotranscribed to cDNA with Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche, Basel, Switzerland) using oligo-dT primers.

Viral Stocks

SRLVs viral stocks from the genotype A (strain EV1, Maedi Visna virus-MVV-like)(Sargan et al., 1991) and from the genotype B (strain 496, Caprine Arthritis Encephalitis *virus*-CAEV-like) (Glaria et al., 2009) both from ovine origin, were titrated on permissive skin fibroblasts in 96-well tissue culture plates by using the Reed-Muench method after 7 days of infection and used in in vitro infections as specified.

Amplification of Complete A3Z1/A3A and Sequence Analysis

Primers were designed outside the A3Z1 coding region targeting the 5' and 3'-UTRs (A3Z1-Out-Fw and A3Z1-Out-Rv; Table 1) in order to amplify the complete ovine sequences. cDNAs were from lung samples of Rasa Aragonesa and Assaf sheep breeds and from PBMC of a Murciano-Granadina goat. PCR reactions were performed with the Phusion™ High Fidelity Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA); amplicons were cloned into Topo-Blunt plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following manufacturer's instructions and sequenced (Stab Vida, Caparica, Portugal).

Human and monkey A3A complete coding regions were amplified with Phusion™ High Fidelity Polymerase using primers based on GenBank sequences (A3A-Hs-Fw and A3A-Hs-Rv; Hs-Hommo sapiens. **Table 1**). Amplified fragments were cloned into pJET vector (Thermo Scientific) and sequenced.

Nucleotide and deduced amino acid sequences obtained were aligned with the ClustalX program (University College Dublin, Belfield, Dublin, Ireland). Protein domains, families and functional sites were deduced using ScanProsite tool (ExPASy, SIB Swiss Institute of Bioinformatics).

Quantification of Small Ruminant APOBEC3 Expression

Primer3 software (Version 4.1.0; Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA, USA)(Untergasser et al., 2012) was applied to design primers (Table 1) to amplify each of the four A3 proteins (A3Z1, A3Z2, A3Z3 and A3Z2-Z3) nucleotide sequences described (LaRue et al., 2008). The additional A3Z1 spliceoform lacking the deaminase motif (A3Z1Tr) was detected with new forward primer (qA3Z1Tr-Fw3, Table 1) and maintaining the same reverse primer (qA3Z1-Rv). Quantitative RT-PCR was performed with cDNA from ovine samples using SYBR Premix Ex Taq (Takara, Tokyo, Japan). All samples were run in triplicate along with no template controls in an ABI Prism 7900 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). β -actin was used as housekeeping gene for relative quantification using the $2^{-\Delta Ct}$ or $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Obtained values were compared with non-parametric Mann-Whitney U Test (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0 IBM SPSS Statistics. Armonk, NY, IBM Corp.) and also using REST software (Qiagen, Hilden, Germany).

Standard curves of each PCR reaction were constructed by amplifying 10-fold dilutions of plasmids containing each of the amplicons. The efficiency of each reaction was calculated as $E = (10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$ and compared.

In Vitro A3Z1/A3Z1Tr Expression

Kozak consensus sequence (GCCACC) was included in the forward primer and two extra stop codons in the reverse (A3Z1-EcoRI-Fw and A3Z1-XhoI-Rv; Table 1) to amplify the complete ovine A3Z1 and the truncated isoform lacking deaminase motif (A3Z1Tr) using Assaf lung cDNA. The obtained fragments were sub-cloned into the EXN eukaryotic expression vector kindly provided by Greg Towers (University College London, London) (pLNCX2 with an inserted HA-tag; Clontech, Mountain View, CA, USA) and sequenced. These constructions were used for transfection of TIGEF and 293T cells with 1 μ g of plasmid per well using Jet Prime (Polyplus, Illkirch France) at a ratio of 1:2 (μ g DNA: μ L Jet Prime reagent) according to the manufacturer's instructions.

A3Z1 and A3Z1Tr mRNA detection in the transfected cells was carried out by full length RT-PCR and relative expression quantified by quantitative RT-PCR.

Viral Infection

IFN- γ , IL-4 or control stimulated BDMs were infected with SRLVs (MVV and CAEV-like) at 0.1 TCID₅₀/cell. On day 7 post infection, supernatants were collected for retrotranscriptase activity (RT activity) quantification, performed with the HS-Lenti RT activity kit (Cavidi, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions. The test was repeated at least three times in all the experiments.

TIGEF transfected with A3Z1, A3Z1Tr and empty vector were infected with MVV-like SRLV at 0.5 TCID₅₀/cell. In the interest of analyzing the activity of cellular A3Z1, clarified supernatants were used 48 h post-infection for RT activity determinations, as indicated above. In parallel to RT activity, virus titration of supernatants was also performed by Reed-Müench methodology.

HIV-1, MLV and Simian Immunodeficiency virus (SIV)-based pseudoviruses encoding green fluorescent protein (GFP) were prepared in 293-T cells transfected with A3Z1, A3Z1Tr, A3Z2Z3 or empty plasmid as described (Sheehy et al., 2003). In addition, HIV-1 pseudoviruses carrying A3Z1 and A3Z2Z3 together with empty plasmid or A3Z1Tr were also prepared.

Cell culture supernatants containing HIV-1, MLV and SIV viral particles were harvested 2 days after transfection, purified by centrifugation in a Megafuge 1.0 (Heraeus, Hanau, Germany) centrifuge at 1800 rpm for 5 min and filtered through a 0.2- μ m-pore-size membrane to remove any remaining producer cell. The purified supernatants were placed on naive 293T cells (dilution 1:2 pseudovirus) and the percentage of GFP positive cells was evaluated in a FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) after 48 h. All the experiments were performed in triplicate.

Immunoblot and Immunoprecipitation

293T cells were co-transfected using Jet Prime with 1 μ g of A3Z1-HA (N-terminal) and increasing amounts of A3Z1Tr-HA (N-terminal) tagged proteins. Cell lysates were collected in Laemmli buffer (0.125 mM Tris (pH 7.5), 4% SDS, 4% glycerol, 1% 2-mercaptoethanol) and proteins were separated by SDS-PAGE (12% self-casted gels) and transferred onto nitrocellulose membranes (0.45 μ m; Amersham Protan; GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Membranes were blocked o/n at 4 °C or 1 h RT with PBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) containing 5% non-fat dry milk. Anti-HA tag antibodies (rat monoclonal antibody, Roche, Basel, Switzerland) were diluted 1:500 in blocking buffer and incubated for 90 min. The chemiluminescence

reaction (Super Signal West Dura, Thermo Scientific) was revealed in Gene Genius Bio Imaging System (G-BOX Chemi HR16, Syngene, Cambridge, United Kingdom).

A3 degradation by Vif was evaluated in 293-T cells co-transfected using Jet Prime with 1 μ g of HA (N-terminal)-tagged A3Z1, A3Z1TR or A3Z2Z3 in EXN plasmid and 1 μ g HA (C-terminal)-tagged Vif in pVR1012 plasmid. Cell lysates were harvested and immunoblotting was performed using anti-HA tag antibodies as described above.

For immunoprecipitation (IP), 293-T cells were co-transfected using Jet Prime with 1 μ g of HA (N-terminal)-tagged A3Z1 EXN and FLAG (N-terminal)-tagged A3Z1Tr pN3 plasmids. After 48 h, lysates were collected and 10% of cell lysates were saved as an input control. Beads anti-FLAG (EZ view Red Anti-FLAG Affinity Gel, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) were washed 3 times (1 min each wash) with 500 μ L of lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, 2-mercaptoethanol 1 mM, Glycerol 5%, Triton 1% and NP40 1% at pH 7.5). Cell lysates were pre-cleared with beads conjugated to anti-FLAG antibodies and incubated for 16 h at 4 °C. After washing in lysis buffer, immunoprecipitated complexes were followed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and immunostaining using anti-HA and anti-FLAG antibodies (mouse monoclonal anti-FLAG M2-Peroxidase antibody, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Reverse immunoprecipitation using FLAG (N-terminal)-tagged A3Z1 pN3 and HA (N-terminal)-tagged A3Z1Tr EXN plasmids was also carried out. β -tubulin immunoblots were used as loading control.

Vif immunoprecipitation was evaluated on 293-T co-transfected using Jet Prime with 1 μ g of FLAG (N-terminal)-tagged A3Z1 and A3Z1Tr pN3 plasmid and HA (C-terminal)-tagged Vif-pVR1012 plasmids. After 48 h, cell lysates were immunoprecipitated with beads conjugated to anti-FLAG antibodies (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) as described above. Reverse immunoprecipitation (IP) experiments using HA (N-terminal)-tagged A3Z1 and A3Z1Tr EXN and FLAG (N-terminal)-tagged Vif-pN3 plasmids were carried out.

Lentiviral incorporation of A3Z1

Supernatants containing MVV-like and CAEV-like SRLVs obtained after a passage in TIGEF expressing A3Z1, A3Z1Tr and empty plasmid were harvested 2 days after infection, precleared by centrifugation in a Megafuge 1.0 (Heraeus, Hanau, Germany) centrifuge at 800 \times *g*, for 10 min and filtered through a 0.2- μ m filter. Cell lysates were also obtained in Laemmli buffer. Virions were purified by gradient centrifugation

through 20% sucrose for 5 h at 10,000× *g* in an SW32 Ti rotor (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Viral supernatants filtered and pelleted were resuspended in 100 µL of cold PBS. Protein content in purified virions was measured by Bradford assay (Biorad, Hercules, CA, USA) and A3Z1/A3Z1Tr incorporation into virus-like particles was checked. Immunoblots were developed with anti-HA antibodies.

HIV-1 vector expressing GFP was produced in human 293-T cells co-expressing HA-tagged A3Z1 and A3Z1Tr and supernatants were purified and probed as above.

SRLV packaging plasmid (pCAEV-AP) based on CAEV-Cork (Saltarelli et al., 1990) (encoding alkaline phosphatase), kindly provided by Dr. Isidro Hötzel, was co-transfected in 293-T cells together with plasmids (pMDG) encoding envelope protein from vesicular stomatitis virus (VSV-G). 293-T cells were previously transfected with HA-tagged A3Z1, A3Z1Tr and empty plasmid resulting in the formation of CAEV based viral particles expressing AP pseudotyped with VSV-G protein. Pelleted viruses were purified and probed as above to check A3Z1 and A3Z1Tr incorporation.

Hypermutation

For hypermutation studies, SRLVs were produced in ovine skin fibroblast cells previously transfected with 1 µg of HA-(N-terminal) A3Z1, A3Z1Tr or empty vector per well using Jet Prime. The purified supernatants were placed on fresh permissive ovine skin cells. After 16 h, target cells were harvested and DNA was extracted using DNA Blood Mini Kit (E.Z.N.A, Omega Bio-tek, Norcross, GA USA) and a region of the *gag-pol* genes was amplified (LTR-Fw-SP33; Table 1), cloned into pJET Cloning (Thermo, Waltham, MA, USA) and sequenced with pJET-Fw primer. Sequence analysis including *gag* region was conducted using Hypermutation 2.0 software (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HYPERMUT/hypermut.html>, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, USA).

RESULTS

APOBEC3 Expression in Monocytes and Blood Monocyte-Derived Macrophages (BDM)

Since monocytes are less permissive than macrophages to SRLVs replication, mRNA relative expression of ovine A3 proteins (A3Z1, A3Z2, A3Z3 and A3Z2-Z3) was analyzed in these two cellular subsets by using quantitative RT-PCR. Efficiency values calculated for each standard curve ranged between 90 and 110%.

APOBEC3 mRNA expression levels in monocytes and in blood-derived macrophages (BDM) were invariant in the case of A3Z2, A3Z3 and A3Z2-Z3. In contrast, A3Z1 mRNA expression levels were highly increased in monocytes (**Figure 1A**).

BDMs stimulated with hallmark cytokines of the M1 (IFN- γ) pattern of differentiation also showed significant differences in A3Z1 expression but not in A3Z2, A3Z3 or A3Z2Z3 (**Figure 1B**). IL-4 treatment did not induce A3 expression in BDM, showing values close to the control ($p = 0.846$), whereas IFN- γ stimulation strongly induced A3Z1 expression ($p < 0.001$). IFN- γ or IL-4-stimulated BDM showed completely different permissiveness to SRLVs replication. IL-4 and control stimulated cells showed high RT activity values for both MVV-like and CAEV-like strains assayed. However, viral RT activity in IFN- γ stimulated BDM was strongly inhibited ($p < 0.001$) (**Figure 1C**) along with an induction of A3Z1 expression (**Figure 1B**). MR and DC-SIGN were induced in the permissive M2 subpopulation confirming previous results (Crespo et al., 2013). A3Z1, MR and DC-SIGN expression did not modify after SRLV infection of macrophages (**Figure 1D**).

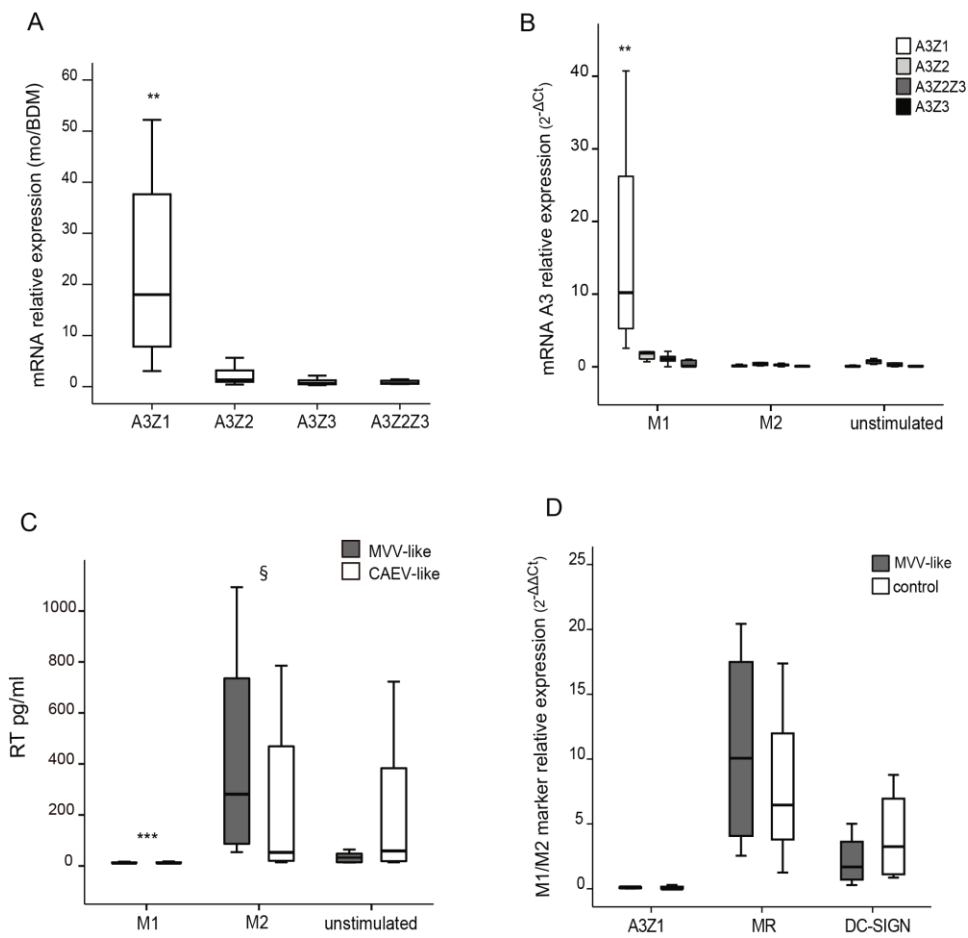


Figure 1. Relative Apolipoprotein B editing enzyme catalytic polypeptide-like 3 (APOBEC3) expression in Blood Derived Macrophages (BDM) and Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs) replication. (A) A3Z1, A3Z2, A3Z3 and A3Z2-Z3 relative expression measured by quantitative RT-PCR in blood monocytes (mo) versus blood derived macrophages, BDM ($2^{-\Delta\Delta C_t}$); **(B)** A3Z1, A3Z2, A3Z3 and A3Z2-Z3 relative expression in BDM stimulated with interferon gamma, IFN- γ (M1), interleukin 4, IL-4 (M2) or control (unstimulated) for 6 days ($2^{-\Delta C_t} \times 100$); **(C)** Retrotranscriptase (RT) activity (pg/mL) measured in clarified supernatants of stimulated BDM infected with 0.1 multiplicity of infection (MOI) of SRLVs strains from Maedi Visna virus (MVV)-like (grey bars) and *Caprine Arthritis Encephalitis virus* (CAEV)-like (empty bars) for 7 days; **(D)** A3Z1, MR, DC-SIGN relative expression in unstimulated BDM infected with SRLVs from MVV-like (0.1 MOI). Values are the median (\pm interquartile range) of at least three independent experiments, significantly lower (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$); significantly higher (§ $p < 0.05$) (paired Mann-Whitney U Test). (MR: Mannose Receptor. DC-SIGN: Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin,)

Besides the expected full sequence, other A3Z1 mRNA variants were also amplified and sequenced from the same RT-PCR reactions (GenBank: KM266653 to KM266660). Among them, a 420 nucleotide length amplicon was the most abundant and was present in all the samples used in the study (**Figure 2A**). This A3Z1 isoform presented an alternative splicing between nucleotides 141 and 280 of the coding sequence (amino acids 47 to 94, exon 3), corresponding to a shorter protein that lacks the entire cytidine deaminase domain and the zinc finger motif, hereafter named truncated A3Z1 (A3Z1Tr) (**Figure 2B**).

IFN- γ , IL-4 and control stimulated macrophages were analyzed for their A3Z1 and A3Z1Tr expression. As shown above, A3Z1 expression was higher in IFN- γ stimulated BDM compared with IL-4 and control BDMs. A3Z1Tr was significantly induced in IFN- γ and not in IL-4 or control BDMs (**Figure 2C**). SRLV infection also resulted in increased A3Z1Tr expression (**Figure 2D**) in contrast to A3Z1, which was not altered (**Figure 1D**).

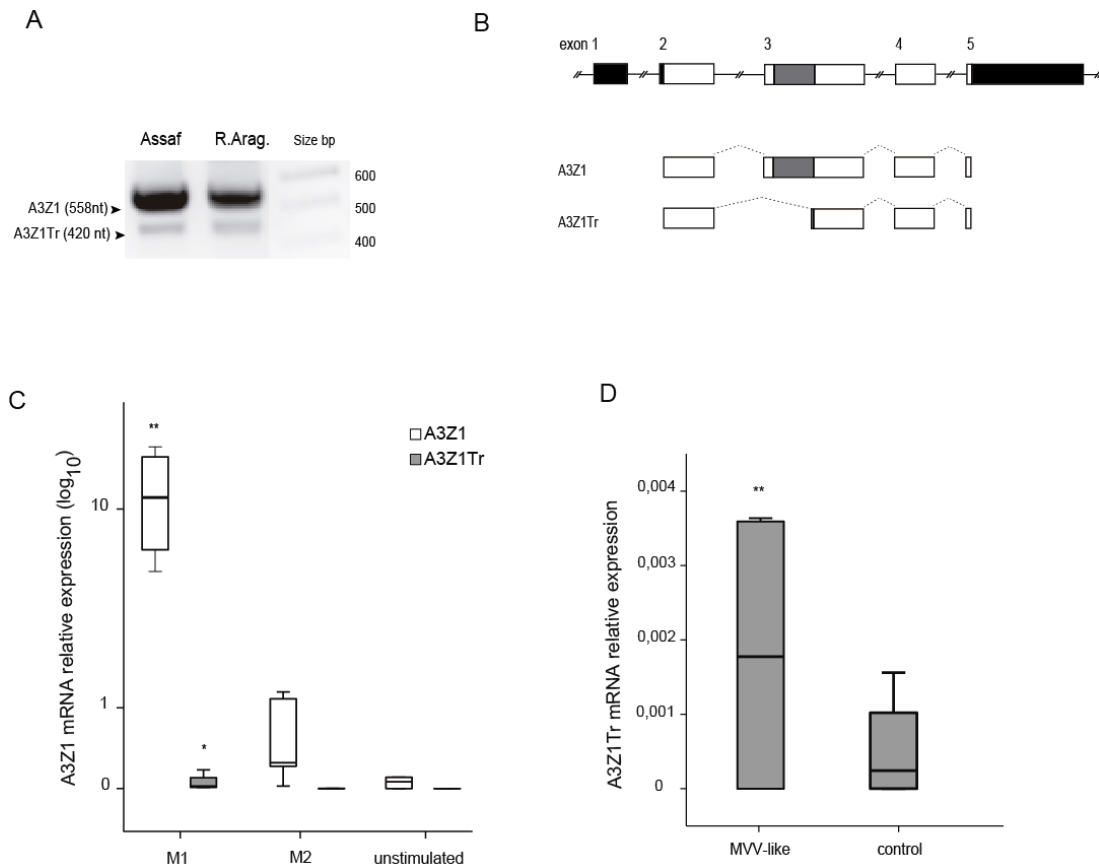


Figure 2. A3Z1 and A3Z1Tr detection. (A) Amplification of complete A3Z1 and the A3Z1Tr spliced variant from cDNAs samples of Assaf and Rasa Aragonesa sheep breeds; (B) Ovine A3Z1 spliced variant diagram compared to the GenBank deposited sequence. Introns are represented by solid lines, exons by boxes and splicing sites by dotted lines. Untranslated regions, black; coding regions, white; cytidine deaminase motif, dark grey; frameshift, light grey; and dotted line boxes: no translated; (C) Expression of A3Z1 and A3Z1Tr ($2^{-\Delta Ct} \times 100$) in BDM treated with IFN- γ , IL-4 or pN3- control for 6 days; (D) Relative expression of A3Z1Tr ($2^{-\Delta Ct} \times 100$) in BDM infected with SRLVs from MVV-like 0.1 MOI. Values are the median (\pm interquartile range) of at least three independent experiments, significantly higher (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) (paired Mann-Whitney U Test).

A3Z1-A3Z1Tr Interaction

Co-expression experiments were carried out in 293-T cells by transfection plasmids encoding A3Z1-HA and increasing quantities of A3Z1Tr-HA without altering protein expression (**Figure 3A**).

Using A3Z1Tr-FLAG protein and following anti-FLAG pull-down, anti-HA WB revealed the interaction between A3Z1 and A3Z1Tr (**Figure 3B**). Reverse pull-down experiments also showed interaction between the native and the truncated protein (**Figure 3C**).

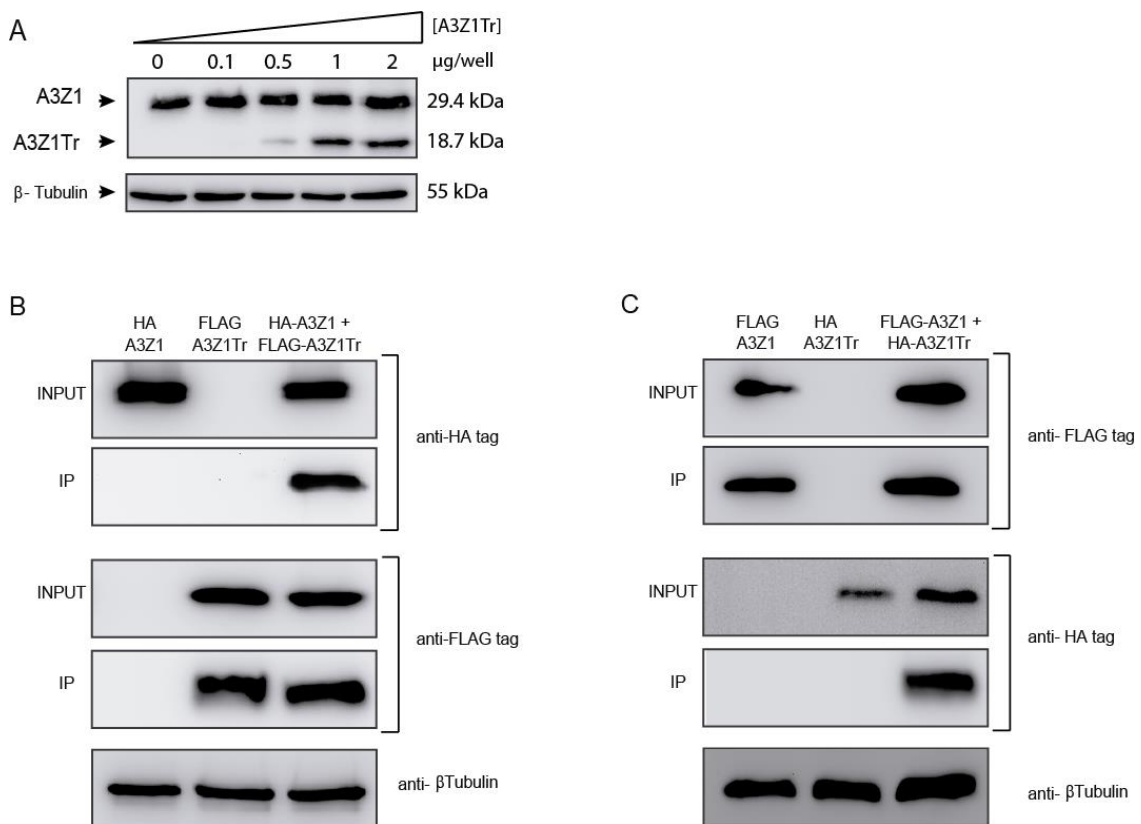


Figure 3. APOBEC3Z1 expression and interaction. (A) HA-tag detection in 293T cells transfected with 1 µg of A3Z1 and increasing amounts of A3Z1Tr; (B) 293T cells were co-transfected with plasmids expressing A3Z1 tagged with HA and A3Z1Tr tagged with FLAG epitopes and after 48 h were immunoprecipitated with anti-FLAG beads. Input lysates and co-immunoprecipitated samples (IP) were immunoblotted by anti-HA or anti-FLAG monoclonal antibodies; (C) Reverse pull-down experiment. 293T cells were co-transfected with A3Z1-FLAG and A3Z1Tr-HA epitopes and after 48 h were immunoprecipitated with anti-FLAG beads. Input lysates and co-immunoprecipitated samples (IP) were immunoblotted by anti-HA or anti-FLAG monoclonal antibodies. β-tubulin blot was used as loading control.

Incorporation into Viral Particles

Since restriction may be dependent on deaminase activity in this is in turn dependent on A3 encapsidation into virions (Hotzel and Cheevers, 2003), we wanted to know whether A3Z1 could also be incorporated into virions. Transfected TIGEF and 293T cell lysates showed high amounts of A3Z1 and A3Z1Tr (**Figure 4**). Both HA-tagged proteins were evident in MVV-like purified viruses produced in infected TIGEF cells (**Figure 4**, upper panel) and also in CAEV-AP produced in 293T cells. Incorporation was also effective in co-transfected cells. A3Z1 and A3Z1Tr were also incorporated into HIV-1 particles very efficiently (**Figure 4**). Produced viral vectors were further used to transduce 293T cells in which no difference in infectivity was observed among A3Z1, A3Z1Tr or EXN containing viruses ($p > 0.05$ for all cases).

