

Actividad antagonista de aislados del Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV) frente al sistema del interferón tipo I de lenguado senegalés

Juan Gémez-Mata¹, Daniel Álvarez-Torres¹, Esther García