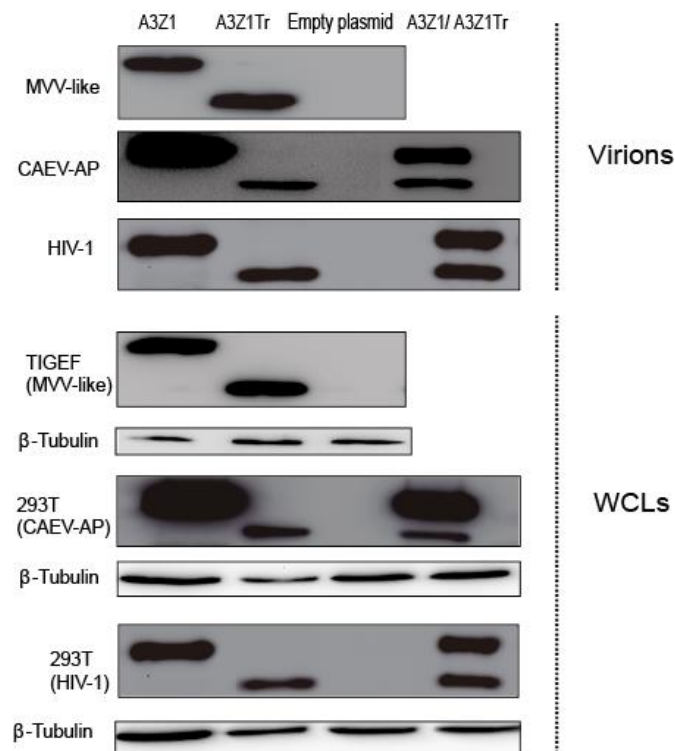


Figure 4. APOBEC3 encapsidation into SRLVs and HIV-1 virions. A3Z1, A3Z1Tr, empty plasmid and A3Z1/A3Z1Tr were transiently expressed in TIGEF and 293T cells that were respectively infected with MVV-like SRLV or transduced with a CAEV-like pseudovirus (CAEV-AP) and a HIV-1 viral vector. Seven days post infection cleared supernatants were pelleted on sucrose gradient. Purified viruses and whole cell lysates (WCLs) and were blotted against HA. β -tubulin blot was used as loading control.

Vif Degradation

Despite efficient incorporation into virions, A3Z1 and A3Z1Tr were resistant to Vif degradation (**Figure 5A**, upper and middle panels) compared to A3Z2Z3 that was used as control (**Figure 5A**, lower panel). Interestingly, immunoprecipitation experiments showed Vif interaction with both A3Z1 and A3Z1Tr proteins (**Figure 5B, C**). Despite faint expression, A3Z1Tr-FLAG presence was confirmed in overexposed images and in WB in which the truncated protein was loaded alone, however, for the sake of a neat presentation of the results, overexposed images have been omitted.

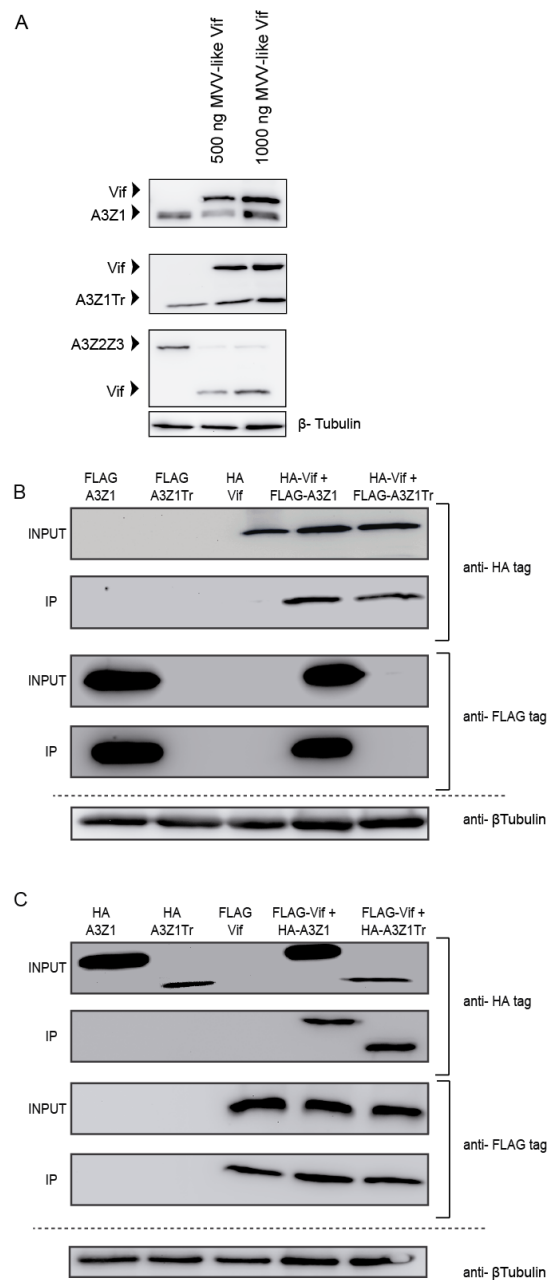


Figure 5. APOBEC3 resistance to MVV Vif. (A) HA-tag detection after 48 h in 293T cells co-transfected with 1 μ g of plasmids expressing A3Z1 (upper panel), A3Z1Tr (middle panel) or A3Z2Z3 (down panel) with different concentrations of Vif plasmid; (B) 293T cells were co-transfected with plasmids expressing Vif-HA tagged and A3Z1Tr or A3Z1 tagged with FLAG epitopes and after 48 h were immunoprecipitated with anti-FLAG beads. Input lysates and co-immunoprecipitated samples (IP) were immunoblotted by anti-HA or anti-FLAG monoclonal antibodies; (C) Reverse pull-down experiment, 293T cells were co-transfected with plasmids expressing Vif tagged with FLAG and A3Z1Tr or A3Z1 tagged with HA epitopes and after 48 h were immunoprecipitated with anti-FLAG beads. Input lysates and co-immunoprecipitated samples (IP) samples were immunoblotted by anti-HA or anti-FLAG monoclonal antibodies. β -tubulin blot was used as loading control. IP: Immunoprecipitation. INPUT: Input sample.

APOBEC3Z1 Restriction of Retrovirus Infection

Restriction was first evaluated in 293-T producer cells transfected with A3Z1 together with plasmids for the production of Vif-competent HIV-1, MLV or SIV GFP-encoding vectors. Retroviral produced particles transduced from 15 to 32% less 293-T cells when A3Z1 was incorporated. A3Z1Tr despite efficient incorporation into lentiviral particles did not inhibit the retroviral cycle. A3Z2Z3 induced the highest degree of retroviral inhibition in this cellular system with a 50% resistance against HIV-1 as previously described (**Figure 6A**) (Ai et al., 2014; Kane et al., 2015).

In the case of HIV-1, co-expression of A3Z1Tr and A3Z1 in the same virus producer cells significantly modified viral production since restriction was relieved. In contrast, A3Z1Tr expression did not modify the inhibition exerted by A3Z2Z3 (**Figure 6B**).

As in the human case (Berger et al., 2011), attempts to permanently express A3Z1 in SRLVs-permissive cells resulted in aberrant cells inappropriate for the restriction experiments. Antiviral properties of A3Z1 and A3Z1Tr were finally evaluated by transient transfection in TIGEF cells, in which HA-tagged A3Z1 and A3Z1Tr protein expression was detectable by Western blot (WB) (**Figure 6C**, lower panel). After infection with SRLVs, TIGEF-Z1 cells showed significantly lower RT activity values as compared to TIGEF-A3Z1Tr cells, TIGEF-empty plasmid cells and also compared to control cells ($p < 0.05$) (**Figure 6C**, upper panel). Titration of SRLVs in cell supernatants by the Reed-Muench method revealed that secreted virions were infective, resulting in viral titer values in line with RT activity results.

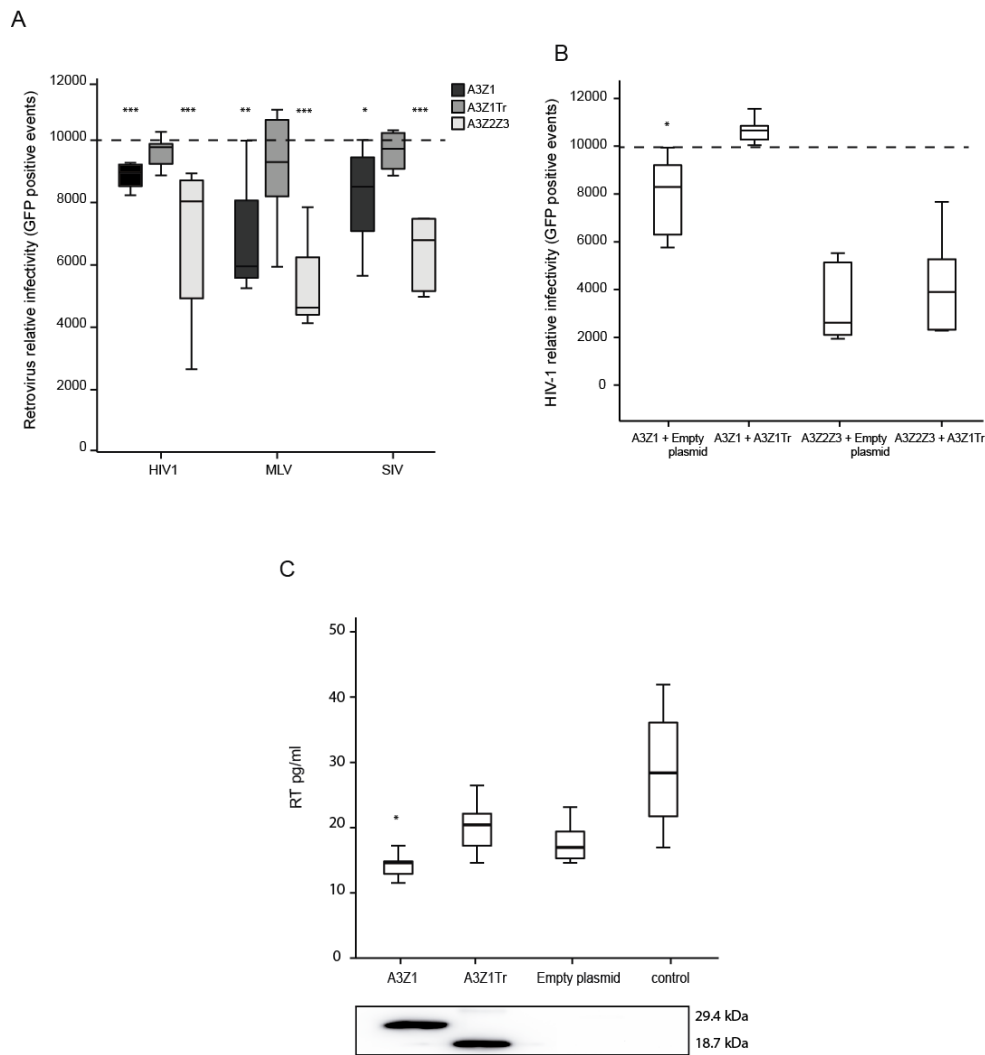


Figure 6. Retrovirus infectivity assay. (A) Relative infectivity of HIV-1, MLV and SIV-GFP pseudoviruses produced in the presence of A3Z1 (black bars), A3Z1Tr (dark grey bars) and A3Z2Z3 (light grey bars). Data are relative to the infectivity obtained with empty plasmid (discontinued line). Values are the median (\pm interquartile range) of at least three independent experiments, significantly lower (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) compared to empty plasmid; paired Mann-Whitney U Test); (B) Relative infectivity of HIV-1 pseudoviruses produced in presence of A3Z1 and A3Z2Z3 supplemented with empty plasmid (control) or A3Z1Tr (spliced variant). Data are relative to the infectivity obtained with empty plasmid (discontinued line). Values are the median (\pm interquartile range) of at least three independent experiments, significantly lower (* $p < 0.05$) compared to empty plasmid; paired Mann-Whitney U Test); (C) RT activity values (pg/mL) upon MVV-like infection in TIGEF (0.5 MOI) expressing A3Z1, A3Z1Tr, empty plasmid and control cells (upper panel). HA-tag detection after 48 h post transfection (lower panel). Values are the median (\pm interquartile range) of at least three independent experiments, significantly lower (* $p < 0.05$) paired Mann-Whitney U Test.

A3Z1 DNA Hypermutation Activity

Permissive skin fibroblasts, with negligible endogenous A3Z1 expression, were infected with A3Z1 or A3Z1Tr containing SRLVs, and viral sequences obtained. Sequences spanning the *gag* gene indicated a high G to A mutation rate, in the GA→AA context, after infection by MVV-like containing A3Z1 (**Figure 7**). It can thus be concluded that the target sequence for ovine A3Z1 is GA-AA. Interestingly, G to A mutations in this context were also found in A3Z1Tr or empty plasmid transfected cells, as compared to sequences from untransfected cells, where no mutation was found in five clones.

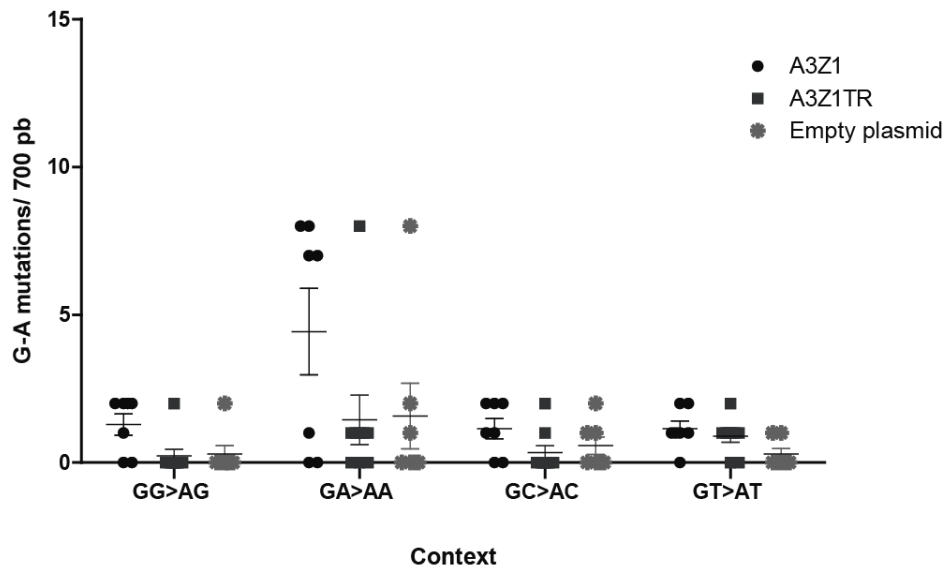


Figure 7. Nucleotide context of deamination. G to A mutations average in *gag* sequences obtained from ovine skin fibroblast (OSF) infected with SRLVs produced in OSF expressing A3Z1, A3Z1Tr or empty plasmid. Edited clones (A3Z1 $n = 7$, A3Z1Tr $n = 9$, Empty plasmid $n = 7$) in *gag* gene were aligned and analyzed with the Hypermut 2.0 program (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HYPERMUT/hypermut.html>, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, USA).

A3Z1/A3A Sequence Analysis

Next, we studied the presence of A3Z1 and A3Z1 truncated isoforms in different primate species susceptible to lentivirus infection. A3Z1 sequences were successfully amplified from lung samples of the Rasa Aragonesa and Assaf sheep breeds and from PBMC of a Murciano-Granadina goat using primers located in the 5' and 3'-UTRs. The 558 nucleotide coding sequence-CDS sequence analysis revealed a high similarity (0.971 for sheep and 0.967 for goat samples) between the obtained sequences and the one deposited in GenBank (GenBank: NM_001161379). These similarities were slightly lower when analyzing deduced amino acid sequences (0.930 and 0.935 for sheep and 0.908 for goat samples). Spanish sheep samples showed an amino acid deletion at position 134, whereas goat samples presented a different deletion at position 31, within a non-conserved region between sheep and goats. None of these deletions affected the cytidine deaminase motif, which was conserved region encompassing amino acids 57 to 95 (H-X-E-X23-28-P-C-X2-4-C). Both, sheep and goat sequences, also conserved a zinc finger C2H2-type domain between residues 88 and 108 overlapping with the cytidine deaminase motif. Kozak sequence context surrounding the A3Z1 M1 initiation codon was adequate (Henry et al., 2012).

Macaca fascicularis A3A sequences consisted of 609 nt and were quite divergent between the two individuals analyzed, with 19 variations in the nucleotide sequence and 11 amino acid changes. Truncated isoforms were also present specifically, an A3A 455 nt isoform that was only amplified from one of the samples (GenBank: KM266650 to KM266652).

Specific human A3A amplification, homologous to sheep A3Z1 protein, yielded non-specific amplicons when HTB-54, BEAS-2B, HEP-B2 or Caco-2 cultured cell lines were used as cDNA source. Successful amplification was achieved from four human PBMC and the obtained sequence was identical to the deposited in GenBank (GenBank: NM_001193289). Besides the deduced amino acid sequence with one cytidine deaminase domain between amino acids 70 to 110, shorter isoforms were also observed (**Figure 8B**) (GenBank: KM266646 to KM266649). Specifically, three different sized spliceoforms: (i) 546 nt, resulting in an 18 amino acid shorter protein with alternative splicing located between nucleotides 29 and 84 (amino acids 11 to 28, corresponding to exon 2), the cytidine deaminase domain remained intact and the methionine at position 13 was absent. (ii) 525 nt, lacking the cytidine deaminase domain due to an alternative splicing that produces a 25 amino acid deletion at position

59 to 83, corresponding to exon 3. (iii) 455 nt, with alternative splicing from nucleotides 29 to 175, which comprises the entire exon 2, that changes the frame at amino acid 11 encoding a 71 amino acid long non-characterized protein lacking also the cytidine deaminase domain.

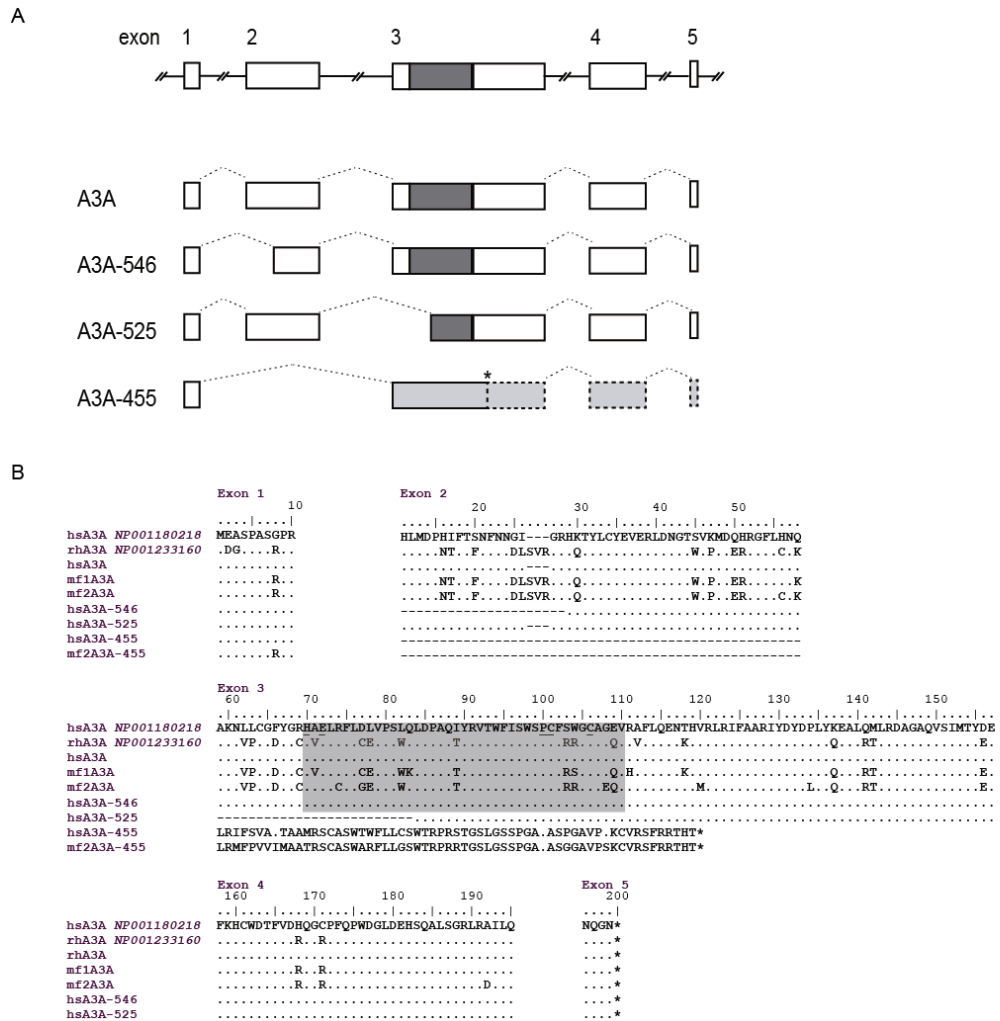


Figure 8. Human A3A transcripts. **(A)** Diagrams represent the different transcripts found in human A3A sequences obtained from PBMCs. Introns are represented by solid lines, exons by boxes and splicing sites by dotted lines. Coding regions, white; cytidine deaminase motif, dark grey; frameshift, light grey; and dotted line boxes: non-translated; **(B)** Human A3A sequences obtained here from PBMC (hsA3A) were aligned with A3A sequences deposited in GenBank (with accession numbers) and A3A from *macaca fascicularis* (mf). Cytidine deaminase motif is highlighted in grey. Identical residues are identified by dots and absence of an amino acid by dashes. The numbering corresponds to that of the reference sequence.

DISCUSSION

SRLVs replication occurs at low levels but at a constant rate leading to immune dysfunction and disease development in a process accomplished in years. However, in some cell types (i.e., monocytes) or under some circumstances (i.e., pregnancy), lentivirus replication can be naturally modulated (Blacklaws, 2012; Coffin et al., 1997; Morin et al., 2003) potentially providing clues for the designing of new therapeutic targets. Among proteins interfering the viral replication cycle, restriction factors of the innate immunity are becoming an attractive strategy to control infection spread. Specifically, tripartite motif-containing protein 5 (TRIM5 α) and A3Z2Z3 have been recently described in small ruminants with promising results in restricting homologous as well as heterologous lentiviral infection (Jauregui et al., 2012; Jonsson et al., 2006).

In the present study, we explored ovine A3Z1 restriction properties against homologous viruses (SRLVs) in the context of macrophage maturation depicting the mechanisms involved and investigating Vif involvement as well as restriction against heterologous viruses (HIV-1). In addition to full-length A3Z1, transcriptional analysis revealed the presence of additional spliceoforms lacking the entire cytidine deaminase motif (A3Z1Tr) indicating that A3Z1 isoforms lacking the deaminase motif are naturally present.

SRLVs replication is induced when maturation from monocyte into macrophages takes place (Gendelman et al., 1986; Narayan et al., 1983) presumably due to the induction of transcription factors needed for viral protein expression. Additionally, as shown here, A3Z1 expression was dramatically reduced in BDM as compared with parental monocytes likely contributing to viral restriction observed in the latter. In line with our results, decreased A3A expression during monocyte to macrophage differentiation has been associated with resistance to HIV-1 (Berger et al., 2011; Peng et al., 2007), indicating the presence of a conserved restriction mechanism among mammals susceptible to lentivirus infection.

Ovine M1-macrophages obtained upon stimulation with IFN- γ were resistant to SRLVs infection and presented high levels of A3Z1 mRNA, whereas M2 susceptible to SRLVs infection, showed low A3Z1 levels, positioning A3Z1 in the SRLVs (MVV and CAEV-like) restriction pathway. A3Z1Tr was also induced upon BDM stimulation with cytokines or SRLVs infection suggesting a role in immune activation.

Viral restriction was cell type dependent since A3Z1-expressing TIGEF, with similar A3Z1 mRNA levels to M1 macrophages, faintly restricted the replication of

SRLVs Vif-competent strains. Similarly, A3A restriction of HIV has been demonstrated in myeloid but not in cells from other lineages (Berger et al., 2011; Malim, 2009; Peng et al., 2007; Trapp et al., 2009).

In addition, although A3Z1 restriction compared to A3Z1Tr *in vitro* was likely dependent on the deaminase activity, since deaminase motif was not present in A3Z1Tr, hypermutation was also found in viruses obtained after infection of cells expressing A3Z1Tr or the empty plasmid. In this regard, human A3A is induced by interferon following administration of foreign DNA by transfection (Stenglein et al., 2010). Whether the induction of endogenous A3Z1 proteins in TIGEF transfected with plasmids is covering up real A3-derived effect is now under investigation.

Little information limited to humans is available regarding A3 splicing variants and their influence on restriction. A3G truncated forms, which are expressed at much lower levels than native protein, do not interact with Vif and lack antiviral activity (Lassen et al., 2010). A3H splicing variants have different antiviral activities depending on protein expression (Harari et al., 2009). A3F splicing variants despite being highly expressed and conserving cytidine deaminase activity, differ in their sensitivity to viral Vif and are incorporated into viral particles less efficiently than full protein, thereby displaying decreased antiviral activity (Lassen et al., 2010). Alternatively, spliced truncated isoforms may be a mechanism to reduce the amount of full-length proteins (Xu and Weiss, 2002). Here we have determined different splicing rates of A3Z1 depending on the stimulus on macrophages, being immunological stimulation of BDM with IFN- γ and more significantly SRLVs infection, inducers of the spliced protein. This was also found in THP-1 PMA-derived macrophages in which A3ATr expression was induced upon transduction with different retroviral vectors such as HIV-1 or MLV-B/N.

Efficient co-expression in 293T cells enabled interaction experiments demonstrating co-immunoprecipitation of A3Z1 and A3Z1Tr. This interaction could alter full-length protein function suggesting a possible regulation mechanism consisting in binding and negative dominance, as described in the case of MYD88s (Burns et al., 2003). Indeed, A3Z1Tr relieved the restriction observed against HIV-1 when co-expressed with A3Z1, but did not alter the restriction exerted by the divergent A3Z2Z3. However, the presence of A3Z1Tr did not influence the SRLVs restriction observed in M1-macrophages obtained upon IFN- γ induction.

A3Z1 lentiviral restriction was likely independent on the presence of viral Vif since transduction (HIV-1) and infection (SRLVs) with Vif-competent viruses was affected. This could argue for the presence of extra elements needed for the Vif-

APOBEC3Z1 interaction, which were not present in the culture conditions used here (Henriet et al., 2009). Transcription factor CBF β , as well as viral RNA, is necessary to form the bridge between primate A3 proteins and Vif (Kane et al., 2015). Recently, SRLVs Vif has been described to follow alternative mechanisms to degrade A3 using CYPAs as cofactor (Ai et al., 2014; Kane et al., 2015). Whether A3Z1 follows the same pathway in Vif degradation co-expression experiments is unknown. On the other hand, significant amounts of A3G have been detected in Vif-competent HIV virions produced in 293T cells, clearly showing that under certain circumstances, Vif does not lead to complete depletion of A3 (Sheehy et al., 2002; Sheehy et al., 2003). Interestingly, and in contrast to A3A (Berger et al., 2011) both A3Z1 and A3Z1Tr were efficiently incorporated into SRLVs (MVV and CAEV-like) and HIV viral particles bypassing Vif-mediated degradation.

The long interaction between lentiviruses and their hosts has led to the idea that inter-species A3, evolved under the pressure of a divergent Vif, could be good candidates to face human lentiviruses. Following this model, ovine A3Z2-Z3 and A3Z3 proteins are able to restrict HIV-1 irrespective of HIV-Vif expression by deaminase dependent and independent pathways. Interestingly, Vif from SRLVs is able to efficiently degrade human, macaque, cow and cat's A3Z3 (Jonsson et al., 2006; Larue et al., 2010). In this study, A3Z1 restricted HIV-1 in 293-T producer cells (Figure 6A). However, experiments have not been conducted in myeloid cells which could be the proper cell type to test A3Z1/A3A restriction profile.

The overall A3A deaminase activity *in vivo* is likely determined by a complex balance between stimulatory and inhibitory pathways being truncated isoforms, one of such potential elements assuring viral defense while minimizing host DNA deleterious effects (Thielen et al., 2010). Increased functional diversity may have implications in expression regulation, antiviral activities, Vif resistance, etc., all of them influencing the design of new therapeutic measures as well as in the development of tumorigenic processes in which cytidine deaminases are relevant.

Acknowledgements: We sincerely acknowledge Sandra Hervás-Stubbs from CIMA for her fruitful help and Greg Towers, University College London for plasmids and protocols. Funded by CICYT (AGL2010-22341-C04-01) and Navarra's Government (IIQ010449.RI1 and PI042-LENTIMOL). Ramsés Reina was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation "Ramón y Cajal" contract. We acknowledge support of the publication fee by the UPNA and CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URICI).

REFERENCES

- Ai, Y., Zhu, D., Wang, C., Su, C., Ma, J., Ma, J., Wang, X., 2014. Core-binding factor subunit beta is not required for non-primate lentiviral Vif-mediated APOBEC3 degradation. *Journal of virology* 88, 12112-12122.
- Berger, G., Durand, S., Fargier, G., Nguyen, X.N., Cordeil, S., Bouaziz, S., Muriaux, D., Darlix, J.L., Cimarelli, A., 2011. APOBEC3A is a specific inhibitor of the early phases of HIV-1 infection in myeloid cells. *PLoS pathogens* 7, e1002221.
- Bishop, K.N., Holmes, R.K., Malim, M.H., 2006. Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination. *Journal of virology* 80, 8450-8458.
- Blacklaws, B.A., 2012. Small ruminant lentiviruses: immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 35, 259-269.
- Burns, K., Janssens, S., Brissoni, B., Olivos, N., Beyaert, R., Tschopp, J., 2003. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *The Journal of experimental medicine* 197, 263-268.
- Cassetta, L., Kajaste-Rudnitski, A., Coradin, T., Saba, E., Della Chiara, G., Barbagallo, M., Graziano, F., Alfano, M., Cassol, E., Vicenzi, E., Poli, G., 2013. M1 polarization of human monocyte-derived macrophages restricts pre and postintegration steps of HIV-1 replication. *Aids* 27, 1847-1856.
- Coffin, J.M., Hughes, S.H., Varmus, H.E. 1997. *The Interactions of Retroviruses and their Hosts*, In: Coffin, J.M., Hughes, S.H., Varmus, H.E. (Eds.) *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY).
- Crespo, H., Bertolotti, L., Juganaru, M., Glaria, I., Andres, D.d., Amorena, B., Rosati, S., Reina, R., de Andres, D., 2013. Small ruminant macrophage polarization may play a pivotal role on lentiviral infection. *Vet Res* 44, (26 September 2013).
- Gendelman, H.E., Narayan, O., Kennedy-Stoskopf, S., Kennedy, P.G., Ghotbi, Z., Clements, J.E., Stanley, J., Pezeshkpour, G., 1986. Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *Journal of virology* 58, 67-74.
- Glaria, I., Reina, R., Crespo, H., de Andres, X., Ramirez, H., Biescas, E., Perez, M.M., Badiola, J., Lujan, L., Amorena, B., de Andres, D., 2009. Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep. *Veterinary Microbiology* 138, 156-162.
- Harari, A., Ooms, M., Mulder, L.C., Simon, V., 2009. Polymorphisms and splice variants influence the antiretroviral activity of human APOBEC3H. *Journal of virology* 83, 295-303.
- Harris, R.S., Dudley, J.P., 2015. APOBECs and virus restriction. *Virology* 479-480, 131-145.
- Henriet, S., Mercenne, G., Bernacchi, S., Paillart, J.C., Marquet, R., 2009. Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 viral infectivity factor (Vif) and the human APOBEC-3G and APOBEC-3F restriction factors. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 73, 211-232.
- Henry, M., Terzian, C., Peeters, M., Wain-Hobson, S., Vartanian, J.P., 2012. Evolution of the primate APOBEC3A cytidine deaminase gene and identification of related coding regions. *PloS one* 7, e30036.
- Hotzel, I., Cheevers, W.P., 2003. Caprine arthritis-encephalitis virus envelope surface glycoprotein regions interacting with the transmembrane glycoprotein: structural and functional parallels with human immunodeficiency virus type 1 gp120. *Journal of virology* 77, 11578-11587.
- Hultquist, J.F., Lengyel, J.A., Refsland, E.W., LaRue, R.S., Lackey, L., Brown, W.L., Harris, R.S., 2011. Human and rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, and APOBEC3H demonstrate a conserved capacity to restrict Vif-deficient HIV-1. *Journal of virology* 85, 11220-11234.

- Jauregui, P., Crespo, H., Glaria, I., Lujan, L., Contreras, A., Rosati, S., de Andres, D., Amorena, B., Towers, G.J., Reina, R., 2012. Ovine TRIM5alpha can restrict visna/maedi virus. *Journal of virology* 86, 9504-9509.
- Jonsson, S.R., Hache, G., Stenglein, M.D., Fahrenkrug, S.C., Andresdottir, V., Harris, R.S., 2006. Evolutionarily conserved and non-conserved retrovirus restriction activities of artiodactyl APOBEC3F proteins. *Nucleic acids research* 34, 5683-5694.
- Kane, J.R., Stanley, D.J., Hultquist, J.F., Johnson, J.R., Mietrach, N., Binning, J.M., Jonsson, S.R., Barelier, S., Newton, B.W., Johnson, T.L., Franks-Skiba, K.E., Li, M., Brown, W.L., Gunnarsson, H.I., Adalbjornsdottir, A., Fraser, J.S., Harris, R.S., Andresdottir, V., Gross, J.D., Krogan, N.J., 2015. Lineage-Specific Viral Hijacking of Non-canonical E3 Ubiquitin Ligase Cofactors in the Evolution of Vif Anti-APOBEC3 Activity. *Cell reports* 11, 1236-1250.
- LaRue, R.S., Andresdottir, V., Blanchard, Y., Conticello, S.G., Derse, D., Emerman, M., Greene, W.C., Jonsson, S.R., Landau, N.R., Lochelt, M., Malik, H.S., Malim, M.H., Munk, C., O'Brien, S.J., Pathak, V.K., Strebel, K., Wain-Hobson, S., Yu, X.F., Yuhki, N., Harris, R.S., 2009. Guidelines for naming nonprimate APOBEC3 genes and proteins. *Journal of virology* 83, 494-497.
- LaRue, R.S., Jonsson, S.R., Silverstein, K.A., Lajoie, M., Bertrand, D., El-Mabrouk, N., Hotzel, I., Andresdottir, V., Smith, T.P., Harris, R.S., 2008. The artiodactyl APOBEC3 innate immune repertoire shows evidence for a multi-functional domain organization that existed in the ancestor of placental mammals. *BMC molecular biology* 9, 104.
- Larue, R.S., Lengyel, J., Jonsson, S.R., Andresdottir, V., Harris, R.S., 2010. Lentiviral Vif degrades the APOBEC3Z3/APOBEC3H protein of its mammalian host and is capable of cross-species activity. *Journal of virology* 84, 8193-8201.
- Lassen, K.G., Wissing, S., Lobritz, M.A., Santiago, M., Greene, W.C., 2010. Identification of two APOBEC3F splice variants displaying HIV-1 antiviral activity and contrasting sensitivity to Vif. *The Journal of biological chemistry* 285, 29326-29335.
- Leroux, C., Cordier, G., Mercier, I., Chastang, J., Lyon, M., Querat, G., Greenland, T., Vigne, R., Mornex, J.F., 1995. Ovine aortic smooth muscle cells allow the replication of visna-maedi virus in vitro. *Arch Virol* 140, 1-11.
- Leroux, C., Chastang, J., Greenland, T., Mornex, J.F., 1997. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch Virol* 142, 1125-1137.
- Liu, B., Sarkis, P.T., Luo, K., Yu, Y., Yu, X.F., 2005. Regulation of Apobec3F and human immunodeficiency virus type 1 Vif by Vif-Cul5-ElonB/C E3 ubiquitin ligase. *Journal of virology* 79, 9579-9587.
- Malim, M.H., 2009. APOBEC proteins and intrinsic resistance to HIV-1 infection. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 364, 675-687.
- Marin, M., Rose, K.M., Kozak, S.L., Kabat, D., 2003. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nature medicine* 9, 1398-1403.
- Morin, T., Grezel, D., Bouzar, B., Villet, S., 2003. Experimental model of lentivirus reactivation for virological and immunological studies in caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infected goats. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 47, 275-286.
- Narayan, O., Kennedy-Stoskopf, S., Sheffer, D., Griffin, D.E., Clements, J.E., 1983. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infection and immunity* 41, 67-73.
- Narvaiza, I., Linfesty, D.C., Greener, B.N., Hakata, Y., Pintel, D.J., Logue, E., Landau, N.R., Weitzman, M.D., 2009. Deaminase-independent inhibition of parvoviruses by the APOBEC3A cytidine deaminase. *PLoS pathogens* 5, e1000439.
- Peng, G., Greenwell-Wild, T., Nares, S., Jin, W., Lei, K.J., Rangel, Z.G., Munson, P.J., Wahl, S.M., 2007. Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression. *Blood* 110, 393-400.
- Pepin, M., Vitu, C., Russo, P., Mornex, J.F., Peterhans, E., 1998. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Vet Res* 29, 341-367.

- Saltarelli, M., Querat, G., Konings, D.A., Vigne, R., Clements, J.E., 1990. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology* 179, 347-364.
- Sargan, D.R., Bennet, I.D., Cousens, C., Roy, D.J., Blacklaws, B.A., Dalziel, R.G., Watt, N.J., McConnell, I., 1991. Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi-visna virus. *The Journal of general virology* 72 (Pt 8), 1893-1903.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., Malim, M.H., 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646-650.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Malim, M.H., 2003. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nature medicine* 9, 1404-1407.
- Stavrou, S., Crawford, D., Blouch, K., Browne, E.P., Kohli, R.M., Ross, S.R., 2014. Different modes of retrovirus restriction by human APOBEC3A and APOBEC3G in vivo. *PLoS pathogens* 10, e1004145.
- Stenglein, M.D., Burns, M.B., Li, M., Lengyel, J., Harris, R.S., 2010. APOBEC3 proteins mediate the clearance of foreign DNA from human cells. *Nature structural & molecular biology* 17, 222-229.
- Thielen, B.K., McNevin, J.P., McElrath, M.J., Hunt, B.V., Klein, K.C., Lingappa, J.R., 2010. Innate immune signaling induces high levels of TC-specific deaminase activity in primary monocyte-derived cells through expression of APOBEC3A isoforms. *The Journal of biological chemistry* 285, 27753-27766.
- Trapp, S., Derby, N.R., Singer, R., Shaw, A., Williams, V.G., Turville, S.G., Bess, J.W., Jr., Lifson, J.D., Robbiani, M., 2009. Double-stranded RNA analog poly(I:C) inhibits human immunodeficiency virus amplification in dendritic cells via type I interferon-mediated activation of APOBEC3G. *Journal of virology* 83, 884-895.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research* 40, e115.
- Xu, Z., Weiss, A., 2002. Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms. *Nature immunology* 3, 764-771.

CHAPTER II

Vif resistance of APOBEC3Z1 proteins is relieved by CYPA

ABSTRACT

APOBEC3 proteins (A3) restrict lentivirus replication, when viral Vif protein is not present, mainly through deamination of the viral genome. In contrast to primate lentiviruses, animal lentiviruses, such as small ruminant lentiviruses (SRLV), employ CYPA, instead of CBF- β , as the co-factor for Vif-dependent degradation of APOBEC3 proteins. Specific APOBEC3 proteins exert their antiviral role mainly in myeloid cells and show a relative resistance to Vif degradation despite efficient binding. This study describes the susceptibility pattern of ovine APOBEC3 proteins to SRLV Vif degradation, identifying APOBEC3Z1 as resistant. This phenotype could be overcome when high levels of Cyclophyllin A (CYPA) are expressed, even in the presence of a proteasome recruitment-inefficient Vif (Vif^{mut}). Vif^{mut} also induced degradation of the remaining ovine APOBEC3 proteins in the presence of CYPA. While APOBEC3 levels were not completely recovered when using proteasome or autophagy inhibitors independently, inhibition of both degradation pathways allowed total protein recovery, suggesting that autophagy is involved in lentiviral Vif-mediated APOBEC3 proteins synergistically with proteasome-mediated degradation.

This novel mechanism may explain the ability of SRLV to replicate in myeloid cells in the presence of A3 proteins resistant to proteasome-mediated Vif degradation and suggests that CYPA availability may control the process.

de Pablo-Maiso, L.; Glaria, I.; Echeverría, I.; Crespo, H.; Luján, L.; Nistal-Villán, E.; de Andrés, D.; Reina, R.
(Manuscript in preparation)

INTRODUCTION

Small ruminant lentiviruses group (SRLV) comprise Visna Maedi virus (VMV) and Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV), are endemic in most areas of the world in which sheep and goats are raised causing a multisystemic disease affecting animal production and welfare. Treatments or vaccines are not available and infection is partially controlled in some areas through serologic diagnosis. However, late seroconversion and antigenic heterogeneity are at the basis of diagnostic breakdowns (Cardinaux et al., 2013; Lacerenza et al., 2006; Ritchie and Hosie, 2014). SRLV have been prototypic for the lentivirus genus from the initial studies (Sigurdsson et al., 1957), until recent findings involving integrase structure (Ballandras-Colas et al., 2017).

APOBEC3 proteins (A3) are cytidine deaminases that influence lentivirus replication by editing the viral genome at pre-integration steps (Luo et al., 2007). A3 involvement in lentivirus replication was discovered after the observation that Δ Vif HIV-1 strains showed a restricted replication in chimeric cells derived from permissive and non-permissive cells (Sheehy et al., 2002). APOBEC3 is incorporated into nascent virions in producer cells, when viral Vif is not present, and deaminates the viral genome in following infection cycles during retrotranscription (Bishop et al., 2004a; Bishop et al., 2004b; Harris et al., 2003). Viral Vif proteins antagonize APOBEC3 activity by degradation through the proteasome pathway (Sheehy et al., 2003) by recruiting an ubiquitin-ligase complex in the presence of a cellular co-factor, without affecting A3 mRNA levels (Jager et al., 2011). Recent findings show divergence among animals and primate lentiviruses regarding co-factor usage for A3 degradation. While primate lentivirus use CBF- β , animal counterparts employ CYP A to recruit E3 ubiquitin ligase complex (Kane et al., 2015).

Humans possess 7 genes encoding for 8 APOBEC3 proteins (A3A-A3H) with different expression patterns, antiviral properties as well as deamination context (LaRue et al., 2008). Sheep contain only three paralogs that encode four proteins (A3Z1, Z2, Z3 and Z2Z3) with different expression profiles according to cell type, intra-cell localization and antiviral properties against SRLV and interestingly, also against HIV-1 (Harris et al., 2003; LaRue et al., 2009). Sheep A3Z2Z3 (paralog of human A3F) antiviral activity is mainly exerted through deamination after incorporation into viral particles. A3Z2Z3 contain two cytidine deaminase motifs, being the C-terminal one catalytically active, with potent antiviral activity against Δ Vif SRLVs in fibroblast-like cells. On the other hand and similarly to human A3A, ovine A3Z1 has been shown to be up-regulated

in resistant monocytes and M1-macrophages and showed faint restriction in fibroblast-like transfected cells *in vitro* (de Pablo-Maiso et al., 2017).

VMV-Vif may counteract the restriction activity of sheep A3Z3 and A3Z2Z3 proteins very efficiently but also A3Z3 from cow, human, rhesus macaque and cats (Larue et al., 2010). CAEV-Vif has also shown the ability to degrade sheep and goat A3Z2Z3 (Yoshikawa et al., 2016b). SRLV Vif hijacks CYPA to degrade ovine and caprine A3Z2Z3 thereby promoting infection (Kane et al., 2015; Yoshikawa et al., 2016a). Recently, several functional domains of CAEV Vif required for degrading oaA3Z2-Z3 have been identified (Zhao et al., 2019).

Here, we determine the interaction between the different ovine A3 proteins and characterize their susceptibility to VMV-Vif degradation. High levels of CYPA were required for efficient A3Z1 degradation whereas requirements for the resting A3 proteins were less strict. Indeed, a proteasome complex-recruitment competent Vif was not required for efficient degradation of A3 in the presence of high amounts of CYPA, suggesting that degradation of A3 may be independent of proteasome degradation, potentially involving autophagy.

MATERIAL AND METHODS

Cloning and plasmid constructions

CBF- β and CYPA sequences were amplified from sheep and goat cDNA from the Rasa Aragonesa and Murciano-Granadina breeds, respectively. The following primers used in this study are designed outside the coding region of the mRNA.

Table 1. Primers pairs used.

| Name | Sequence 5' → 3' |
|-------------------------|--|
| CYPA-EcoRI-Fw | TTTGAATTCGCCACCCATGGTCAACCCCACCGT |
| CYPA-NotI-Rv | TTTGCGGCCGCTAATAGTTAGATTTGTCCACAGTCAGC |
| CBF-EcoRI-Fw | TTTGAATTCGCCACCCATGCCGCGCGTCTGTCGCCG |
| CBF- <i>oa</i> -NotI-Rv | TTTGCGGCCGCTAATAGCTAGGGTCTTGTGTCT |
| CBF- <i>ch</i> -NotI-Rv | GCGGCCGCTAATAGTTAGCGAAGTTTGAGGTCATC |

PCR reactions were performed with the Phusion™ High Fidelity Polymerase (Thermo Scientific); amplicons were cloned into pJET plasmid (Thermo) following manufacturer's instructions and sequenced (Stab Vida). After that, CBF- β and CYPA were also inserted into EXN vector for eukaryotic expression.

Sheep APOBEC3 (A3Z1, A3Z2, A3Z3, A3Z2Z3 and A3Z1Tr), goat A3 (A3Z1 and A3Z1Tr), and human A3A constructs with N-terminal 2xHA tags in pLNCX2 (EXN vector) have been reported previously (de Pablo-Maiso et al., 2017).

Codon-optimized Vif and Vif mutant (SLQ:AAA) from VMV cloned into pVR1012 (HA-tag) plasmid was kindly provided by Dr. Valgerdur Andrésdóttir (University of Reykjavik, Iceland). Codon-optimized Vif from VMV was additionally cloned into pVR1012 (3xFlag) plasmid for immunoprecipitation assays.

Cells and transfections

HEK293T (293-T), T-immortalized goat embryo fibroblast cell line (TIGEF, kindly provided by Dr. Yahia Chebloune, University of Grenoble, France) and ovine skin fibroblasts (OSF) were maintained in Duplecco's High-glucose modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 2mM L-glutamine, antibiotics/antimycotics (1%). A3 experiments were performed in 6 and 12-well plates and transfection was performed with Jet Prime (Polyplus) at a ratio of 1:2 ($\mu\text{g DNA}:\mu\text{L Jet Prime reagent}$) in accordance with the manufacturer's procedures.

Western blotting and immunoprecipitation

Co-transfection experiments using 293-T cells were useful to evaluate Vif-mediated degradation of the different APOBEC3 proteins, to evaluate the functional relationship between Vif and A3, to analyze cellular cofactor requirements, and to analyze CYPA dose-dependent. 293T and TIGEF cells were transfected and cell lysates were collected in Laemmli buffer (0.125 mM Tris (pH 7.5), 4% SDS, 4% glycerol, 1% 2-mercaptoethanol) and proteins were separated by SDS-PAGE (12% self-casted gels) and transferred onto nitrocellulose membranes (0.45 μ m; Amersham Protan; GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Membranes were blocked o/n at 4°C or 1 h RT with PBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) containing 5% non-fat dry milk. Anti-HA tag antibodies (Roche, Basel, Switzerland) and incubated for 90 min. The chemiluminescence reaction (Super SignalWest Dura, Thermo Scientific) was revealed in Gene Genius Bio Imaging System (Syngene, Cambridge, UK).

For immunoprecipitation assays, 293-T cells were co-transfected with 1 μ g of HA-tagged caprine A3Z1, A3Z1Tr and FLAG-tagged VMV-Vif plasmids. Assay for heterodimer complex were also carried by immunoprecipitation, 293-T transfected with HA-tagged ovine A3Z2, A3Z3, A3Z2Z3 and FLAG-tagged A3Z1Tr. For cofactor studies, 293-T were co-transfected with HA-tagged CYPA or CBF- β and FLAG-tagged VMV-Vif. After 48h post transfection, FLAG conjugated agarose beads (Sigma) were used for IP with cell lysates. Precipitated proteins were washed 3 times with lysis buffer, eluted with SDS sample buffer followed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and immunostaining using anti-HA antibodies (Sigma). An input charge of 10% was previously stored in lysis buffer (Tris-HCl 50mM, NaCl 500mM, EDTA 1mM, 2-mercaptoethanol 1mM, Glicerol 5%, Triton 1% and NP40 1% at pH 7.5).

Image Analysis

Western blot image analysis was performed using ImageJ version 1.44p (W. S. Rasband; ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, <http://imagej.nih.gov/ij/>).

mRNA expression

Total RNA isolation from TIGEF and 293-T cells was performed by chloroform extraction and isopropanol precipitation. RNA was treated with TurboDNaseI (Ambion)

and purified by extraction with phenol acid, chloroform, and ethanol precipitation. Total RNA (1 µg) was retrotranscribed to cDNA (PrimeScript RT Reagent Kit, Takara) using oligo-dT primers. Quantitative RT-PCR based on SYBR Green fluorescence was carried out using an Agilent™ Real-Time PCR Detection System. β-actin was used as housekeeping gene for relative quantification using the $2^{-\Delta C_t}$ or $2^{-\Delta\Delta C_t}$ methods.

Autophagosome and proteasome inhibition experiments

293-T cells transfected with A3Z1, Vif or Vif^{mut} and CYPA were treated with 10 µM Bafylomicin (BAF, Sigma-Aldrich) and/or 50 nM MG132 (Sigma-Aldrich) for 18 hours as specific inhibitors of autophagosome and proteasome activities, respectively. Control cells were treated with DMSO and all cell lysates were analyzed by western blot.

For *in vitro* studies, OSF were infected with SRLV from the genotype A (strain EV1) (Sargan et al., 1991) at 0.5 MOI previously treated with 10 µM BAF for 18 hours. Viral DNA was quantified using DNA from harvested cells 16 hours after infection and DNA extracted with EZNA DNA Blood Mini Kit (EZNA), according to the manufacturer's protocol. *Gag* (p17) segments were quantified by q-PCR as described previously (Gonzalez et al., 2005). Results were expressed as provirus copy number/ng DNA. Viral production was quantified by reverse transcriptase (RT) activity assay, in supernatants 72h after infection according to reverse transcriptase activity using a SYBR-green-based assay, as previously described (SG-PERT) (Vermeire et al., 2012). The test was repeated at least three times in all the experiments.

Statistics

Statistical analyses were performed with the GraphPad Prism 5.01 program. The non-parametric Mann Whitney test was used in CYPA mRNA assays and infection assays.

RESULTS

Vif-mediated degradation of APOBEC3

Previous data indicate that the A3-Vif interaction is more promiscuous than previously appreciated in the case of VMV. We asked whether all A3 proteins were susceptible to VMV-Vif-mediated degradation. Sheep A3Z2, A3Z3 and A3Z2Z3 were susceptible to VMV-Vif degradation whereas A3Z1 and the spliceoform lacking the cytidine deaminase domain (A3Z1Tr) were fully resistant. None of the proteins was efficiently degraded by Vif^{mut}. Co-expression of each of the APOBEC3 proteins with A3Z1Tr did not affect Vif-mediated degradation (**Figure 1**). Co-immunoprecipitation between A3 proteins and A3Z1 showed binding in the case of A3Z3 and A3Z2Z3 but not in the case of A3Z2 (**Supplementary Figure 1**).

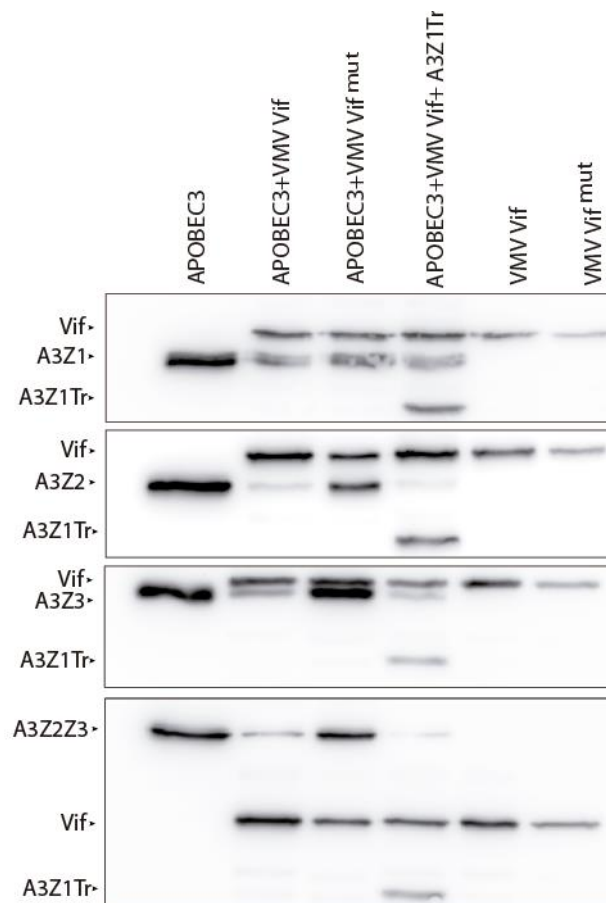


Figure 1. VMV-Vif degradation of HA-tagged ovine APOBEC3 proteins. Native Vif and proteasome recruitment-deficient Vif (Vif^{mut}) were used. WB anti-HA of 293-T cell lysates transfected with the indicated proteins. Protein names are indicated with an arrow.

The different phenotype exerted by ovine A3 proteins was further analyzed increasing both the amount of Vif and A3 proteins, either resistant A3Z1 or sensitive A3Z2Z3, respectively (**Figure 2**). A3Z2Z3 showed a susceptible degradation pattern at the lowest amount of Vif tested, and expression disappeared at the highest Vif concentration (**Figure 2A**). Accordingly, intensity of bands corresponding to Vif decreased together with increasing amounts of A3Z2Z3, suggesting a turnover of the Vif protein when degrading susceptible A3 proteins (**Figure 2B**). Conversely, A3Z1 was not degraded even in the presence of the highest quantity of Vif, and accordingly increasing amounts of A3Z1 did not modify the quantity of Vif (**Figure 2C and 2D**).

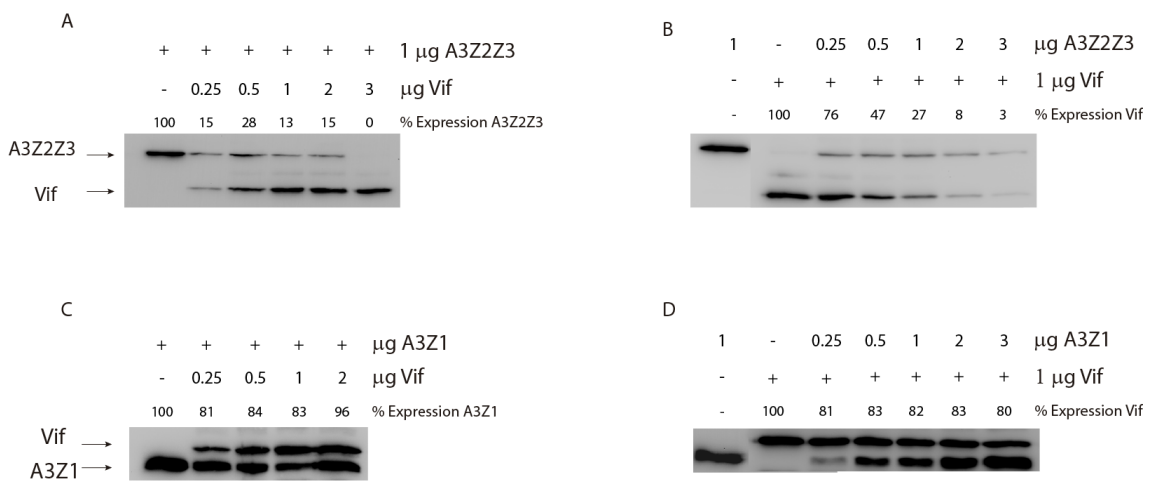


Figure 2. Dose dependent Vif degradation of A3Z2Z3 and A3Z1 proteins. Protein degradation in a Vif-dose dependent manner was revealed by western blot using anti-HA antibodies of 293-T cell lysates transfected with A3Z2Z3 (**A**) and A3Z1 (**C**), and in an APOBEC3-dose dependent manner (**B** and **D**)

VMV Vif affect A3Z1mRNA levels

In other lentiviral infections, protein-protein interactions between Vif and APOBEC3 are the responsible of the proteins degradation without influence at the RNA level (Guerrero et al., 2016). To explore a potential inhibition mechanism involving transcription in sheep, endogenous APOBEC3 mRNA relative expression was quantified in co-expression experiments including Vif or Vif^{mut}. Co-expression of Vif or Vif^{mut} altered A3 mRNA transcription exclusively in the case of A3Z1, inducing an overexpression. The rest of A3 proteins remained similarly expressed in comparison with empty plasmid transfection in TIGEF cells (**Figure 3**).

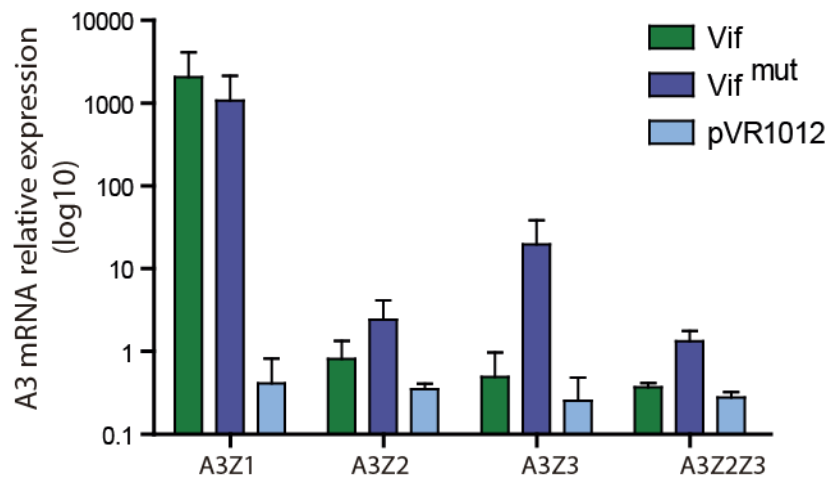


Figure 3. APOBEC3 mRNA relative expression. Caprine TIGEF cells were co-transfected with Vif, mutated Vif (Vif^{mut}) or empty plasmid and APOBEC3 mRNA relative expression quantified by q-PCR. mRNA relative expression was analysed with $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Cofactor requirement for A3Z1 degradation

VMV-Vif immunoprecipitated ovine CYPA and not CBF- β confirming previous findings in our cellular system (**Figure 4A**). As expected, A3Z2Z3 degradation was not affected by CBF- β but highly enhanced by CYPA co-expression. While around 40% of the A3Z2Z3 was degraded by Vif alone or in the presence of CBF- β , a 75% was degraded when CYPA was added (**Figure 4B**, upper panel). A3Z1 resistant phenotype was again observed in the presence of Vif and CBF- β , but similarly to A3Z2Z3, efficient degradation was achieved when CYPA was present (**Figure 4B**, lower panel).

Ovine A3 degradation by Vif was highly dependent on the amount of CYPA (**Figure 4C**, left panel), especially in the case of A3Z1. Interestingly, efficient degradation of A3 proteins was observed in cells co-transfected with Vif^{mut} and increasing amounts of CYPA, despite complete degradation of A3 proteins was not reached, suggesting that higher amounts of CYPA are needed when Vif^{mut} is present (**Figure 4C**; right panel).

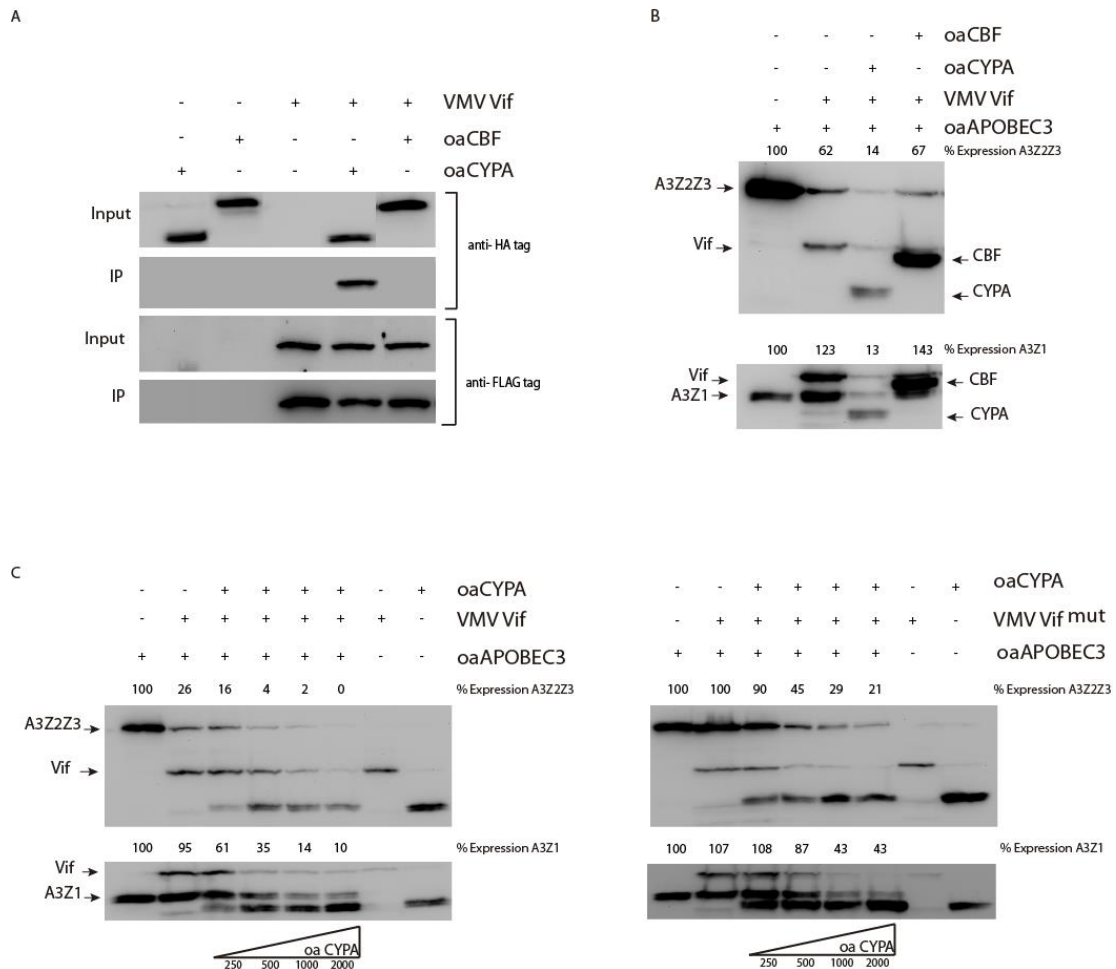


Figure 4. Co-factor requirements for ovine APOBEC3 degradation. (A) 293-T cells co-transfected with HA-tagged ovine CBF- β (oaCBF) or CYPA (oaCYPA) and FLAG-tagged VMV-Vif. After 48h, cell lysates were immunoprecipitated with anti-FLAG beads. Input lysates and co-immunoprecipitated samples were immunoblotted with anti-HA and anti-FLAG antibodies. (B) 293-T cells were co-transfected with HA-tagged CBF- β , CYPA, VMV-Vif and A3Z2Z3 (upper panel) or A3Z1 (lower panel) as specified. (C) 293-T cells were co-transfected with HA-tagged VMV-Vif (left panel) or VMV encoding a deficient Vif (Vif^{mut}; right panel) and increasing quantities of CYPA in the presence of A3Z2Z3 (upper panel) or A3Z1 (lower panel).

Cellular CYP A expression levels determines A3 degradation

Experiments co-expressing A3 proteins (resistant and susceptible to Vif degradation), Vif and CYP A were also carried out in SRLV target cells. TIGEF cells offered a completely different pattern of A3 degradation in comparison to that obtained in 293-T cells. While 293-T cells showed efficient A3 degradation when co-transfected with CYP A (**Figure 5A**), TIGEF cells showed a less effective degradation pattern (**Figure 5B**).

CYP A endogenous expression was quantified in both cell types by quantitative RT-PCR and expression was 6-fold higher in 293-T cells suggesting that CYP A threshold levels must be reached to induce A3 degradation (**Figure 6**).

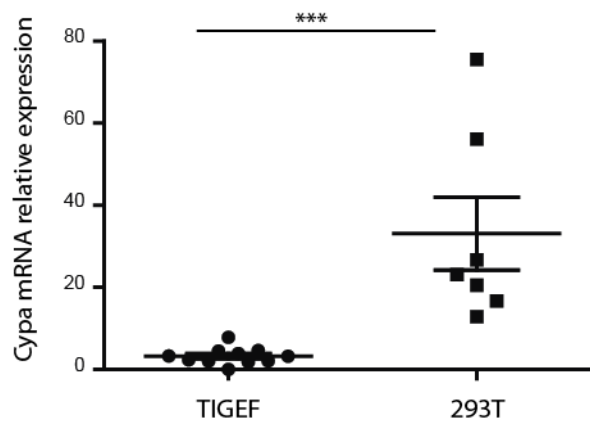
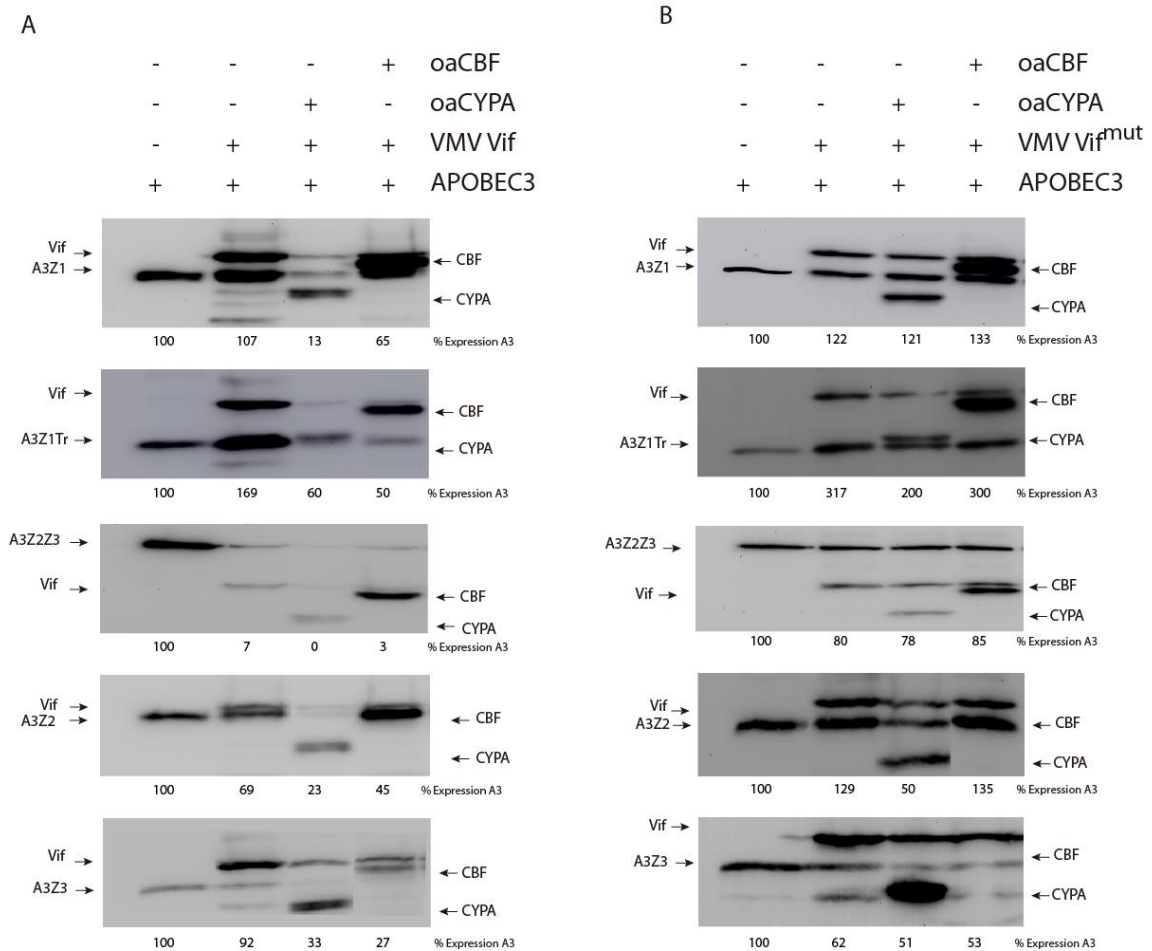


Figure 6. CYPA relative expression in 293T and TIGEF cells. mRNA CYPA relative expression was quantified by real time PCR in human 293T cells and caprine TIGEF cells.

Autophagy and proteasome inhibition restored A3 protein expression

Since Vif and Vif^{mut} seemed to be similarly efficient in degrading A3, as long as CYP A is present in enough quantities, we used MG132 to block proteasome degradation and A3 protein levels were not fully recovered (**Figure 7A**). Since Vif^{mut} is not able to recruit the ubiquitin ligase complex and therefore proteasome degradation, we questioned whether autophagy could be involved in this process. Inhibiting the autophagosome using bafilomycin A (BAF) in addition to MG132, A3Z1 protein levels increased until recovery compared to DMSO or MG132 controls (**Figure 7A**). Similar to MG132 treatment, autophagy inhibition with BAF did not itself restore initial A3Z1 protein levels, suggesting involvement of both degradation pathways (**Figure 7B**).

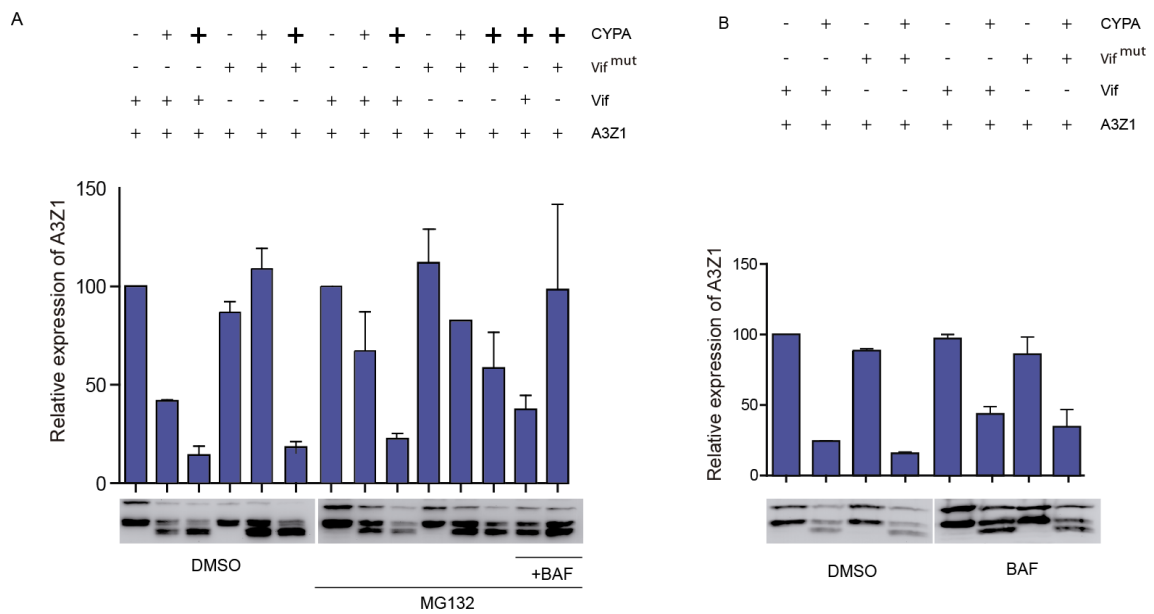


Figure 7. Proteasome and autophagy inhibition. 293T cells were co-transfected with plasmids expressing ovine HA-tagged CYPA, APOBEC3Z1 (A3Z1), VMV-Vif and VMV-Vif^{mut} as specified. (A) Lanes 3, 6, 9, 12, 13, and 14 were transfected with 2xCYPA plasmid. One day before collecting cell lysates, cultures were treated with proteasome inhibitor (MG132), autophagy inhibitor (Bafilomycin; BAF) or control (DMSO). (B) 293-T cells were transfected as specified and treated or not with BAF for 18h.

Autophagy inhibition enhances SRLV infection

Since autophagy may favor A3 degradation and therefore virus replication, we explored how autophagy inhibition could modify virus infectivity and production. Infected cells treated with BAF showed lower viral DNA levels and lower virus production (**Figure 8**).

Autophagy induction on infected cells was evidenced by LC3 western blotting analysis. OSF cells were treated with BAF for 16 hours, and infected with SRLV (EV1 strain). Lysates were analyzed by immunoblotting with antibodies to the autophagy marker LC3. Endogenous LC3 is detected as two bands, one represents LC3I (upper band) which is cytosolic, and the other LC3II (lower band) present on isolation membranes and autophagosomes. The amount of LC3II is closely correlated with the number of autophagosomes, serving as a good indicator of autophagosome formation. LC3II levels were reduced in SRLV infected cells suggesting autophagy induction. This effect was blocked when cells were pretreated with autophagy inhibitor BAF (**Figure 9**).

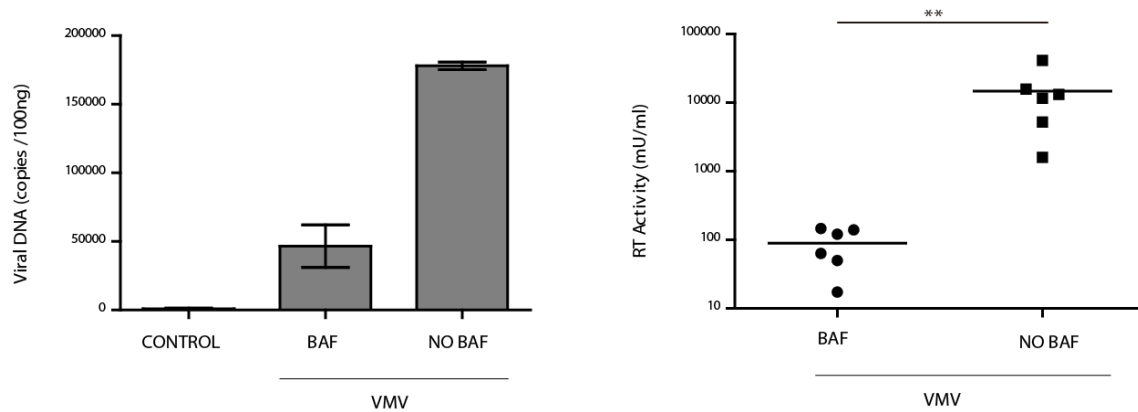


Figure 8. Effect of autophagy on SRLV infection. (A) Proviral load measured 16h post-infection by quantitative PCR in OSF upon infection with SRLV (EV1 strain). 16 h before infection, cells were treated with autophagy inhibitor (Bafilomycin; BAF) or control (DMSO). (B) Retrotranscriptase (RT) activity quantified by SG-PERT 72 hpi measured in supernatants from OSF infected with EV1 strain. 16 h before infection, cells were treated with autophagy inhibitor (Bafilomycin; BAF) or control (DMSO). Values expressed are the mean (\pm SEM) of viral DNA copies or RT activity measurements of at least 3 independent experiments.

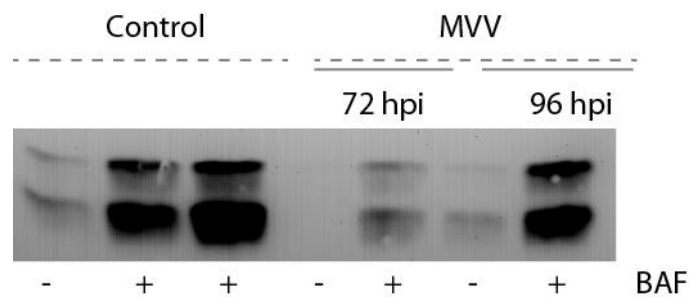


Figure 9. Blocking autophagy enhances SRLV infection. Effect of autophagy inhibitor (Bafilomycin; BAF) on SRLV infected cells evaluated by LC3 western blotting analysis. OSF cells were infected with EV1 strain for 72 and 96 h. One day before infection, cell cultures were treated with autophagy inhibitor (BAF) or control (DMSO). Lysates were analysed by immunoblotting with antibodies to the autophagy marker LC3.

DISCUSSION

SRLV is one of the most spread viral infections in sheep and goats around the world since efficient treatments or vaccines are not available. SRLV control strategies, based on serological diagnosis, do not account for the whole antigenic spectrum of SRLV and, furthermore not all the infected animals develop a detectable antibody production, jeopardizing precise and sensitive diagnosis. Recent findings suggest that restriction factors of the innate response are likely responsible for different degrees of virus inhibition and could help to develop new alternative strategies of control even at the cellular level.

Among them, APOBEC3 proteins are cytidine deaminases that mutate virus genome and restrict replication cycle. Studies indicate an antiviral role of specific ovine APOBEC3 proteins against both homologous (SRLV) and heterologous (HIV) lentiviral infections (Larue et al., 2010). Specifically, A3Z1 restriction properties have been described in the context of monocyte-macrophage maturation and in M1-proinflammatory macrophages, being A3Z1 expression increased in resistant cells. Alternative splicing of A3Z1, A3Z1Tr did not confer restriction, instead relieved the restriction exerted by A3Z1 and not A3Z2Z3 (de Pablo-Maiso et al., 2017). However, a detailed knowledge on the interplay between all ovine A3 proteins and SRLV Vif is lacking. Because therapeutic strategies aimed at inhibiting Vif-APOBEC3 interaction, it is important to consider the sensitivity to Vif. In this study, we determined the relative degradation of sheep A3 proteins by VMV competent and E3 ubiquitin-ligase complex recruitment deficient Vif, and analyzed co-factor requirements. While sheep A3Z2, A3Z3 and A3Z2Z3 were susceptible to VMV-Vif degradation, A3Z1 and A3Z1Tr were fully resistant (**Figure 1**). Despite being resistant, A3Z1 and A3Z1Tr likely interact with SRLV Vif and some of the remaining A3 proteins, although without protection from Vif degradation, suggesting a regulation role for A3Z1Tr in the evasion of lentiviruses by decreasing the amount of available Vif.

Specifically, A3Z2Z3 revealed a susceptible pattern degradation even with very low Vif quantities, without mRNA alteration. By increasing A3Z2Z3 amounts, Vif signal disappeared, suggesting a recycling of the protein itself when degrading susceptible A3 proteins (**Figure 2B - D**). On the other hand, A3Z1 showed a resistant phenotype even in the presence of the highest Vif concentration. Similarly, previous studies suggest that ovine and feline A3Z1 and human A3A are resistant to Vif mediated degradation,

despite efficient binding (de Pablo-Maiso et al., 2017; Goila-Gaur et al., 2007; Stavrou et al., 2014).

Remarkably, A3Z1 mRNA was increased in the presence of Vif, potentially masking the observed resistance. However, mRNA increase was also observed in the presence of Vif^{mut} that does not lead to proteasome degradation of APOBEC3, indicating that resistance to Vif is not due to differential transcription.

SRLV recruit cellular CYPA, through Vif binding in order to form the ubiquitin ligased complex, instead of CBF- β which is the cofactor used by primate lentiviruses (Kane et al., 2015; Yoshikawa et al., 2016a). CYPA played an essential role in the process to regulate ligase assembly indicating that there is a modular conservation and lineage-specific preference for cellular partners required by Vifs from different subgroups of lentiviruses (Zhao et al., 2019). Furthermore, A3Z2Z3 degradation was not affected by CBF- β but enhanced by CYPA co-expression in a dose-dependent manner. However, in the case of the resistant A3Z1, CYPA was essential but not sufficient, in inducing A3Z1 degradation. The need to join CYPA remained for the remaining APOBEC3 proteins, but to a lesser extent suggesting that CYPA may be a potential key regulator in the evasion of A3Z1 from Vif. Depending on CYPA expression levels in the different cells types, as we observed in TIGEF and 293-T cells, APOBEC3 degradation was avoided or favored, respectively. CYPA has relatively promiscuous interactions according to the different lentivirus, so while HIV-1 capsid binds to CYPA (Towers et al., 2003), VMV capsid does not (Kane et al., 2015). This lack of interaction combined with high concentrations of intracellular CYPA may have originated the evolutionary process by which Vif recruits CYPA for A3Z1 degradation.

Interestingly, CYPA enabled APOBEC3 protein degradation, in the presence of Vif but also Vif^{mut}, which is unable to recruit E3 ubiquitin ligase complex. CYPA contributes to Vif-A3 interactions (Zhao et al., 2019), potentially overcoming SLQ motif in Vif and ELOC binding, this may explain Vif^{mut}-mediated degradation of ovine APOBEC3. Alternatively, Vif^{mut} may recruit alternative degradation pathways such as autophagy.

Proteasome inhibition partially recovered protein levels suggesting that other proteolytic processes may be involved. However, BAF treatment to inhibit autophagosome formation did not retrieved initial protein levels, and only the combination of both treatments restored initial protein levels. These findings clearly suggest that both pathways may be activated by Vif in order to degrade A3 proteins depending on the CYPA levels and the ability of Vif to recruit the ubiquitin complex. Indeed, infection was altered when autophagy inhibitors were used in terms of proviral

load as well as virus production indicating that as HIV, SRLV may take advantage of inducing autophagy. This process would lead to the clearance of Vif-resistant APOBEC3 proteins, thereby attributing novel functions for Vif and CYPA in the ovine lentiviral infection.

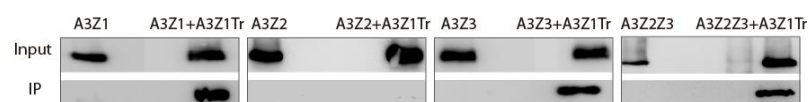
Acknowledgements: We sincerely acknowledge Valgerdur Andresdottir for her constant help in discussions and Vif plasmid. Funded by CICYT (AGL2013-49137-C3-1-R) and Navarra's Government (PI042-LENTIMOL). Ramsés Reina was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation "Ramón y Cajal" contract. We acknowledge support of the publication fee by the Public University of Navarra and CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URICI).

REFERENCES

- Ballandras-Colas, A., Maskell, D.P., Serrao, E., Locke, J., Swuec, P., Jonsson, S.R., Kotecha, A., Cook, N.J., Pye, V.E., Taylor, I.A., Andresdottir, V., Engelman, A.N., Costa, A., Cherepanov, P., 2017. A supramolecular assembly mediates lentiviral DNA integration. *Science* 355, 93-95.
- Bishop, K.N., Holmes, R.K., Sheehy, A.M., Davidson, N.O., Cho, S.J., Malim, M.H., 2004a. Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Current biology : CB* 14, 1392-1396.
- Bishop, K.N., Holmes, R.K., Sheehy, A.M., Malim, M.H., 2004b. APOBEC-mediated editing of viral RNA. *Science* 305, 645.
- Cardinaux, L., Zahno, M.L., Deubelbeiss, M., Zanoni, R., Vogt, H.R., Bertoni, G., 2013. Virological and phylogenetic characterization of attenuated small ruminant lentivirus isolates eluding efficient serological detection. *Vet Microbiol* 162, 572-581.
- de Pablo-Maiso, L., Glaria, I., Crespo, H., Nistal-Villan, E., Andresdottir, V., de Andres, D., Amorena, B., Reina, R., 2017. Characterization of Ovine A3Z1 Restriction Properties against Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs). *Viruses* 9.
- Goila-Gaur, R., Khan, M.A., Miyagi, E., Kao, S., Strebel, K., 2007. Targeting APOBEC3A to the viral nucleoprotein complex confers antiviral activity. *Retrovirology* 4, 61.
- Gonzalez, B., Reina, R., Garcia, I., Andres, S., Glaria, I., Alzueta, M., Mora, M.I., Jugo, B.M., Arrieta-Aguirre, I., de la Lastra, J.M., Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., Esteban, M., Grillo, M.J., Blacklaws, B.A., Harkiss, G.D., Chebloune, Y., Lujan, L., de Andres, D., Amorena, B., 2005. Mucosal immunization of sheep with a Maedi-Visna virus (MVV) env DNA vaccine protects against early MVV productive infection. *Vaccine* 23, 4342-4352.
- Grosfeld, H., Hill, M.G., Collins, P.L., 1995. RNA replication by respiratory syncytial virus (RSV) is directed by the N, P, and L proteins; transcription also occurs under these conditions but requires RSV superinfection for efficient synthesis of full-length mRNA. *J Virol* 69, 5677-5686.
- Guerrero, S., Libre, C., Batisse, J., Mercenne, G., Richer, D., Laumond, G., Decoville, T., Moog, C., Marquet, R., Paillart, J.C., 2016. Translational regulation of APOBEC3G mRNA by Vif requires its 5'UTR and contributes to restoring HIV-1 infectivity. *Sci Rep* 6, 39507.
- Harris, R.S., Bishop, K.N., Sheehy, A.M., Craig, H.M., Petersen-Mahrt, S.K., Watt, I.N., Neuberger, M.S., Malim, M.H., 2003. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113, 803-809.
- Jager, S., Kim, D.Y., Hultquist, J.F., Shindo, K., LaRue, R.S., Kwon, E., Li, M., Anderson, B.D., Yen, L., Stanley, D., Mahon, C., Kane, J., Franks-Skiba, K., Cimermancic, P., Burlingame, A., Sali, A., Craik, C.S., Harris, R.S., Gross, J.D., Krogan, N.J., 2011. Vif hijacks CBF-beta to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature* 481, 371-375.
- Kane, J.R., Stanley, D.J., Hultquist, J.F., Johnson, J.R., Mietrach, N., Binning, J.M., Jonsson, S.R., Barelier, S., Newton, B.W., Johnson, T.L., Franks-Skiba, K.E., Li, M., Brown, W.L., Gunnarsson, H.I., Adalbjornsdottir, A., Fraser, J.S., Harris, R.S., Andresdottir, V., Gross, J.D., Krogan, N.J., 2015. Lineage-Specific Viral Hijacking of Non-canonical E3 Ubiquitin Ligase Cofactors in the Evolution of Vif Anti-APOBEC3 Activity. *Cell Rep* 11, 1236-1250.
- Lacerenza, D., Giammarioli, M., Grego, E., Marini, C., Profiti, M., Rutili, D., Rosati, S., 2006. Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. *Vet Immunol Immunopathol* 112, 264-271.
- LaRue, R.S., Andresdottir, V., Blanchard, Y., Conticello, S.G., Derse, D., Emerman, M., Greene, W.C., Jonsson, S.R., Landau, N.R., Lochelt, M., Malik, H.S., Malim, M.H., Munk, C., O'Brien, S.J., Pathak, V.K., Strebel, K., Wain-Hobson, S., Yu, X.F., Yuhki, N., Harris, R.S., 2009. Guidelines for naming nonprimate APOBEC3 genes and proteins. *J Virol* 83, 494-497.
- LaRue, R.S., Jonsson, S.R., Silverstein, K.A., Lajoie, M., Bertrand, D., El-Mabrouk, N., Hotzel, I., Andresdottir, V., Smith, T.P., Harris, R.S., 2008. The artiodactyl APOBEC3 innate immune repertoire shows evidence for a multi-functional domain organization that existed in the ancestor of placental mammals. *BMC Mol Biol* 9, 104.

- Larue, R.S., Lengyel, J., Jonsson, S.R., Andresdottir, V., Harris, R.S., 2010. Lentiviral Vif degrades the APOBEC3Z3/APOBEC3H protein of its mammalian host and is capable of cross-species activity. *J Virol* 84, 8193-8201.
- Luo, K., Wang, T., Liu, B., Tian, C., Xiao, Z., Kappes, J., Yu, X.F., 2007. Cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3F interact with human immunodeficiency virus type 1 integrase and inhibit proviral DNA formation. *J Virol* 81, 7238-7248.
- Martinez-Navalon, B., Peris, C., Gomez, E.A., Peris, B., Roche, M.L., Caballero, C., Goyena, E., Berriatua, E., 2013. Quantitative estimation of the impact of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production by dairy goats. *Vet J* 197, 311-317.
- Ritchie, C., Hosie, B., 2014. Concern over maedi visna breakdowns. *Vet Rec* 175, 50-51.
- Sargan, D.R., Bennet, I.D., Cousens, C., Roy, D.J., Blacklaws, B.A., Dalziel, R.G., Watt, N.J., McConnell, I., 1991. Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi-visna virus. *J Gen Virol* 72 (Pt 8), 1893-1903.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., Malim, M.H., 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646-650.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Malim, M.H., 2003. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* 9, 1404-1407.
- Sigurdsson, B., Palsson, P., Grimsson, H., 1957. Visna, a demyelinating transmissible disease of sheep. *J Neuropathol Exp Neurol* 16, 389-403.
- Stavrou, S., Crawford, D., Blouch, K., Browne, E.P., Kohli, R.M., Ross, S.R., 2014. Different modes of retrovirus restriction by human APOBEC3A and APOBEC3G in vivo. *PLoS Pathog* 10, e1004145.
- Towers, G.J., Hatzioannou, T., Cowan, S., Goff, S.P., Luban, J., Bieniasz, P.D., 2003. Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors. *Nat Med* 9, 1138-1143.
- Vermeire, J., Naessens, E., Vanderstraeten, H., Landi, A., Iannucci, V., Van Nuffel, A., Taghon, T., Pizzato, M., Verhasselt, B., 2012. Quantification of reverse transcriptase activity by real-time PCR as a fast and accurate method for titration of HIV, lenti- and retroviral vectors. *PLoS One* 7, e50859.
- Yoshikawa, R., Izumi, T., Nakano, Y., Yamada, E., Moriwaki, M., Misawa, N., Ren, F., Kobayashi, T., Koyanagi, Y., Sato, K., 2016a. Small ruminant lentiviral Vif proteins commonly utilize cyclophilin A, an evolutionarily and structurally conserved protein, to degrade ovine and caprine APOBEC3 proteins. *Microbiol Immunol* 60, 427-436.
- Yoshikawa, R., Nakano, Y., Yamada, E., Izumi, T., Misawa, N., Koyanagi, Y., Sato, K., 2016b. Species-specific differences in the ability of feline lentiviral Vif to degrade feline APOBEC3 proteins. *Microbiol Immunol* 60, 272-279.
- Zhao, Z., Li, Z., Huan, C., Wang, H., Su, X., Zhang, W., 2019. CAEV Vif Hijacks ElonginB/C, CYPA and Cullin5 to Assemble the E3 Ubiquitin Ligase Complex Stepwise to Degrade oaA3Z2-Z3. *Front Microbiol* 10, 565.

SUPPLEMENTARY MATERIAL



Supplementary Figure 1. 293-T cells were co-transfected with HA-tagged APOBEC3 and FLAG-tagged A3Z1Tr. After 48h cell lysates were immunoprecipitated with anti-FLAG beads. Input lysates and co-immunoprecipitated samples were immunoblotted with anti-HA and anti-FLAG antibodies.

CHAPTER III

Sendai Virus, a strong inducer of anti-lentiviral state in ovine cells

ABSTRACT

Small ruminant lentiviruses (SRLV) are widely spread in the ovine and caprine populations and no treatments or protective vaccines have been developed. Vaccine development is hindered by the high genetic heterogeneity of lentiviruses and the selection of T-cell and antibody escape mutants, requiring antigen delivery optimization. Sendai virus (SeV) is a mouse respiratory paramyxovirus that has been recognized as a potent inducer of innate immune responses in several species, including mouse and humans. Here, we present SeV as a strong inducer of an antiviral state in ovine cells. We have used SeV encoding GFP (SEV-GFP) to infect different small ruminant lentiviruses (SRLV) susceptible cells. Most of ovine cells were efficiently infected by SeV, including alveolar macrophages (AM), blood derived macrophages (BDM) or skin fibroblasts (OSF) without evidence of replication or transmission. SeV infection induced an antiviral state in AM from SRLV naturally infected animals as well as in *in vitro* infected BDM and OSF from non-infected animals. Supernatants from ovine myeloid SeV-infected cells induced an antiviral state when transferred to fresh ovine cells challenged with SRLV. In addition, infectivity of a HIV-1 GFP vector, was also restricted in ovine cells infected with SeV. In myeloid cells, an M1-like proinflammatory polarization was observed together with an APOBEC3Z1 induction among other lentiviral restriction factors. Our observations encourage new approximations in ameliorating the SRLV burden by stimulation of the innate immune response.

de Pablo-Maiso, L.; Echeverría, I.; Luján, L.; de Andrés, D.; Garcin, D.; Nistal-Villán, E.; Reina, R.
(Manuscript in preparation)

INTRODUCTION

Small ruminant lentiviruses (SRLV) are a group of viruses widely spread around the world causing a multiorgan disease affecting animal welfare and production (Blacklaws, 2012). SRLV comprises Visna Maedi virus (VMV), the first lentivirus discovered and a good model for HIV studies, as recently described for the integrase supramolecular assembly (Ballandras-Colas et al., 2017); and the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV), that have originated lentiviral vectors for gene transfer (Mselli-Lakhal et al., 2006).

Vaccination is the best known prophylactic strategy to prevent viral infections in the veterinary field allowing the exhaustive control of different viral diseases (Patel et al., 2012). However, vaccines for most animal lentiviruses are not currently available and control is achieved by serological diagnosis, isolation and slaughtering of the infected animals (Minguijon et al., 2015). Failure of serological tests to detect the whole antigenic spectrum that SRLV exhibit in the nature, the presence of low antibody responders, or recently infected animals are clear drawbacks of the current control strategies (Ritchie and Hosie, 2010, 2014).

Vaccination against SRLV in sheep and goats has been explored by means of live virus, recombinant proteins, DNA immunization as well as live attenuated strains (Reina et al., 2013). At best, induction of humoral and cellular immune responses conferred partial protection in terms of virus presence or disease development against homologous challenge (Blacklaws, 2012; Reina et al., 2013). The efficacy of these vaccines against heterologous genotypes, different from the one used in the immunogen design, remains unknown and the protection at the long term is highly questioned since escape mutants are expected (Simon et al., 2015).

Stimulation of the innate immune response may relieve these limitations by inducing type I and type III interferons (IFN), triggering antiviral responses in the absence of specific recognition of viral epitopes. This stimulation may activate the cell defensive barriers preventing the infection of incoming viruses. In addition, stimulation of this response could be used to control chronic infected cells, lowering the viral load and allowing a better control of the infection. Several IFN-induced proteins are considered responsible of the species-specific restriction of lentiviruses, being TRIM5 α , APOBEC3 and Tetherin able to block different steps of the viral replication cycle (Sironi et al., 2015). Indeed, recent research based on Next Generation Sequencing have

identified a series of interferon-stimulated genes (ISGs) related to SRLV infection or disease development such as RIG-I or SAMHD1 (Thompson et al., 2016).

SRLV can target and stably infect macrophages, controlling cellular response in order to maintain a sustained replication. In addition, macrophages have been proposed as one of the reservoirs in lentiviral replication (Sattentau and Stevenson, 2016). SRLV can control macrophage responses modulating differentiation and secretion of cytokines (Crespo et al., 2013; Juste et al., 1996; Legastelois et al., 1997; Legastelois et al., 1998), however the underlying mechanisms of such control, are not fully characterized. Proinflammatory macrophages (classically activated or M1) are known as a differentiation state that can restrict lentiviral replication in humans (Cassetta et al., 2011) but also in sheep (Crespo et al., 2013).

Sendai virus (SeV) is a paramyxovirus that infects rodents causing a respiratory disease. Recognition of virus infection by intracellular cellular PRRs (mainly RIG-I like receptors or RLRs) induces an intracellular signaling that triggers the transcription of antiviral genes (Ishii et al., 2008). This immune activation has prompted the development of SeV-derived vectors for vaccination (Seki and Matano, 2016) inducing a well characterized type-I IFN antiviral response (Kamga et al., 2005). Their products drive further gene induction to amplify and regulate the primary cellular antiviral state that acts as a barrier for viral replication, but also functions to educate the innate and adaptive immune responses. SeV derived vaccines are currently being tested against a series of pathogens including lentiviruses such as HIV-1 (Nyombayire et al., 2017).

Here, we hypothesize that SRLV control could be enabled by stimulating alternative pathways or over-stimulating pattern recognition receptor (PRRs) controlled by SRLV. Such induction could restore cell defenses and recover the intrinsic immune response against SRLV aiming at an eventual viral clearance. Relative mRNA expression of M1/M2 ovine macrophage differentiation markers as well as lentivirus restriction factors revealed a proinflammatory pattern in ovine myeloid cells after SeV infection. SRLV susceptible cells, such as fibroblasts, blood-derived as well as alveolar macrophages were efficiently infected by SeV without detectable replication. SRLV DNA, RNA levels and virus production were measured in naturally or *in vitro* SRLV infected cells upon SeV infection. The antiviral state likely involved type-I IFN induction but differed among cell types evaluated.

MATERIAL AND METHODS

Samples and cell culture

Alveolar macrophages (AM) of 9 SRLV naturally infected sheep were obtained by bronchoalveolar lavage centrifugation at 800g for 10 minutes. Cell pellets were seeded in 12-well plates and incubated with RPMI complete medium (1% of vitamins, 10 mM sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids, 1% L-glutamine, 50 µM β-mercaptoethanol, 1% antibiotics/antimycotics mix) and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) as previously described (McNeilly et al., 2008).

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from SRLV-free sheep, checked by serology and PCR, were seeded in 12-well plates and adherent cells were allowed to differentiate into blood-derived macrophages (BDM) for twelve days of culture in RPMI complete medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS.

Primary cultures of ovine skin fibroblasts (OSF) were obtained from SRLV-seronegative animals as previously described (Bird et al., 1993) and used for propagation of SRLV stocks and for *in vitro* restriction studies. T-immortalized goat embryo fibroblasts (TIGEF; kindly provided by Dr. Y. Chebloune, University of Lyon) and goat synovial membrane cells (GSM-T; kindly provided by Dr. S. Valas, Anses Niort Laboratory, Niort Cedex) were grown in DMEM complete medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 1% L-glutamine, 1% antibiotics/antimycotics mix.

SRLV viral stocks from the genotype A (EV1 strain) (Sargan et al., 1991) and from the genotype B (496 strain) (Glaria et al., 2009) were titrated on OSF in 96-well culture plates by using the Reed-Müench method and used in *in vitro* infections as specified.

SeV-GFP vector encoding the green fluorescent protein (GFP) was grown in 10 days embryonated eggs for 72h and stocks of 10⁹ UFC/ml obtained, as previously described (Strahle et al., 2006).

Cell infection and virus quantification

AM, BDMs and OSF were infected with SeV-GFP virus vector at 10 MOI. SeV-GFP infectivity was determined by flow cytometry (FACScalibur) and under standard fluorescence microscopy.

SeV-infected BDM and OSF were further infected with SRLV at a MOI of 0.5, and SRLV viral production was quantified in supernatants 72h after infection according to SYBR Green based real time PCR enhanced reverse transcriptase assay (SG-PERT) (Vermeire et al., 2012). The test was repeated at least three times in all the experiments.

Viral DNA was measured in all cell types by qPCR performed 16h after infection with SRLV as previously described using different TaqMan probes for Ov496 and EV1 strains (Glaria et al., 2009; Gonzalez et al., 2005). In the case of the naturally infected AMs, viral DNA and RNA as well as RT activity were quantified 48h and 72h after infection with SeV-GFP, respectively.

Supernatants from AMs naturally infected with SRLV, and experimentally infected with SeV, were transferred to fresh OSF after 48h and cultured for 24h more. Then, OSF were infected with SRLV at a MOI of 0.5 for 4h, inoculum was retired, cells washed twice with PBS and incubated with normal medium. SRLV production was evaluated by SG-PERT, as described above, in the supernatants 72h after infection.

Supernatants from AM and BDM obtained 48-96h post-infection with SeV-GFP were evaluated by IFN- γ (Mabtech) and IL-4 (Thermo) commercial ELISAs following manufacturer's instructions.

Lentiviral vector infectivity

VSV-G pseudotyped HIV-GFP vector (kindly provided by Dr. Towers, University of London) was produced in 293-T cells by transfection of three plasmids as described (Jauregui et al., 2012) using JetPrime (PolyPlus). Supernatants obtained 48h after transfection were used at different dilutions as specified in the experiments.

HIV-1 GFP-based vector infectivity was analyzed by quantifying GFP integrated into cellular DNA, since SeV-GFP is not integrated into the host's chromosome. GFP copies were quantified by qPCR in an AriaMx Realtime PCR System (Agilent) following standard conditions (Jacques et al., 2016).

RNA extraction and quantitative RT-PCR assays

RNA extraction was performed by chloroform-isopropanol precipitation method. RNA was treated with TurboDNaseI (Ambion) and purified by extraction with phenol acid, chloroform and ethanol precipitation. One μ g of total RNA was retrotranscribed using PrimeScript RT Kit, (Takara) using oligo-dT primers. Amplification of different restriction factors (A3Z1, A3Z2Z3, OBST2, TRIM5 α and SAMHD1) and markers of the M1 and M2 pathways of macrophage differentiation (A3Z1, TNF- α , MR and DC-SIGN) was performed by q-PCR on an AriaMx Realtime PCR System (Agilent), using SYBR Premix Ex Taq (Takara) with primers previously described (Crespo et al., 2012; de Pablo-Maiso et al., 2017; Jauregui et al., 2012).

Primer3 software (Untergasser et al., 2012) was applied to design specific primers for SAMHD1 transcript variant X1 (Fw 5'-GAGAACGAAGCTGCTTAATTGTATCC-3'; Rv 5'-GAGGTGTGTCGATGATTCGGA-3') and OBST2 (Fw 5'-CGTGGACGGCCTCCAAG-3', Rv 5'-TGGCAGCTTCGGCTTCC-3'). Four different housekeeping genes (GAPDH, G6PDH, YAFWZ and β -actin) were evaluated. Data analyzed with NormFinder and GeNorm software showed β -actin as the more stable gene for relative quantification ($2^{-\Delta Ct}$ or $2^{-\Delta\Delta Ct}$ methods).

RIG-I expression was quantified with primers designed based on predicted *Ovis aries* *DDX58* sequence from Genbank XM_004005323.3 (Fw 5'-GCTGACGGCCTCAGTTGGT-3', Rv 5'-TCGAGAGAAGCACACAGTCTGC-3').

Type-I IFN bioassay

OSF were seeded at 2×10^4 per well in 96-well plates and used for a type-I IFN bioassay. Supernatant dilution of the different treated cells was done in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% Streptomycin and Penicillin. The assay was performed with triplicate dilutions of the supernatants added to the OSF and incubated at 37°C for 24 h. After incubation, supernatants were removed and cells infected at a MOI of 0.01 of the VSV-GFP recombinant virus and incubated at 37°C for 18h. Fluorescence measurement of VSV-GFP replication was performed on a Varioskan Flash plate reader (Thermo Scientific) with an excitation wavelength of 480 nm and emission of 518 nm.

Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out using PRISM version 5.01 (GraphPad) and SPSS Software (IBM, v.23). Statistical significance was assigned to $p < 0.001$ (***) , $p < 0.01$ (**) or $p < 0.05$ (*).

RESULTS

SeV infection is highly efficient in ovine cells

In order to test whether SeV can enter and replicate in ovine myeloid cells, alveolar macrophages (AM) (**Figure 1A**) and blood-derived macrophages (BDM) (**Figure 1B**), as well as skin fibroblasts (OSF) (**Figure 1C**) primary cell cultures were infected with SeV-GFP. Infection was very efficient 48 hours after infection in the three cell types tested reaching 100% of GFP positive cells. In addition to immune cells, ovine skin fibroblasts, routinely used to propagate SRLV *in vitro*, were infected with SeV-GFP very efficiently reaching 100% of cells expressing GFP, even after 13 passages in tissue culture (**Figure 1C**).

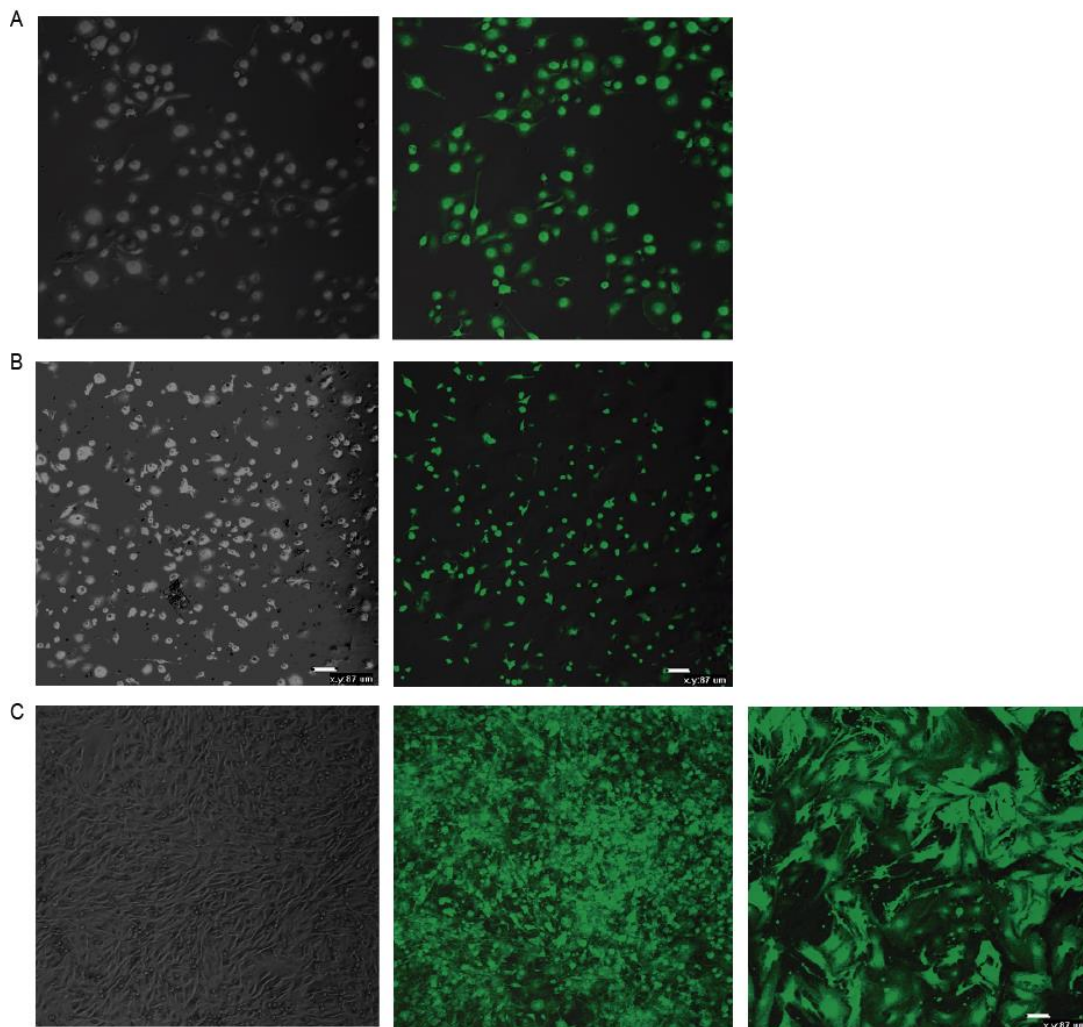


Figure 1. Sendai virus infection of ovine cells. Fluorescence microscopy images of alveolar macrophages (**A**), blood derived macrophages (**B**), and ovine skin fibroblasts (**C**) infected with Sendai virus vector expressing the green fluorescent protein (GFP). Ovine fibroblasts remained GFP-positive after 13 *in vitro* culture passages (C right panel).

SeV infection is stable in ovine cells

Transfer of supernatants from SeV-infected cells to fresh cultures resulted in GFP-negative events indicating that virus was not produced in ovine cells (**Supplementary Figure 1**), suggesting that the protease needed for F protein cleavage and SeV infectivity was not present in ovine cells. Furthermore, PCR amplification using GFP-specific primers from genomic DNA resulted negative in all cells tested, indicating lack of SeV-GFP integration into the chromosome, compared to HIV-1-GFP vector transduction.

SeV infection induces proinflammatory responses in ovine cells

Markers of the proinflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2) pathways of differentiation were evaluated in ovine myeloid cells upon infection with SeV. In both cases, AM and BDM, SeV infection induced an M1-like pattern characterized by high A3Z1 and low MR expression (**Figure 2**). A3Z1 was especially induced in AM (**Figure 2A**) and DC-SIGN was additionally decreased in BDM (**Figure 2B**). Noticeably, the high variability in the induction levels between animals could be attributed to genetic and immune status differences in each of the animals (data not shown).

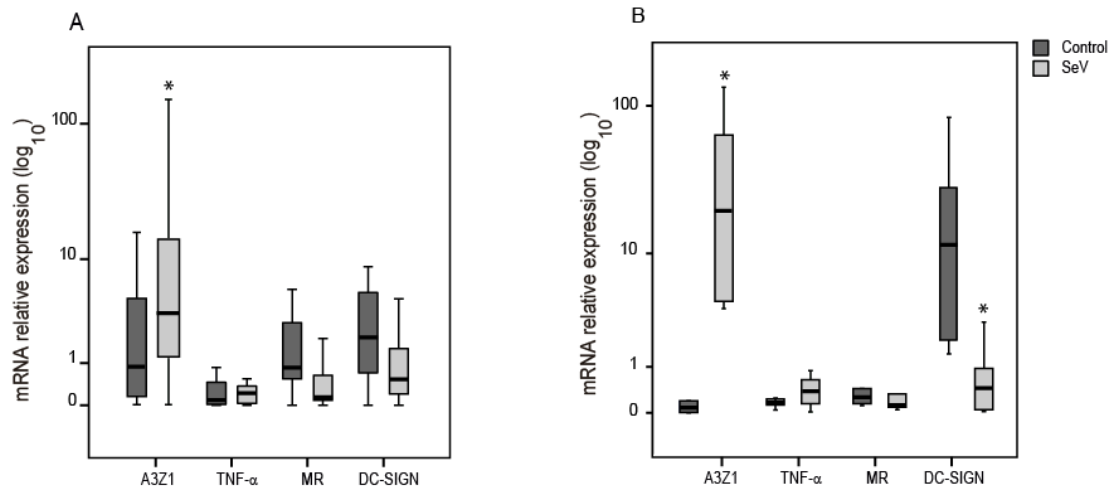


Figure 2. Differentiation markers in ovine myeloid cells infected with Sendai virus (SeV). Markers of M1 (A3Z1, TNF- α) and M2 (MR, DC-SIGN) differentiation pathways relative expression measured in alveolar macrophages (A) and blood derived macrophages (B). Values are the median (\pm interquartile range) of at least three independent experiments. * $p < 0.05$ (paired Mann-Whitney U Test).

SeV-infected cells reduced permissibility to SRLV infection

Since M1 differentiation pathway has been reported to inhibit SRLV infection, AM from naturally SRLV infected animals were infected with SeV and checked for viral DNA and RNA as well as RT activity in the supernatant. Viral DNA and viral p25 gene expression were non-significantly reduced ($p=0.25$ and $p=0.2$, respectively), however viral production was significantly inhibited in AMs (**Figure 3A**).

To extent these observations, BDMs from uninfected animals were experimentally infected *in vitro* with SRLV and treated or not with SeV. BDMs showed lower virus DNA levels and a slight reduction in viral RNA together with a reduced viral production when infected with SeV (**Figure 3B**).

In addition to immune cells, permissive skin ovine fibroblasts, routinely used to propagate SRLV *in vitro*, were also infected with SeV-GFP. Despite SRLV viral DNA only trend to be lower ($p=0.06$) and RNA levels were not significantly altered, SRLV viral production in the supernatant was inhibited (**Figure 3C**).

These results were extended to other SRLV permissive cell lines such as, TIGEF and GSM-T cells showing high rates of infection with SeV-GFP and significant restriction of SRLV replication and viral DNA levels (**Supplementary Figure 2**).

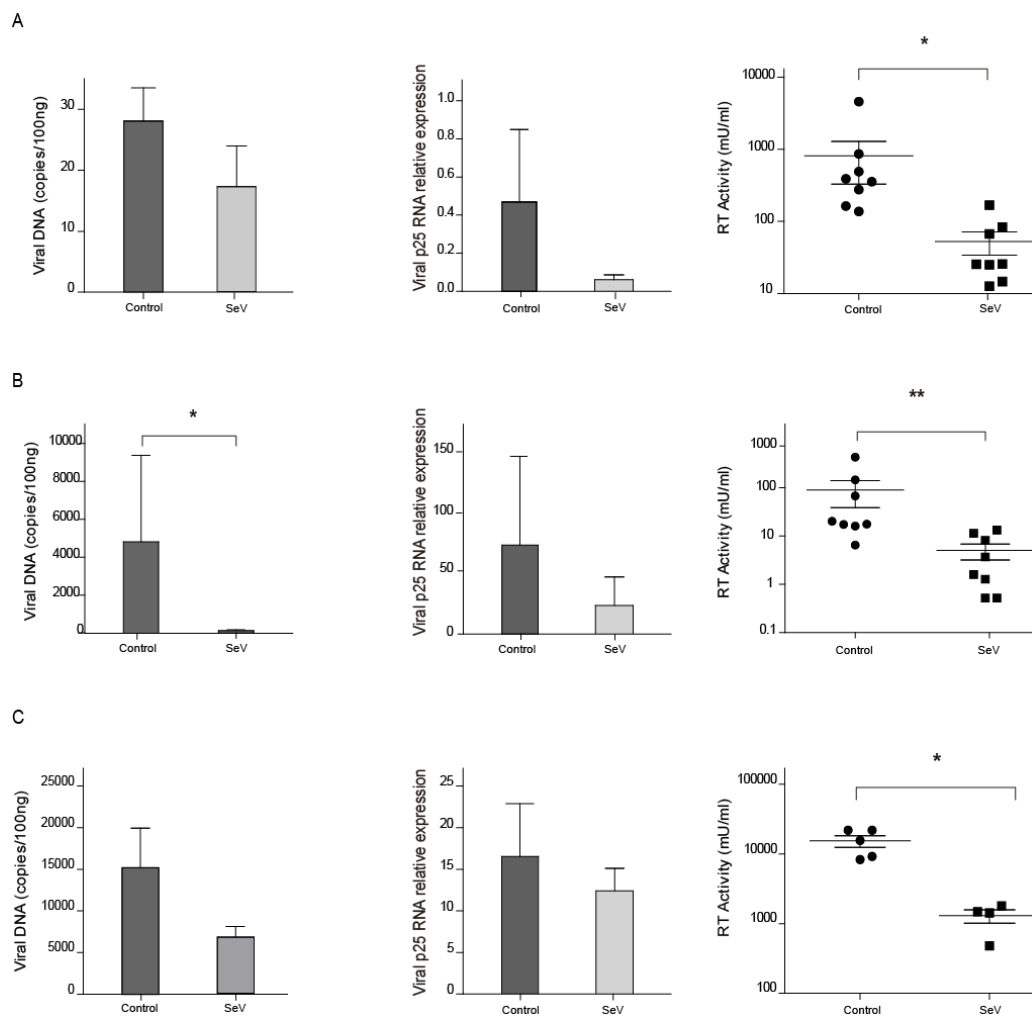


Figure 3. Small Ruminant Lentivirus (SRLV) restriction in Sendai virus (SeV) infected cells. Viral DNA measured 16h post-infection with SRLV at 0.5 MOI in control BDMs (grey bars) and infected with SeV (light grey bars). Values are the average (\pm SEM) of at least three independent experiments performed in triplicate (left panel). Gag-p25 mRNA relative expression in BDMs infected with SRLV and double infected with SRLV and SeV-GFP. Average values (\pm SEM) of at least three independent experiments performed in triplicate are represented (mid panel); and retrotranscriptase (RT) activity measured by SG-PERT in clarified supernatants from infected with SRLV (control) and double infected with SeV. The plots display median values \pm interquartile range (right panel) were measured in alveolar macrophages (**A**), blood derived macrophages (**B**) and skin fibroblasts (**C**). Differences were analyzed by using the Wilcoxon test (* p <0.05).

Ovine cells infected with SeV-GFP inhibit HIV-1-GFP vector infectivity

Beyond SRLV, the antiviral state induced in ovine cells after SeV infection may also affect the infectivity of heterologous lentiviruses such as HIV. HIV-1-GFP vector infectivity could be analyzed by qPCR of the GFP gene (**Figure 4A**, left panel). OSF and BDMs previously infected with SeV-GFP showed reduced HIV-1 vector infectivity (**Figure 4A**, right panel). Furthermore, HIV-1 vector production was less efficient in 293-T cells previously infected with SeV-GFP in single cycle infection experiments (**Figure 4B**).

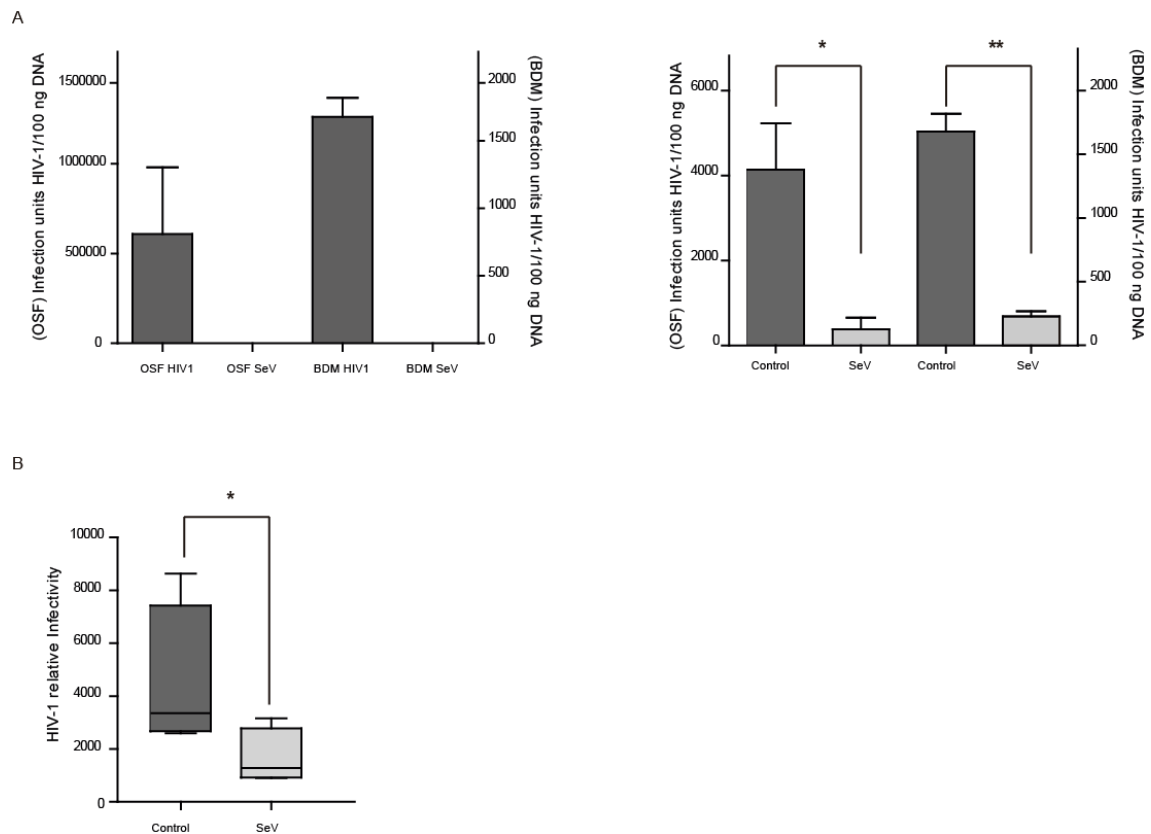


Figure 4. HIV-1 pseudotype restriction after Sendai virus (SeV) infection. (A) HIV-1 GFP-based vector proviral load quantification in ovine skin fibroblasts (OSF; left axe) and blood derived macrophages (BDM; right axe) uninfected (Control) or SeV infected. Values are the mean copies (\pm SEM) per 100 ng of total DNA (A left panel). GFP proviral copies measured in uninfected and SeV-infected OSF and BDM (A right panel) transduced with HIV-1 GFP-based vector. Values are the mean copies (\pm SEM) per 100 ng of total DNA. (B) Relative infectivity of HIV-1 pseudovirus produced in uninfected 293-T cells (gray bars) or infected with SeV (light gray bars). Values are the median (\pm interquartile range) of at least three independent experiments. Differences were statistically analyzed by using unpaired T test (one-tailed). * $p < 0.05$.

Restriction factors induced after SeV infection in ovine cells

Myeloid cells infected with SeV increased A3Z1 mRNA expression among described restriction factors against lentivirus infection. Other APOBEC3 proteins or other restriction factors such as tetherin, SAMHD1 or TRIM5 α were not induced upon SeV infection (**Figure 5A, B**). Indeed, SAMHD1 expression was lower in SeV in myeloid infected cells. Additionally, the expression of an interferon stimulated gene, retinoic acid inducible gene-I (RIG-I) increased in BDMs infected with SeV as compared to uninfected cells. This induction was also observed as a trend in OSF (p= 0.11; **Figure 5C**).

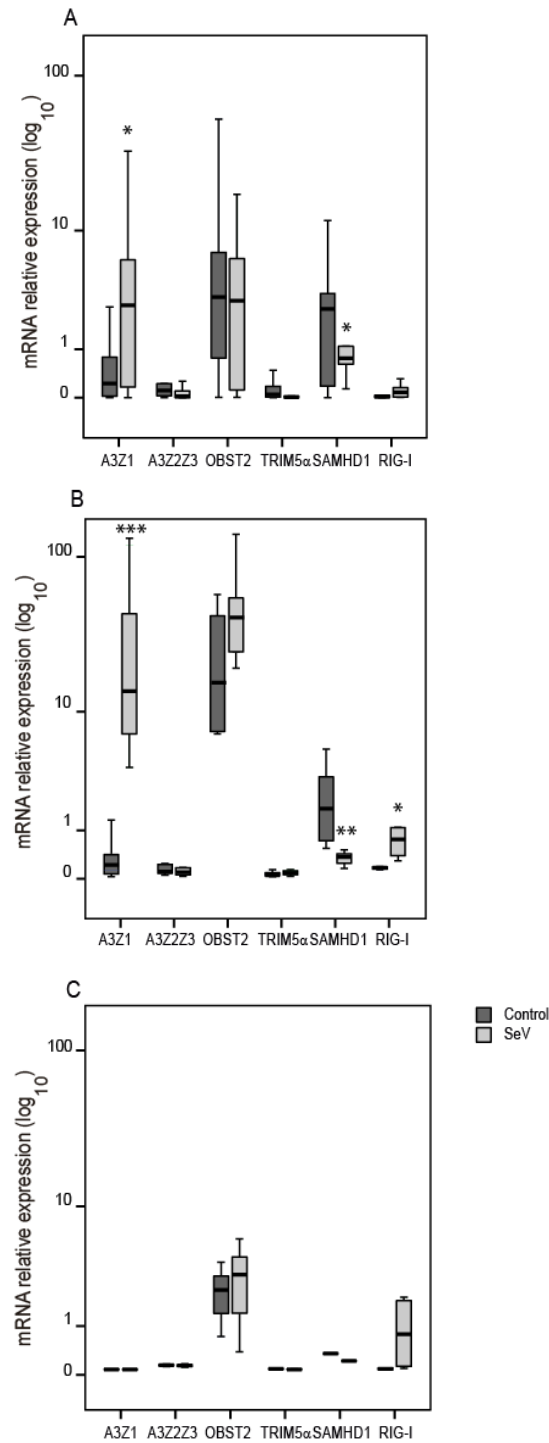


Figure 5. Restriction factors mRNA expression in SeV infected cells. Ovine APOBEC3 proteins (A3Z1 and A3Z2Z3), tetherin (OBST2), TRIM5 α , SAMHD1 and RIG-I mRNA expression was quantified in control (dark grey) and Sendai virus infected (light grey) alveolar macrophages (A), blood derived macrophages (B) and skin fibroblasts (C). Values are the median (\pm interquartile range) of at least three independent experiments. * $p < 0.05$ (paired Mann-Whitney U Test).

SeV infection may induce local resistance to SRLV

Since myeloid cells may induce antiviral responses through autocrine/paracrine mechanisms, SRLV production was evaluated in OSF cultured with supernatants from AMs previously infected with SeV-GFP. OSF treated in this way were infected with SRLV and viral production was reduced indicating that the resistance acquired upon SeV infection can be transferred to proximal cells (**Figure 6A**). Aiming at unveiling the mechanisms, supernatants from SeV infected AMs were tested in a type-I IFN bioassay for the induction of an antiviral state in fresh OSF cells. Supernatants from SeV infected AMs showed a clear interference, indicative of the presence of type I IFN (**Figure 6B**). Consequently, mRNA expression of restriction factors as interferon-stimulated genes was analyzed and increased BST2 expression was found after supernatant treatment (**Figure 6C**). Since AMs were naturally infected with SRLV and this may influence mRNA gene expression, RNA from SRLV experimentally infected OSF was also evaluated. A slightly increased A3Z1 mRNA expression and invariable BST2 mRNA levels were found, suggesting cell-specific induction of BST2 in SeV infected OSF (**Figure 6D**).

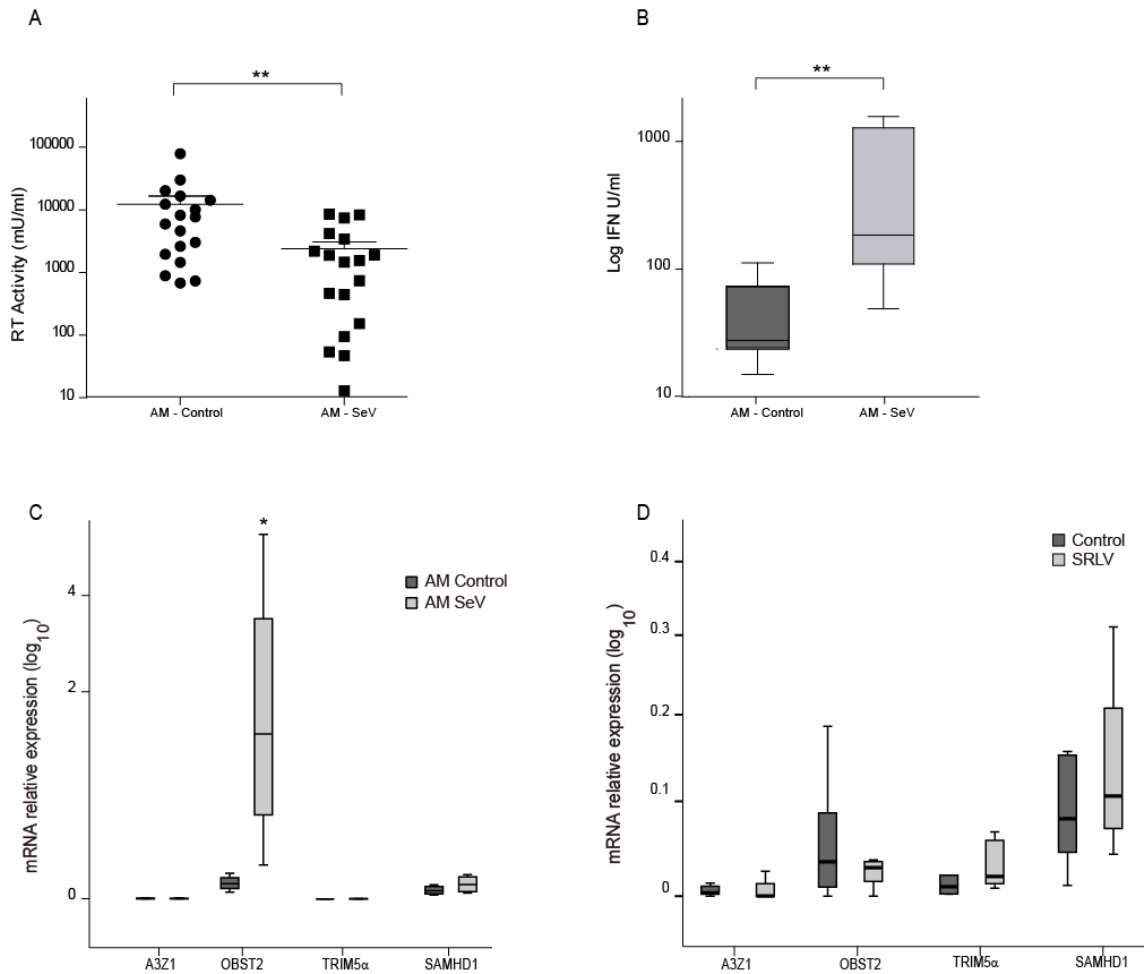


Figure 6. Antiviral activity induction. (A) Ovine skin fibroblasts cultured with supernatants from alveolar macrophages (AM) infected or not with Sendai virus (SeV) were infected with SRLV after 24h of supernatant treatment and retrotranscriptase (RT) activity measured by SG-PERT at 72h post infection. Data shown are the mean \pm SEM of at least three independent experiments. (B) Type-I IFN production measured in supernatants from AM control or infected with SeV. (C) Relative mRNA expression of restriction factors: ovine APOBEC3Z1 (A3Z1) tetherin (oBST2), TRIM5 α and SAMHD1 measured by quantitative RT-PCR in ovine skin fibroblast (OSF) cultured with supernatant from AM control or AM infected with SeV. Values are the median (\pm interquartile range) of at least three independent experiments. * $p < 0.05$ (Mann-Whitney paired U Test). (D) Relative mRNA expression of the restriction factors after infection with SRLV. Data shown are the mean \pm SEM of at least three independent experiments. * $p < 0.05$ (paired Mann-Whitney U Test).

DISCUSSION

SRLV are widespread in sheep and goats affecting animal health and production. Since no vaccines are readily available, control is based on serological diagnosis that fails at detecting all the infected animals. Antiretroviral therapy has not been tested in sheep due to obvious economic restrictions and immunization experiments induced humoral and cellular immune responses that conferred partial protection against homologous challenge (Reina et al., 2013). However, high mutation rates are at the basis of the escape mutants generation at the diagnostic and immunological levels (Reina et al., 2013; Skraban et al., 1999; Torsteinsdottir et al., 2007). Indeed, genetic as well as antigenic variation are currently wider than previously thought, with recent descriptions of novel genotypes and subtypes enlarging SRLV's antigenic spectrum, a concern that may involve the development of diagnostic tests and vaccines (Blacklaws, 2012; Olech et al., 2018).

Here, the induction of innate antiviral responses in SRLV permissive cells such as macrophages (tissue resident and circulating) and skin fibroblasts was achieved by infecting ovine cells with a non-replicative Sendai virus vector carrying GFP. Infection resulted in 100% of GFP-positive cells, which is by far higher than the rates reached with transfection or lentiviral transduction in ovine primary cultures. This high efficiency is particularly interesting in the case of macrophages, terminally differentiated cells that are refractory to transfection or transduction (Zhang et al., 2009). SeV infected cells tend to produce proinflammatory markers suggesting an immune activation that in turn, inhibited SRLV replication. Interestingly, restriction was observed in cells already infected with SRLV (AMs) and in SeV infected cells submitted to experimental lentivirus infection (BDMs and OSF) showing therapeutic and prophylactic potentialities, respectively. This is in agreement with previous observations linking proinflammatory responses with antiviral states in SRLV (Crespo et al., 2013; Herrmann-Hoesing et al., 2010; White et al., 2009) but also in other lentiviral infections (Cassetta et al., 2011; Mantovani et al., 2006).

SRLV inhibition was evidenced mainly at the virus production level in all cells tested. Viral DNA was decreased in *in vitro* infected BDMs, whereas no differences in AM from naturally infected animals were observed, probably due to low efficiency of primers in detecting field-circulating strains. Primers used may have missed the circulating strain in the flock of origin in natural infection, while efficiently amplified the SRLV strain used in *in vitro* infections.

Fibroblasts showed a non-significant reduction in viral DNA levels, suggesting that inhibition of SRLV replication occurs at different levels depending on the cell type. Consistently, viral RNA was reduced in BDMs and AMs indicating that a blockade was, at least partially, exerted before transcription.

APOBEC3 proteins exert one of the inhibitory mechanisms acting before transcription. Among APOBEC3 proteins, A3Z1 was upregulated in macrophages infected with SeV-GFP and has demonstrated an antiviral role in resistant cells such as M1 macrophages (de Pablo-Maiso et al., 2017). Similarly to the human orthologue A3A, ovine A3Z1 protein seems to play a major role in myeloid cells (M1-macrophages and monocytes, (de Pablo-Maiso et al., 2017) and this work) and not in other lentivirus permissive cells, such as fibroblasts, in which other APOBEC3 proteins may exert higher antiviral activity (Stavrou et al., 2014). Another restriction factor acting at pre-integration steps through dNTPs and/or viral RNA degradation, SAMHD1 (Franzolin et al., 2013) was in turn downregulated in ovine myeloid cells infected with SeV. SAMHD1 expression may reduce innate immune responses (Chen et al., 2018) that could be prevented by SeV infection.

SeV-GFP infection in OSF induced a different antiviral programming characterized by faint inductions of RIG-I and BST2, but not A3Z1. This different activation profile may account for the different restriction pattern observed, showing reduced viral production and unaltered viral DNA and RNA levels. Interestingly, SeV-GFP infection programmed ovine AMs to secrete antiviral factors with paracrine effects, potentially inducing an antiviral state in proximal cells, among them, type-I IFN was abundantly detected. Factors secreted induced BST2 expression in OSF in accordance with the restriction profile observed.

SeV may afford genetic regions of about 4Kb long which means that every lentivirus structural protein could be cloned into SeV vectors and tested *in vivo*, conferring stimulation of the innate immunity and proper antigen presentation. HIV-GFP infectivity was lower in OSF infected with SeV-GFP and also after transfection of lentiviral plasmids in SeV-GFP infected 293-T producer cells. Thus, SeV-GFP infection induced a non-specific antiviral state, able to restrict HIV-1 vectors that could also be expected against divergent SRLV strains. These features make the immunization with this vector deserving further investigation against SRLV.

SeV-based vectors are promising delivery tools for immunization studies due to stimulation of innate responses (Ishii and Matano, 2015; Seki and Matano, 2016). RIG-I increased expression after SeV infection has been checked in this study for the first

time employing ovine cells. SeV-GFP used here is supposed to produce low copy back defective interference RNA levels (cbDI) and therefore is considered a poor inducer of the RIG-I activation (Sanchez-Aparicio et al., 2017) and, in turn IFN-I production. However, infection with SeV-GFP vector stimulated the production of IFN-I and conferred a SRLV resistant phenotype, suggesting that low activation levels could be sufficient to elicit a protective response. Since SeV is a mouse adapted virus, the possibility that no IFN antagonistic activity is present in ovine cells may explain the induction of the type I IFN profile.

Protection efficacy of a vaccine highly depends on the pathogen itself, the specific immune correlates of protection and the delivery method used. Different delivery methods in immunization protocols against SRLV have been assayed (reviewed in (Blacklaws, 2012)). Plasmid transfection efficiency in ovine cells is commonly low *in vitro* using different transfection reagents, reaching at best about 30% of GFP-positive cells (personal observation) and the expected rate *in vivo* is even lower. Using SeV-GFP vector, 100% of the cells expressed GFP regardless they were from the myeloid lineage. Whether these rates of infection would be maintained *in vivo* is still unknown. Protein production (GFP) after SeV-GFP infection compared with plasmid transfection was higher and maintained longer, since after 13 passages *in vitro* OSF still presented 100% of the cells GFP-positive, suggesting that a long half-life of the recombinant encoded antigen could be expected.

Considering that SRLV infection affects millions of animals in the world in the absence of treatments or vaccines, further studies using SeV-GFP vector *in vivo* encoding different SRLV proteins may become a real alternative in the vaccination of animal lentiviruses.

Acknowledgements: We sincerely acknowledge Greg Towers, University College London for plasmids and protocols. Funded by CICYT (AGL2013-49137-C3-1-R; RTI2018-096172-B-C3-1) and Navarra's Government (PI042-LENTIMOL; PDR-210160006). Ramsés Reina was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation "Ramón y Cajal" contract. We acknowledge support of the publication fee by the Public University of Navarra and CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URICI).

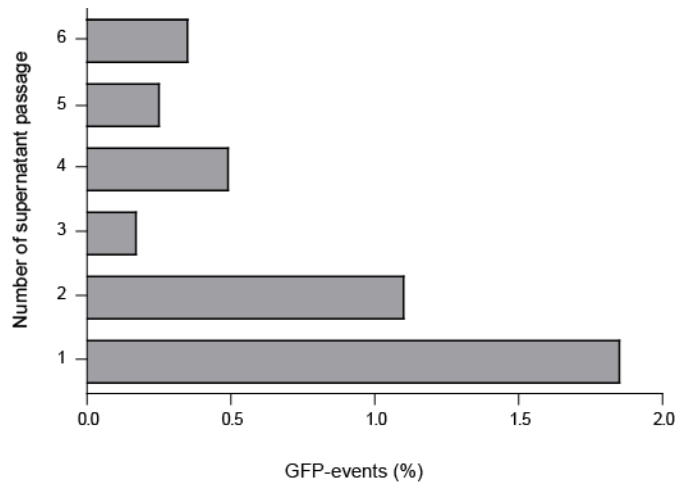
REFERENCES

- Ballandras-Colas, A., Maskell, D.P., Serrao, E., Locke, J., Swuec, P., Jonsson, S.R., Kotecha, A., Cook, N.J., Pye, V.E., Taylor, I.A., Andresdottir, V., Engelman, A.N., Costa, A., Cherepanov, P., 2017. A supramolecular assembly mediates lentiviral DNA integration. *Science* 355, 93-95.
- Bird, P., Blacklaws, B., Reyburn, H.T., Allen, D., Hopkins, J., Sargan, D., McConnell, I., 1993. Early events in immune evasion by the lentivirus maedi-visna occurring within infected lymphoid tissue. *J Virol* 67, 5187-5197.
- Blacklaws, B.A., 2012. Small ruminant lentiviruses: immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 35, 259-269.
- Cassetta, L., Cassol, E., Poli, G., 2011. Macrophage polarization in health and disease. *ScientificWorldJournal* 11, 2391-2402.
- Crespo, H., Bertolotti, L., Juganaru, M., Galaria, I., de Andres, D., Amorena, B., Rosati, S., Reina, R., 2013. Small ruminant macrophage polarization may play a pivotal role on lentiviral infection. *Vet Res* 44, 83.
- Crespo, H., Jauregui, P., Galaria, I., Sanjose, L., Polledo, L., Garcia-Marin, J.F., Lujan, L., de Andres, D., Amorena, B., Reina, R., 2012. Mannose receptor may be involved in small ruminant lentivirus pathogenesis. *Vet Res* 43, 43.
- Chen, S., Bonifati, S., Qin, Z., St Gelais, C., Kodigepalli, K.M., Barrett, B.S., Kim, S.H., Antonucci, J.M., Ladner, K.J., Buzovetsky, O., Knecht, K.M., Xiong, Y., Yount, J.S., Guttridge, D.C., Santiago, M.L., Wu, L., 2018. SAMHD1 suppresses innate immune responses to viral infections and inflammatory stimuli by inhibiting the NF-kappaB and interferon pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E3798-E3807.
- de Pablo-Maiso, L., Galaria, I., Crespo, H., Nistal-Villan, E., Andresdottir, V., de Andres, D., Amorena, B., Reina, R., 2017. Characterization of Ovine A3Z1 Restriction Properties against Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs). *Viruses* 9.
- Franzolin, E., Pontarin, G., Rampazzo, C., Miazzi, C., Ferraro, P., Palumbo, E., Reichard, P., Bianchi, V., 2013. The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 14272-14277.
- Galaria, I., Reina, R., Crespo, H., de Andres, X., Ramirez, H., Biescas, E., Perez, M.M., Badiola, J., Lujan, L., Amorena, B., de Andres, D., 2009. Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep. *Vet Microbiol* 138, 156-162.
- Gonzalez, B., Reina, R., Garcia, I., Andres, S., Galaria, I., Alzueta, M., Mora, M.I., Jugo, B.M., Arrieta-Aguirre, I., de la Lastra, J.M., Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., Esteban, M., Grillo, M.J., Blacklaws, B.A., Harkiss, G.D., Chebloune, Y., Lujan, L., de Andres, D., Amorena, B., 2005. Mucosal immunization of sheep with a Maedi-Visna virus (MVV) env DNA vaccine protects against early MVV productive infection. *Vaccine* 23, 4342-4352.
- Herrmann-Hoesing, L.M., Noh, S.M., Snekvik, K.R., White, S.N., Schneider, D.A., Truscott, T., Knowles, D.P., 2010. Ovine progressive pneumonia virus capsid antigen as found in CD163- and CD172a-positive alveolar macrophages of persistently infected sheep. *Vet Pathol* 47, 518-528.
- Ishii, H., Matano, T., 2015. Development of an AIDS vaccine using Sendai virus vectors. *Vaccine* 33, 6061-6065.
- Ishii, K.J., Koyama, S., Nakagawa, A., Coban, C., Akira, S., 2008. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe* 3, 352-363.
- Jacques, D.A., McEwan, W.A., Hilditch, L., Price, A.J., Towers, G.J., James, L.C., 2016. HIV-1 uses dynamic capsid pores to import nucleotides and fuel encapsidated DNA synthesis. *Nature* 536, 349-353.
- Jauregui, P., Crespo, H., Galaria, I., Lujan, L., Contreras, A., Rosati, S., de Andres, D., Amorena, B., Towers, G.J., Reina, R., 2012. Ovine TRIM5alpha can restrict visna/maedi virus. *J Virol* 86, 9504-9509.

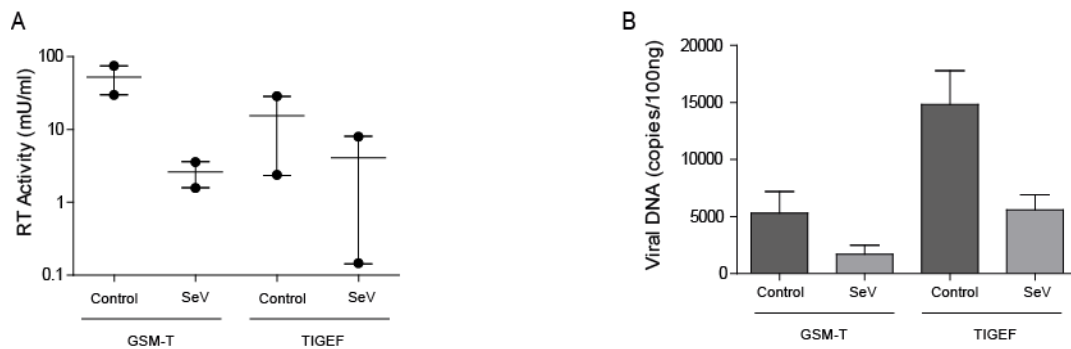
- Juste, R.A., Ott, T.L., Kwang, J., Bazer, F.W., de la Concha-Bermejillo, A., 1996. Effects of recombinant interferon-tau on ovine lentivirus replication. *J Interferon Cytokine Res* 16, 989-994.
- Kamga, I., Kahi, S., Develioglu, L., Lichtner, M., Maranon, C., Deveau, C., Meyer, L., Goujard, C., Lebon, P., Sinet, M., Hosmalin, A., 2005. Type I interferon production is profoundly and transiently impaired in primary HIV-1 infection. *J Infect Dis* 192, 303-310.
- Legastelois, I., Cottin, V., Mornex, J.F., Cordier, G., 1997. Alveolar macrophages from sheep naturally infected by visna-maedi virus contribute to IL-8 production in the lung. *Vet Immunol Immunopathol* 59, 131-139.
- Legastelois, I., Levrey, H., Greenland, T., Mornex, J.F., Cordier, G., 1998. Visna-maedi virus induces interleukin-8 in sheep alveolar macrophages through a tyrosine-kinase signaling pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18, 532-537.
- Mantovani, J., Holic, N., Martinez, K., Danos, O., Perea, J., 2006. A high throughput method for genome-wide analysis of retroviral integration. *Nucleic Acids Res* 34, e134.
- McNeilly, T.N., Baker, A., Brown, J.K., Collie, D., Maclachlan, G., Rhind, S.M., Harkiss, G.D., 2008. Role of alveolar macrophages in respiratory transmission of visna/maedi virus. *J Virol* 82, 1526-1536.
- Minguijon, E., Reina, R., Perez, M., Polledo, L., Villoria, M., Ramirez, H., Leginagoikoa, I., Badiola, J.J., Garcia-Marin, J.F., de Andres, D., Lujan, L., Amorena, B., Juste, R.A., 2015. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Vet Microbiol* 181, 75-89.
- Mselli-Lakhal, L., Guiguen, F., Greenland, T., Mornex, J.F., Chebloune, Y., 2006. Gene transfer system derived from the caprine arthritis-encephalitis lentivirus. *J Virol Methods* 136, 177-184.
- Nyombayire, J., Anzala, O., Gazzard, B., Karita, E., Bergin, P., Hayes, P., Kopycinski, J., Omosa-Manyonyi, G., Jackson, A., Bizimana, J., Farah, B., Sayeed, E., Parks, C.L., Inoue, M., Hironaka, T., Hara, H., Shu, T., Matano, T., Dally, L., Barin, B., Park, H., Gilmour, J., Lombardo, A., Excler, J.L., Fast, P., Laufer, D.S., Cox, J.H., Team, S.S., 2017. First-in-Human Evaluation of the Safety and Immunogenicity of an Intranasally Administered Replication-Competent Sendai Virus-Vectored HIV Type 1 Gag Vaccine: Induction of Potent T-Cell or Antibody Responses in Prime-Boost Regimens. *J Infect Dis* 215, 95-104.
- Olech, M., Valas, S., Kuzmak, J., 2018. Epidemiological survey in single-species flocks from Poland reveals expanded genetic and antigenic diversity of small ruminant lentiviruses. *PLoS One* 13, e0193892.
- Patel, J.R., Heldens, J.G., Bakonyi, T., Rusvai, M., 2012. Important mammalian veterinary viral immunodiseases and their control. *Vaccine* 30, 1767-1781.
- Reina, R., de Andres, D., Amorena, B., 2013. Immunization against small ruminant lentiviruses. *Viruses* 5, 1948-1963.
- Ritchie, C., Hosie, B., 2010. Increase in maedi-visna breakdowns. *Vet Rec* 167, 389.
- Ritchie, C., Hosie, B., 2014. Concern over maedi visna breakdowns. *Vet Rec* 175, 50-51.
- Sanchez-Aparicio, M.T., Garcin, D., Rice, C.M., Kolakofsky, D., Garcia-Sastre, A., Baum, A., 2017. Loss of Sendai virus C protein leads to accumulation of RIG-I immunostimulatory defective interfering RNA. *J Gen Virol* 98, 1282-1293.
- Sargan, D.R., Bennet, I.D., Cousens, C., Roy, D.J., Blacklaws, B.A., Dalziel, R.G., Watt, N.J., McConnell, I., 1991. Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi-visna virus. *J Gen Virol* 72 (Pt 8), 1893-1903.
- Sattentau, Q.J., Stevenson, M., 2016. Macrophages and HIV-1: An Unhealthy Constellation. *Cell Host Microbe* 19, 304-310.
- Seki, S., Matano, T., 2016. Development of a Sendai virus vector-based AIDS vaccine inducing T cell responses. *Expert Rev Vaccines* 15, 119-127.
- Simon, V., Bloch, N., Landau, N.R., 2015. Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. *Nat Immunol* 16, 546-553.

- Sironi, M., Cagliani, R., Forni, D., Clerici, M., 2015. Evolutionary insights into host-pathogen interactions from mammalian sequence data. *Nat Rev Genet* 16, 224-236.
- Skraban, R., Matthiasdottir, S., Torsteinsdottir, S., Agnarsdottir, G., Gudmundsson, B., Georgsson, G., Meloen, R.H., Andresson, O.S., Staskus, K.A., Thormar, H., Andresdottir, V., 1999. Naturally occurring mutations within 39 amino acids in the envelope glycoprotein of maedi-visna virus alter the neutralization phenotype. *J Virol* 73, 8064-8072.
- Stavrou, S., Crawford, D., Blouch, K., Browne, E.P., Kohli, R.M., Ross, S.R., 2014. Different modes of retrovirus restriction by human APOBEC3A and APOBEC3G in vivo. *PLoS Pathog* 10, e1004145.
- Strahle, L., Garcin, D., Kolakofsky, D., 2006. Sendai virus defective-interfering genomes and the activation of interferon-beta. *Virology* 351, 101-111.
- Thompson, J., Ma, F., Quinn, M., Xiang, S.H., 2016. Genome-Wide Search for Host Association Factors during Ovine Progressive Pneumonia Virus Infection. *PLoS One* 11, e0150344.
- Torsteinsdottir, S., Andresdottir, V., Arnarson, H., Petursson, G., 2007. Immune response to maedi-visna virus. *Front Biosci* 12, 1532-1543.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40, e115.
- Vermeire, J., Naessens, E., Vanderstraeten, H., Landi, A., Iannucci, V., Van Nuffel, A., Taghon, T., Pizzato, M., Verhasselt, B., 2012. Quantification of reverse transcriptase activity by real-time PCR as a fast and accurate method for titration of HIV, lenti- and retroviral vectors. *PLoS One* 7, e50859.
- White, S.N., Mousel, M.R., Reynolds, J.O., Lewis, G.S., Herrmann-Hoesing, L.M., 2009. Common promoter deletion is associated with 3.9-fold differential transcription of ovine CCR5 and reduced proviral level of ovine progressive pneumonia virus. *Anim Genet* 40, 583-589.
- Zhang, X., Edwards, J.P., Mosser, D.M., 2009. The expression of exogenous genes in macrophages: obstacles and opportunities. *Methods Mol Biol* 531, 123-143.

SUPPLEMENTARY MATERIAL



Supplementary Figure 1. GFP negative events after passages. OSF cells infected with supernatants of cells infected with SeV-GFP. The data represent positive GFP events at every cell passage in which fluorescence was measured with Flow Cytometry.



Supplementary Figure 2. Small Ruminant Lentivirus (SRLV) restriction in permissive cell lines TIGEF and GSM-T. (A) Retrotranscriptase (RT) activity measured by SG-PERT in clarified supernatants from cells infected with SRLV (control) or additionally infected with SeV. Values are the mean (\pm SEM). (B) SRLV viral DNA was measured 16h post-infection in GSM-T and TIGEF cells infected with SRLV (grey bars) or doubly infected with SRLV and SeV (light grey bars). Values are the mean (\pm SEM) of at least three independent experiments performed in triplicate (left panel).

PROYECTOS FUTUROS

PROYECTOS FUTUROS

En esta tesis, se han estudiado factores tanto del virus como del hospedador implicados en la infección de ovinos y caprinos por los Lentivirus de Pequeños Rumiantes (SRLV). En ella, se ha profundizado en el estudio de la restricción de SRLV por parte de moléculas de la inmunidad innata, en los mecanismos virales para evadir la acción de dichas moléculas y, por último, en la capacidad de estimular la respuesta inmune innata antiviral mediante la infección con vectores virales basados en el paramyxovirus Sendai (SeV).

Factores de restricción de la inmunidad innata. APOBEC3

A pesar de que los virus utilizan la maquinaria celular para completar su ciclo replicativo, existen factores de restricción del hospedador capaces de inhibirlo directamente. La inducción de respuestas proinflamatorias en monocitos, macrófagos y células dendríticas como consecuencia de la infección viral resulta esencial en el desarrollo de respuestas protectoras. En determinadas situaciones fisiológicas en las que la respuesta de interferón se encuentra activada, la replicación viral se inhibe tanto en el caso de los SRLV como en el del HIV-1 (Cassetta et al., 2011; Crespo et al., 2013). Sin embargo, la multitud de efectos indeseables que la administración de IFN puede provocar a largo plazo, como la hipersensibilidad y el desarrollo de procesos autoinflamatorios, desaconseja su uso como medida terapéutica. Por tanto, se hace necesaria la identificación de las proteínas efectoras inducibles por interferón capaces de bloquear directamente la replicación viral para, de este modo, atenuar dichos efectos secundarios, a la vez que se mantienen los niveles de restricción.

En el primer capítulo, se ha caracterizado el papel de la proteína APOBEC3Z1 en la restricción de los SRLV.

APOBEC3, TRIM5 α , Teterina y SAMHD1 son ejemplos de proteínas de la inmunidad innata inducibles por interferón que actúan bloqueando el ciclo viral en diferentes puntos, siendo los principales protagonistas de la restricción frente a retrovirus. En el caso de APOBEC3, hemos observado que la diferenciación de monocitos ovinos a macrófagos conlleva una disminución de la expresión de A3Z1, pero no de las moléculas A3Z2, A3Z3 y A3Z2Z3, al mismo tiempo que aumenta la replicación de los SRLV. Asimismo, los macrófagos estimulados con IFN γ son resistentes a la infección y presentan una expresión de A3Z1 elevada, mientras que en los estimulados con IL-4, permisivos a la infección, permanece baja. El resto de proteínas APOBEC3 no

varía su expresión en estos procesos de diferenciación celular, identificando A3Z1 como proteína clave en la restricción de los SRLV en monocitos y macrófagos.

El mecanismo más probable por el que A3Z1 ejerce la restricción es a través de su actividad desaminasa que ha quedado demostrada mediante el estudio de hipermutaciones no sinónimas en la región *LTR-gag*, dentro del contexto GA-AA (Capítulo I).

Recientemente, se ha puesto de manifiesto el posible papel *in vivo* de A3Z1 en la restricción de la infección. Células aisladas de animales con una baja carga viral mostraron una expresión reducida de las proteínas APOBEC3, a excepción de A3Z1 cuya expresión resultó ser mucho mayor que en animales del mismo rebaño con alta carga viral (Crespo et al., 2016). Sin embargo, no se detectó un mayor porcentaje de hipermutaciones en la región *gag* entre los virus aislados de ambas poblaciones animales. La desaminación de citosinas no se da por igual a lo largo del genoma viral siendo las regiones que completan el ciclo de retrotranscripción de manera más tardía, más susceptibles al ataque por APOBEC3Z1. Así, existen dos gradientes de hipermutaciones desde el extremo 3' (3'PPT) hasta el primer tracto de polipurinas central (cPPT) situado en el gen *pol* (Suspe et al., 2006). La secuenciación de la región *pol* de estos virus podría aportar evidencias del papel restrictivo que juega específicamente A3Z1 en la inmunidad innata frente a los SRLV. Mutaciones en el gen de la proteína A3Z1 pueden tener un papel *in vivo* ya que se han detectado polimorfismos asociados al desarrollo de la enfermedad en ovinos (Esparza-Baquer et al., 2015).

En este sentido, aún con todas las precauciones que tienen que ser consideradas, podríamos pensar en desarrollar un tratamiento *in vivo* mediante la inoculación de vectores que codifiquen A3Z1 restrictivos. No obstante, la expresión de A3Z1 debería estar controlada por promotores inducibles por moléculas relacionadas con el proceso infeccioso, ya que su sobreexpresión puede resultar en la inducción de mutaciones en el genoma celular a través de un proceso conocido como *kataegis* (Nik-Zainal et al., 2012). Estos estudios podrían abrir una nueva forma de controlar la infección por SRLV en ovinos y caprinos a través de la selección genética de animales que codifiquen A3Z1 restrictivos.

En la misma línea, varios autores, mediante estudios GWAS (Genome Wide Association Studies) han propuesto la proteína transmembrana TMEM154, sin función conocida, como marcador genético de la resistencia frente a SRLV (Heaton et al., 2012). Las diferencias alélicas en el locus de esta proteína se han asociado con una mayor

susceptibilidad a la infección por SRLV (Heaton et al., 2013). La sustitución de un aminoácido dentro de dicha proteína se puede asociar con la seropositividad y con una menor carga viral, al menos en rebaños de la raza Texel (Molaei et al., 2018) (Alshanbari et al., 2014). Sin embargo, su efectividad no está demostrada en razas europeas o en poblaciones afectadas por genotipos diferentes a los considerados en estos estudios.

Dependencia celular de la restricción

Muchos estudios analizan la actividad antiviral de las proteínas APOBEC3 empleando células de origen no mieloide, lo que puede llevar a conclusiones erróneas. Por ejemplo, A3A tiene una actividad antiviral despreciable en base a las observaciones realizadas en células 293-T (células embrionarias de riñón humano) y sin embargo presenta una fuerte actividad restrictiva frente a retrovirus y lentivirus en macrófagos (Peng et al., 2007; Stavrou et al., 2014). Del mismo modo, A3Z1 es capaz de restringir la infección por SRLV de manera muy significativa en células mieloides y con una intensidad mucho menor en fibroblastos (**Figuras 1 y 6; Capítulo I**).

Uno de los principales problemas a los que nos enfrentamos en el estudio de A3Z1 es la toxicidad que muestra cuando se expresa de manera exógena en células en cultivo (Carpenter et al., 2012; Land et al., 2013). Su localización nuclear en condiciones de sobreexpresión podría facilitar la aparición de mutaciones deletéreas en el genoma de la célula transfectada. La expresión controlada en situaciones fisiológicas determinadas podría explicar su inocuidad *in vivo*. El hecho de que sea la proteína APOBEC3 que más se expresa en monocitos y en macrófagos M1 sugiere que A3Z1 es clave en el control inmunológico de la infección por SRLV. La inducción específica de su expresión podría aclarar este punto ya que los inductores que hemos empleado hasta el momento son inductores generales y podrían estar estimulando otras proteínas antivirales, junto con A3Z1, aún no identificadas.

Isoformas derivadas de *splicing* alternativo

Existen isoformas derivadas de *splicing* alternativo en los transcritos de A3Z1 de ovinos, caprinos, rumiantes silvestres, monos y humanos, carentes del dominio citidín desaminasa, indicando que la regulación de la restricción lentiviral mediante formas truncadas podría estar conservada a través de las especies. Hemos cuantificado la expresión de esta forma truncada A3Z1Tr en macrófagos estimulados con IFN γ ,

detectando una elevada expresión y no así en los estimulados con IL-4. Además, hemos encontrado que esta isoforma truncada también se expresa en el contexto de la infección, sugiriendo que podría estar relacionada con la activación de la respuesta antiviral o la inducida por la infección.

Los ensayos de co-transfección indican que ambas proteínas se expresan en combinación, sin alterar la expresión de la otra cuando aumentamos en cantidades crecientes de la isoforma truncada o viceversa. Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación se ha observado que ambas proteínas interactúan. Además, A3Z1Tr es también capaz de interactuar con el resto de proteínas APOBEC3 ovinas, excepto con A3Z2. Sin embargo, desconocemos el significado de dichas interacciones. Existen estudios en A3 humanos que demuestran su capacidad para formar heterodímeros y poder superar la barrera que supone Vif de HIV, ya que ésta parece haber evolucionado para inactivar al menos tres dianas celulares distintas, homodímeros de A3G, homodímeros de A3H y heterodímeros A3G:A3H (Dang et al., 2006; Wiegand et al., 2004). El mecanismo podría compararse con la dominancia negativa ejercida sobre TRIM5 α por algunas isoformas derivadas de *splicing* carentes del dominio PRY/SPRY, que se ha observado en células humanas (Berthoux et al., 2005; Brennan et al., 2007; Stremlau et al., 2005).

Nuestros resultados sugieren que el freno a la restricción que supone A3Z1Tr, tanto frente a SRLV como frente a vectores de HIV-1, resulta ser significativo principalmente en células mieloides. Sin embargo, estos tipos celulares son difíciles de obtener y de modificar genéticamente debido a dificultades técnicas. Los macrófagos primarios son células difíciles de transfectar con los métodos convencionales (~5%) y no existen protocolos de electroporación para macrófagos ovinos, que además requiere de equipos especializados. La expresión de ambas isoformas en células mieloides podría permitir la evaluación apropiada de la regulación potencial que ejercen las isoformas derivadas de *splicing* de A3Z1 sobre su actividad antiviral.

La transducción con vectores retrovirales ha demostrado una buena eficiencia a la hora de modificar macrófagos. Sin embargo, el nivel de expresión del transgen depende de múltiples factores, incluyendo el sitio de integración en el genoma celular, el nivel y tipo de activación celular, así como la disponibilidad de metabolitos. Como hemos determinado en el tercer capítulo, una alternativa prometedora podría ser el empleo de virus Sendai recombinante que exprese A3Z1. Esta alternativa, que además cuenta con la ventaja de no insertar material exógeno en el genoma de las células

modificadas, podría alterar la respuesta intrínseca celular y activar la respuesta antiviral.

En cuanto al mecanismo de acción, tanto A3Z1 como A3Z1Tr presentan capacidad para encapsidarse dentro de los viriones y poder así ejercer su actividad en el siguiente ciclo de infección (actividad *passenger*). A3Z1 encapsidado se libera en el ciclo de infección subsiguiente y se encuentra disponible para atacar y modificar el RNA viral en el proceso de desencapsidación, provocando una acumulación de mutaciones G to A en el genoma viral (**Figura 9**). Dichas mutaciones pueden dar lugar a provirus abortivos o, por el contrario, podrían contribuir a aumentar la heterogeneidad genética y antigénica de los lentivirus, ayudándoles a escapar de la respuesta inmune o de drogas. Por el momento, hemos determinado que A3Z1 de ovinos es capaz de encapsidarse no solo en virus SRLV tipo VMV o tipo CAEV, sino también en virus heterólogos como el HIV-1. Aunque A3Z1Tr no modifica los niveles de la proteína nativa en experimentos de co-transfección, su capacidad para encapsidarse sugiere que podría limitar la cantidad de A3Z1 que un virión puede albergar, limitando a su vez la actividad desaminasa. Una evaluación de la tasa de mutación en la GFP que codifican los vectores virales basados en HIV-1 que hemos empleado, podría ayudar a aclarar este aspecto. Otras isoformas derivadas de splicing de A3F o de A3H tienen diferentes funciones en cuanto a la actividad antiviral. Las proteínas originadas por *splicing* de A3F, expresadas en macrófagos, generan proteínas antivirales truncadas que difieren en su sensibilidad a Vif y se incorporan en partículas virales con menor eficacia que la proteína completa, mostrando una actividad antiviral disminuida (Lassen et al., 2010). En cuanto a variantes de A3H, engloban un grupo de SNPs (G105R, K121D y E178D, hapII-RDD), resistentes a Vif y que restringen HIV-1 de manera más eficiente que A3H (Harari et al., 2009).

Experimentos con RNAs de interferencia o mediante el sistema CRISPR/Cas9 para silenciar específicamente A3Z1 podrían ayudarnos a comprender el verdadero papel que juegan las proteínas APOBEC3. La construcción de líneas celulares ovinas en las que se ha silenciado el gen *RIG-I* empleando el sistema CRISPR/Cas9 muestra que es posible la generación de líneas celulares ovinas con genes silenciados (Malpotra et al., 2018).

Mejora en la producción y efectividad de vectores virales

El DNA exógeno es reconocido y eliminado por la inducción de APOBEC3A mediante mecanismos dependientes de la actividad desaminasa (Stenglein et al., 2010). Hemos comprobado que las células transfectadas con un plásmido vacío muestran una sobreexpresión de las distintas moléculas A3, siendo la expresión de A3Z1 alrededor de 100 veces mayor respecto a fibroblastos sin transfectar, lo que explica la ausencia de diferencias significativas en la restricción (no mostrado). Así, según se ha demostrado *in vitro* (Stenglein et al., 2010) e *in vivo* (Kostrzak et al., 2015), la detección de DNA plasmídico induce una respuesta catabólica a través de A3Z1, que conlleva a la eliminación del DNA entrante. Este mecanismo protector podría estar detrás de las bajas eficiencias alcanzadas por las estrategias que actualmente se emplean en la terapia génica o celular. La terapia génica basada en vectores virales está experimentando un gran avance, siendo su talón de Aquiles la baja eficiencia de producción y la escasa eficacia terapéutica. Nuestros resultados sugieren que células productoras de vectores virales que expresen isoformas truncadas de A3Z1 como A3Z1Tr, podrían disminuir la actividad desaminasa y por tanto incrementar los porcentajes de transfección y así mejorar la producción de vectores *in vitro*. Por otro lado, como muestran nuestros resultados de transducción, la susceptibilidad de las células a la transducción podría aumentar si se expresa A3Z1Tr y por tanto, mejorar la capacidad terapéutica de los vectores. La inhibición de la actividad de A3Z1 por parte de las isoformas derivadas de *splicing*, podría estar relacionada con la capacidad de las proteínas A3 para formar heterodímeros. Tanto la reversión de la restricción como el aumento en la producción de vectores virales para terapia génica mediante el silenciamiento de A3Z1 sería una prueba inequívoca de la relación causa efecto.

Degradación por Vif

De manera general, las proteínas APOBEC3 son degradadas por Vif a través del reclutamiento del complejo ubiquitín ligasa, la consiguiente ubiquitinación y su digestión en el proteasoma. El reclutamiento de dicho complejo requiere la presencia de cofactores, diferentes en los lentivirus de primates y los de otros animales (Jager et al., 2011; Kane et al., 2015). En el caso de los lentivirus que afectan a primates CBF- β es el cofactor necesario para la formación del complejo. Sin embargo, los lentivirus animales, según hemos confirmado en esta tesis, emplean la Ciclofilina A (CYPA).

La resistencia al factor viral Vif que presenta A3Z1 es un hecho diferencial entre las diferentes proteínas APOBEC3. Dicha resistencia se conserva a través de las especies, siendo A3A humano también resistente a la acción de Vif (Goila-Gaur et al., 2007). Hemos determinado que esta resistencia está condicionada por la cantidad de CYPA (cofactor de Vif en células ovinas) que encontramos en la célula. CYPA es una peptidil-prolil isomerasa ubicua, presente en el citoplasma, que se une a diferentes proteínas facilitando su plegamiento (Barik, 2006). La proteína CYPA presente en el citoplasma de la propia célula *target*, y no la que viene empaquetada en el virión (Hatzioannou et al., 2005), promueve la infección por HIV-1 en células humanas a través de la acumulación de cDNA viral (Braaten et al., 1996). En el contexto de la infección lentiviral, CYPA fue descubierta en la búsqueda de proteínas que se unen a la cápside de HIV-1 (Yoo et al., 1997). Además, protege al virus de la restricción que existe de manera natural, en células humanas, resultando en la estimulación de la infección; sin embargo se desconoce el mecanismo subyacente (Sayah and Luban, 2004; Towers et al., 2003) que podría estar relacionado con el papel proviral de CYPA que hemos descrito en el contexto de la degradación de A3.

Los experimentos de esta tesis demuestran que aumentando la cantidad de CYPA, o en células en las que el nivel basal sea alto (293-T), se consigue una digestión total de todas las proteínas A3, sugiriendo que la resistencia no es intrínseca a las proteínas APOBEC3 sino que depende de la disponibilidad de los cofactores. Esta digestión dependiente de CYPA es aún más importante en el caso de las proteínas A3 resistentes a Vif (A3Z1) y podría, mediante este mecanismo, favorecer la infección.

La degradación de las proteínas A3 por parte de Vif puede producirse por vías alternativas a la del proteasoma ya que, tanto las especies resistentes (A3Z1) como las sensibles (A3Z2Z3), sufren degradación cuando empleamos una proteína Vif mutada que es incapaz de reclutar el complejo ubiquitín ligasa, siempre y cuando CYPA esté presente. En el caso de A3Z1, el empleo de inhibidores del proteasoma (MG132) no restablece los niveles basales, lo que nos lleva a hipotetizar que existen otras vías de degradación, como la autofagia. Hemos determinado que la infección por SRLV es menor cuando se inhibe la autofagia, indicando que la infección podría inducirla de manera específica y así beneficiarse de las modificaciones metabólicas que implica este proceso. Empleando agentes bloqueantes de la autofagia se restablecen los niveles de A3Z1 parcialmente; el restablecimiento total tan solo se consigue empleando inhibidores de ambas vías, sugiriendo que son complementarias. Estos cambios metabólicos son objeto de estudio de una disciplina relativamente nueva en el estudio

del sistema inmune, el inmunometabolismo, que trata de descifrar el efecto que tienen las infecciones sobre el metabolismo celular y viceversa. Generalmente, los procesos catabólicos como la autofagia inducen, o son resultado de, procesos antiinflamatorios, mientras que el anabolismo, controlado por el regulador maestro mTOR, lo es de procesos proinflamatorios (antivirales). A pesar de todo, aún no sabemos si la infección por SRLV induce autofagia de manera específica y tampoco conocemos el mecanismo de inducción, o si, por el contrario, se beneficia del estado de autofagia artificial que hemos recreado en nuestras condiciones de laboratorio.

Cada vez es más evidente que la replicación de HIV-1 depende de componentes implicados en procesos de autofagia. Las proteínas de HIV-1 son capaces de modular la autofagia, para maximizar la producción de virus y evadir sus componentes proteolíticos. Pero, al mismo tiempo, el virus parece interrumpir la autofagia en las células no infectadas, lo que contribuye a la muerte de células CD4 + favoreciendo la patogénesis vírica. HIV1 inhibe diferentes puntos de la autofagia tardía, evitando la digestión de los viriones en autolisosomas. La autofagia se ha estudiado como un componente crucial para la inmunidad, ya que es necesaria para la señalización de componentes víricos vía TLR7 y constituye el procesamiento proteolítico para la presentación de péptidos de HIV-1 en MHC-II (Killian, 2012). Experimentos que nos permitan confirmar la expresión de inductores de esta vía, como puede ser LC3, nos permitirían determinar si la infección es capaz, por si sola, de estimular la autofagia.

Curiosamente, la transfección con plásmidos que codifican Vif induce la expresión tanto de A3Z1 como de A3Z1Tr y no del resto de proteínas APOBEC3 ovinas. No podemos descartar que la mayor producción de mRNA sea la responsable de la resistencia aparente que observamos en el contexto de A3Z1.

Restricción heteróloga

La presencia de selección positiva tanto en las proteínas virales (Vif) como en las del hospedador (APOBEC3) como consecuencia de procesos co-evolutivos originados por el contacto directo sugiere un “acomodamiento” de la infección viral a su hospedador más habitual, que le permite escapar de los mecanismos restrictivos de la inmunidad. Así, la capacidad antiviral de muchas de estas moléculas resulta mayor frente a virus que infectan otras especies (restricción heteróloga). Su estudio es especialmente interesante en el campo de los SRLV, capaces de transgredir la barrera específica de especie entre ovinos y caprinos. La exposición de estos virus a los mismos

factores procedentes de otras especies, y por lo tanto “acomodadas” a otros lentivirus, podría dar lugar a interacciones insólitas que tendrían éxito a la hora de restringir la replicación viral. De hecho, se han descrito múltiples casos de restricción heteróloga. Por ejemplo, TRIM5 α de ovino restringe HIV-2 y TRIM5 α de mono rhesus lo hace con HIV-1 (Jauregui et al., 2012; Stremlau et al., 2004). En cuanto a la capacidad de los distintos A3 ovinos para inhibir la replicación heteróloga de lentivirus, el más estudiado ha sido A3Z2Z3, ya que es capaz de restringir HIV-1, MLV y SRLV carentes de Vif. En esta tesis se muestra como la expresión de A3Z1 ovino en células productoras de vectores virales (293-T) basados en HIV-1, MLV y SIV reduce la capacidad infectiva de dichos vectores virales, confirmando la restricción heteróloga de las proteínas APOBEC3 ovinas. Además, como hemos comentado anteriormente, A3Z1Tr alivia parcialmente la restricción observada frente a dichos vectores no replicativos.

A pesar de la capacidad restrictiva heteróloga que hemos observado *in vitro*, la posibilidad de que la actividad antiviral pueda transferirse *in vivo* tiene algunas implicaciones que conviene considerar. La sobreexpresión de A3Z1 *in vitro* da lugar a cultivos celulares abortivos, cambios fenotípicos y morfológicos que arrojan dudas sobre la viabilidad celular. Estudios recientes han descrito la relación entre la sobreexpresión de A3A exógeno y su capacidad para mutar cientos de genes, asociados entre otros a cáncer de mama, neoplasias, esclerosis lateral amiotrófica, alzheimer e hipertensión pulmonar (Sharma et al., 2017). Desconocemos si dichos cambios se deben a la capacidad de A3Z1 de mutar el genoma celular (Stenglein et al., 2010) o si se estimulan vías catabólicas como la autofagia o la muerte celular.

Estimulación de la inmunidad innata

La respuesta inmune innata antiviral puede estimularse mediante la transfección con vectores virales como el paramyxovirus de Sendai (SeV). La transducción de células ovinas con este vector GFP es muy efectiva y estable, alcanzando el 100% incluso en macrófagos alveolares o de derivación sanguínea, que son células difíciles de modificar mediante transfección o transducción. Se ha caracterizado la inducción de diferentes marcadores moleculares de la respuesta antiviral. De hecho, las células infectadas con SeV-GFP son resistentes a la infección por SRLV tanto en macrófagos como en células tipo fibroblasto. La restricción se observa en células infectadas con estirpes de campo y también en las infectadas con estirpes adaptadas al laboratorio y pertenecientes a diferentes genotipos (A y B) de SRLV, sugiriendo que podría ser efectiva frente al gran

abanico genético y antigénico que presentan. La infección con SeV muestra una doble utilidad ya que puede inducir un estado antiviral en la célula, que le ayuda a resistir una infección posterior con SRLV, pero también es capaz de “curar” células previamente infectadas con SRLV, sugiriendo que formulaciones vacunales basadas en SeV podrían tener un papel profiláctico pero también terapéutico. Esta resistencia es transferible a células frescas o “naïfs” mediante la adición del sobrenadante inicial, supuestamente por la producción de proteínas antivirales inducidas por interferón. El SeV es conocido como un buen activador de la vía del interferón mediante el reconocimiento por parte de RIG-I y MDA5 que finalmente daría lugar a la expresión de proteínas antivirales (Baum and Garcia-Sastre, 2010). Los primeros indicios parecen apuntar a que el bloqueo de la infección podría estar en diferentes puntos del ciclo viral dependiendo del tipo celular que reciba el SeV ya que tanto A3Z1, en macrófagos, como Teterina, en fibroblastos, parecen estar implicadas.

Aunque los datos obtenidos *in vitro* parecen ser muy prometedores, la aplicación *in vivo* supone el cumplimiento de una serie de condicionantes. Desconocemos cuál puede ser la vía de administración más efectiva. Estudios previos sugieren que la aplicación intranasal puede ser la más adecuada (Larsen et al., 1982) ya que coincide con la vía natural de infección de este virus (Blacklaws, 2012) y puede dar lugar además a la generación de inmunidad en las mucosas. La inmunización con un vector viral conlleva la modificación del vector base en el que se introduce el gen terapéutico o inmunógeno. Los vectores basados en SeV siguen “la regla del seis” por la que el número de nucleótidos del transgen debe ser múltiplo de seis (Vulliemoz and Roux, 2001). Estudios previos sugieren que la región Gag es la más adecuada para inmunizar por el relativo grado de conservación entre las estirpes descritas y la presencia de proteínas inmunogénicas (p25) con epitopos B y T capaces de inducir respuestas humorales y celulares (Singh et al., 2006).

Un aspecto a tener en cuenta es la posibilidad de que el hospedador desarrolle inmunidad frente al virus vector y anule la expresión y exposición del transgen al sistema inmune. Además, este aspecto es especialmente importante en estrategias de inmunización que requieran más de una inoculación. No se ha descrito la infección por paramyxovirus parecidos al SeV en ovinos, tan solo el parainfluenza virus 3 infecta naturalmente ovejas (Hore, 1966), sin embargo no se espera reacción cruzada entre ambos.

La capacidad de SeV para inmunizar frente a lentivirus se está evaluando en la especie humana frente a HIV. De hecho, existen ya diferentes ensayos clínicos que

tratan de probar la efectividad de las vacunas basadas en SeV y virus vaccinia modificados para inducir respuestas protectoras a través de inmunizaciones intranasales con resultados esperanzadores (Hu et al., 2017; Moriya et al., 2011; Takao et al., 1997).

La inmunización con vectores de SeV puede resultar, además de efectiva, una estrategia perfectamente trasladable al campo, ya que la producción de este tipo de vectores no requiere pasos de purificación especiales y se realiza en huevos de gallina embrionados, por lo que el coste de producción es realmente bajo.

REFERENCIAS

- Alshanbari, F.A., Mousel, M.R., Reynolds, J.O., Herrmann-Hoesing, L.M., Highland, M.A., Lewis, G.S., White, S.N., 2014. Mutations in *Ovis aries* TMEM154 are associated with lower small ruminant lentivirus proviral concentration in one sheep flock. *Anim Genet* 45, 565-571.
- Barik, S., 2006. Immunophilins: for the love of proteins. *Cell Mol Life Sci* 63, 2889-2900.
- Baum, A., Garcia-Sastre, A., 2010. Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates. *Amino Acids* 38, 1283-1299.
- Berthou, L., Sebastian, S., Sayah, D.M., Luban, J., 2005. Disruption of human TRIM5alpha antiviral activity by nonhuman primate orthologues. *J Virol* 79, 7883-7888.
- Blacklaws, B.A., 2012. Small ruminant lentiviruses: immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 35, 259-269.
- Braaten, D., Franke, E.K., Luban, J., 1996. Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *J Virol* 70, 3551-3560.
- Brennan, G., Kozyrev, Y., Kodama, T., Hu, S.L., 2007. Novel TRIM5 isoforms expressed by *Macaca nemestrina*. *J Virol* 81, 12210-12217.
- Carpenter, M.A., Li, M., Rathore, A., Lackey, L., Law, E.K., Land, A.M., Leonard, B., Shandilya, S.M., Bohn, M.F., Schiffer, C.A., Brown, W.L., Harris, R.S., 2012. Methylcytosine and normal cytosine deamination by the foreign DNA restriction enzyme APOBEC3A. *J Biol Chem* 287, 34801-34808.
- Cassetta, L., Cassol, E., Poli, G., 2011. Macrophage polarization in health and disease. *ScientificWorldJournal* 11, 2391-2402.
- Crespo, H., Bertolotti, L., Juganaru, M., Glaria, I., de Andres, D., Amorena, B., Rosati, S., Reina, R., 2013. Small ruminant macrophage polarization may play a pivotal role on lentiviral infection. *Vet Res* 44, 83.
- Crespo, H., Bertolotti, L., Proffiti, M., Cascio, P., Cerruti, F., Acutis, P.L., de Andres, D., Reina, R., Rosati, S., 2016. Low proviral small ruminant lentivirus load as biomarker of natural restriction in goats. *Vet Microbiol* 192, 152-162.
- Dang, Y., Wang, X., Esselman, W.J., Zheng, Y.H., 2006. Identification of APOBEC3DE as another antiretroviral factor from the human APOBEC family. *J Virol* 80, 10522-10533.
- Esparza-Baquer, A., Larruskain, A., Mateo-Abad, M., Minguijon, E., Juste, R.A., Benavides, J., Perez, V., Jugo, B.M., 2015. SNPs in APOBEC3 cytosine deaminases and their association with Visna/Maedi disease progression. *Vet Immunol Immunopathol* 163, 125-133.
- Goila-Gaur, R., Khan, M.A., Miyagi, E., Kao, S., Strebel, K., 2007. Targeting APOBEC3A to the viral nucleoprotein complex confers antiviral activity. *Retrovirology* 4, 61.
- Harari, A., Ooms, M., Mulder, L.C., Simon, V., 2009. Polymorphisms and splice variants influence the antiretroviral activity of human APOBEC3H. *J Virol* 83, 295-303.
- Hatzioannou, T., Perez-Caballero, D., Cowan, S., Bieniasz, P.D., 2005. Cyclophilin interactions with incoming human immunodeficiency virus type 1 capsids with opposing effects on infectivity in human cells. *J Virol* 79, 176-183.
- Heaton, M.P., Clawson, M.L., Chitko-Mckown, C.G., Leymaster, K.A., Smith, T.P., Harhay, G.P., White, S.N., Herrmann-Hoesing, L.M., Mousel, M.R., Lewis, G.S., Kalbfleisch, T.S., Keen, J.E., Laegreid, W.W., 2012. Reduced lentivirus susceptibility in sheep with TMEM154 mutations. *PLoS Genet* 8, e1002467.
- Heaton, M.P., Kalbfleisch, T.S., Petrik, D.T., Simpson, B., Kijas, J.W., Clawson, M.L., Chitko-McKown, C.G., Harhay, G.P., Leymaster, K.A., International Sheep Genomics, C., 2013. Genetic testing for TMEM154 mutations associated with lentivirus susceptibility in sheep. *PLoS One* 8, e55490.
- Hore, D.E., 1966. Isolation of ovine strains of parainfluenza virus serologically related to type 3. *Vet Rec* 79, 466-467.

- Hu, Z., Wong, K.W., Zhao, H.M., Wen, H.L., Ji, P., Ma, H., Wu, K., Lu, S.H., Li, F., Li, Z.M., Shu, T., Xu, J.Q., Lowrie, D.B., Fan, X.Y., 2017. Sendai Virus Mucosal Vaccination Establishes Lung-Resident Memory CD8 T Cell Immunity and Boosts BCG-Primed Protection against TB in Mice. *Mol Ther* 25, 1222-1233.
- Jager, S., Kim, D.Y., Hultquist, J.F., Shindo, K., LaRue, R.S., Kwon, E., Li, M., Anderson, B.D., Yen, L., Stanley, D., Mahon, C., Kane, J., Franks-Skiba, K., Cimermancic, P., Burlingame, A., Sali, A., Craik, C.S., Harris, R.S., Gross, J.D., Krogan, N.J., 2011. Vif hijacks CBF-beta to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature* 481, 371-375.
- Jauregui, P., Crespo, H., Glaria, I., Lujan, L., Contreras, A., Rosati, S., de Andres, D., Amorena, B., Towers, G.J., Reina, R., 2012. Ovine TRIM5alpha can restrict visna/maedi virus. *J Virol* 86, 9504-9509.
- Kane, J.R., Stanley, D.J., Hultquist, J.F., Johnson, J.R., Mietrach, N., Binning, J.M., Jonsson, S.R., Barelrier, S., Newton, B.W., Johnson, T.L., Franks-Skiba, K.E., Li, M., Brown, W.L., Gunnarsson, H.I., Adalbjornsdottir, A., Fraser, J.S., Harris, R.S., Andresdottir, V., Gross, J.D., Krogan, N.J., 2015. Lineage-Specific Viral Hijacking of Non-canonical E3 Ubiquitin Ligase Cofactors in the Evolution of Vif Anti-APOBEC3 Activity. *Cell Rep* 11, 1236-1250.
- Killian, M.S., 2012. Dual role of autophagy in HIV-1 replication and pathogenesis. *AIDS Res Ther* 9, 16.
- Kostrzak, A., Henry, M., Demoyen, P.L., Wain-Hobson, S., Vartanian, J.P., 2015. APOBEC3A catabolism of electroporated plasmid DNA in mouse muscle. *Gene Ther* 22, 96-103.
- Land, A.M., Law, E.K., Carpenter, M.A., Lackey, L., Brown, W.L., Harris, R.S., 2013. Endogenous APOBEC3A DNA cytosine deaminase is cytoplasmic and nongenotoxic. *J Biol Chem* 288, 17253-17260.
- Larsen, H.J., Hyllseth, B., Krogsrud, J., 1982. Experimental maedi virus infection in sheep: cellular and humoral immune response during three years following intranasal inoculation. *Am J Vet Res* 43, 384-389.
- Lassen, K.G., Wissing, S., Lobritz, M.A., Santiago, M., Greene, W.C., 2010. Identification of two APOBEC3F splice variants displaying HIV-1 antiviral activity and contrasting sensitivity to Vif. *J Biol Chem* 285, 29326-29335.
- Malpotra, S., Vats, A., Kumar, S., Gautam, D., De, S., 2018. Generation of Genomic Deletions (of Rig-I GENE) in Goat Primary Cell Culture Using CRISPR/CAS9 Method. *Anim Biotechnol* 29, 142-152.
- Molae, V., Eltanany, M., Luhken, G., 2018. First survey on association of TMEM154 and CCR5 variants with serological maedi-visna status of sheep in German flocks. *Vet Res* 49, 36.
- Moriya, C., Horiba, S., Kurihara, K., Kamada, T., Takahara, Y., Inoue, M., Iida, A., Hara, H., Shu, T., Hasegawa, M., Matano, T., 2011. Intranasal Sendai viral vector vaccination is more immunogenic than intramuscular under pre-existing anti-vector antibodies. *Vaccine* 29, 8557-8563.
- Nik-Zainal, S., Alexandrov, L.B., Wedge, D.C., Van Loo, P., Greenman, C.D., Raine, K., Jones, D., Hinton, J., Marshall, J., Stebbings, L.A., Menzies, A., Martin, S., Leung, K., Chen, L., Leroy, C., Ramakrishna, M., Rance, R., Lau, K.W., Mudie, L.J., Varela, I., McBride, D.J., Bignell, G.R., Cooke, S.L., Shlien, A., Gamble, J., Whitmore, I., Maddison, M., Tarpey, P.S., Davies, H.R., Papaemmanuil, E., Stephens, P.J., McLaren, S., Butler, A.P., Teague, J.W., Jonsson, G., Garber, J.E., Silver, D., Miron, P., Fatima, A., Boyault, S., Langerod, A., Tutt, A., Martens, J.W., Aparicio, S.A., Borg, A., Salomon, A.V., Thomas, G., Borresen-Dale, A.L., Richardson, A.L., Neuberger, M.S., Futreal, P.A., Campbell, P.J., Stratton, M.R., Breast Cancer Working Group of the International Cancer Genome, C., 2012. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell* 149, 979-993.
- Peng, G., Greenwell-Wild, T., Nares, S., Jin, W., Lei, K.J., Rangel, Z.G., Munson, P.J., Wahl, S.M., 2007. Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression. *Blood* 110, 393-400.

- Sayah, D.M., Luban, J., 2004. Selection for loss of Ref1 activity in human cells releases human immunodeficiency virus type 1 from cyclophilin A dependence during infection. *J Virol* 78, 12066-12070.
- Sharma, S., Patnaik, S.K., Kemer, Z., Baysal, B.E., 2017. Transient overexpression of exogenous APOBEC3A causes C-to-U RNA editing of thousands of genes. *RNA Biol* 14, 603-610.
- Singh, I., McConnell, I., Blacklaws, B., 2006. Immune response to individual maedi-visna virus gag antigens. *J Virol* 80, 912-919.
- Stavrou, S., Crawford, D., Blouch, K., Browne, E.P., Kohli, R.M., Ross, S.R., 2014. Different modes of retrovirus restriction by human APOBEC3A and APOBEC3G in vivo. *PLoS Pathog* 10, e1004145.
- Stenglein, M.D., Burns, M.B., Li, M., Lengyel, J., Harris, R.S., 2010. APOBEC3 proteins mediate the clearance of foreign DNA from human cells. *Nat Struct Mol Biol* 17, 222-229.
- Stremlau, M., Owens, C.M., Perron, M.J., Kiessling, M., Autissier, P., Sodroski, J., 2004. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427, 848-853.
- Stremlau, M., Perron, M., Welikala, S., Sodroski, J., 2005. Species-specific variation in the B30.2(SPRY) domain of TRIM5alpha determines the potency of human immunodeficiency virus restriction. *J Virol* 79, 3139-3145.
- Suspene, R., Rusniok, C., Vartanian, J.P., Wain-Hobson, S., 2006. Twin gradients in APOBEC3 edited HIV-1 DNA reflect the dynamics of lentiviral replication. *Nucleic Acids Res* 34, 4677-4684.
- Takao, S.I., Kiyotani, K., Sakaguchi, T., Fujii, Y., Seno, M., Yoshida, T., 1997. Protection of mice from respiratory Sendai virus infections by recombinant vaccinia viruses. *J Virol* 71, 832-838.
- Towers, G.J., Hatzioannou, T., Cowan, S., Goff, S.P., Luban, J., Bieniasz, P.D., 2003. Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors. *Nat Med* 9, 1138-1143.
- Vulliemoz, D., Roux, L., 2001. "Rule of six": how does the Sendai virus RNA polymerase keep count? *J Virol* 75, 4506-4518.
- Wiegand, H.L., Doehle, B.P., Bogerd, H.P., Cullen, B.R., 2004. A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *EMBO J* 23, 2451-2458.
- Yoo, S., Myszka, D.G., Yeh, C., McMurray, M., Hill, C.P., Sundquist, W.I., 1997. Molecular recognition in the HIV-1 capsid/cyclophilin A complex. *J Mol Biol* 269, 780-795.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1. Sobre la expresión relativa de las proteínas APOBEC3 en monocitos y macrófagos ovinos.** El paso de maduración de monocito a macrófago supone un descenso considerable en la expresión relativa de las proteínas APOBEC3. En concreto, la isoforma A3POBEC3Z1 (A3Z1) se expresa unas 50 veces más en monocitos que en macrófagos, siendo el nivel del resto de proteínas APOBEC3 invariable. La proteína A3Z1 se expresa unas diez más en macrófagos M1 (no productores de virus) que en M2 (productores de virus). Además, de A3Z1 existen isoformas truncadas derivadas de *splicing* que carecen del dominio citidín desaminasa (A3Z1Tr), que se expresan naturalmente en macrófagos ovinos estimulados con IFN- γ (M1) así como en macrófagos infectados con SRLV.

La expresión de A3Z1Tr no afecta la de A3Z1 a pesar de que se ha demostrado la interacción entre ambas proteínas.

- 2. Sobre el perfil de resistencia/susceptibilidad de células ovinas que expresan proteínas APOBEC3 frente a virus homólogos y heterólogos.** Tanto A3Z1 como A3Z1Tr son capaces de encapsidarse en el interior de partículas de SRLV y en las de HIV-1. La presencia de A3Z1 determina una menor infectividad de vectores virales basados en HIV-1, MLV y SIV y una menor producción de SRLV infectivos, que se recupera al añadir A3Z1Tr. El mecanismo de restricción está basado en la desaminación de citosinas en el contexto GA-AA.

Las proteínas A3Z1 muestran resistencia a la degradación por la proteína viral Vif, que sí es capaz de degradar el resto de proteínas APOBEC3 ovinas, aunque se ha demostrado la interacción entre Vif y A3Z1.

Las isoformas carentes de los dominios desaminasa no son exclusivas de la especie ovina y también se han detectado en el RNA procedente de caprinos, simios y humanos con un papel potencialmente similar al descrito en ovinos en el contexto de los SRLV.

- 3. Sobre el papel de la proteína viral Vif y sus cofactores en la degradación de las proteínas APOBEC3 ovinas.** Las proteínas APOBEC3 ovinas muestran una sensibilidad a la degradación por Vif con distintos niveles, siendo A3Z1 y

A3Z1Tr totalmente resistentes a la degradación y A3Z2, A3Z3 y A3Z2Z3 sensibles.

La isoforma A3Z1Tr puede formar heterodímeros no solo con A3Z1 sino también con el resto de proteínas APOBEC3, sin efecto sobre la degradación por Vif. Hemos confirmado que el reclutamiento del complejo ubiquitín-ligasa por parte de Vif, requiere de ciclofilina A (CYPA) y no de CBF- β como en humanos. La presencia de CYPA en la célula determina la capacidad de degradar las proteínas APOBEC3, sobretodo en el caso de A3Z1. La proteína Vif mutada, incapaz de reclutar el complejo de ubiquitinación necesario para la degradación mediante el proteasoma, degrada las proteínas APOBEC3, en presencia de CYPA. La proteína CYPA actúa como co-factor ya que no es capaz de inducir la degradación por si sola. La recuperación de los niveles basales de APOBEC3 tan solo se consigue empleando inhibidores del proteasoma en combinación con inhibidores de la autofagia. Así, la degradación de las proteínas APOBEC3 por parte de Vif viral puede darse por vías alternativas al proteasoma, como la autofagia.

4. **Sobre la activación de la respuesta inmune innata mediante el empleo de un vector no replicativo del virus de Sendai.** La infección con un vector de virus Sendai que codifica la proteína verde fluorescente (SeV-GFP) es muy eficiente en células ovinas, tanto de origen mieloide (dianas naturales del virus) como en fibroblastos (células permisivas de uso común en laboratorios de investigación). La expresión de GFP se ha confirmado a largo plazo en fibroblastos tras al menos 13 pases en cultivo. La infección de células mieloides ovinas (macrófagos residentes como los alveolares o en circulación como los derivados de monocitos sanguíneos) con este vector viral induce un estado proinflamatorio caracterizado por una alta expresión de A3Z1 o RIG-I y una baja expresión de MR o DC-SIGN. En fibroblastos, la activación es diferente con ligeros aumentos en la expresión de teterina y RIG-I.
5. **Efecto sobre la infección por SRLV en células ovinas permisivas.** Los macrófagos alveolares procedentes de animales naturalmente infectados con SRLV muestran una menor producción de virus cuando se infectan *in vitro* con SeV exhibiendo niveles de DNA y RNA viral menores, pero sin diferencias significativas, probablemente debido a un mal reconocimiento de las estirpes

circulantes en el rebaño, por parte de los primeros empleados. Macrófagos derivados de monocitos sanguíneos procedentes de animales no infectados, presentaron una menor cantidad de DNA viral, así como una menor producción de lentivirus tras la infección experimental con ambos virus. La restricción en fibroblastos se caracteriza por una menor producción viral sin afectar la carga viral, compatible con la activación observada tras la infección con SeV. Además, la infección con SeV reduce la infectividad de vectores virales basados en HIV-1, sugiriendo que la activación podría inhibir la infección por virus distintos antigénicamente, de vital importancia en la inducción de respuestas protectoras de amplio espectro.

La estimulación de las células mieloides ovinas tras la infección con SeV conlleva la secreción de factores antivirales, entre ellos IFN de tipo I, que ejercen su acción de manera autocrina y paracrina.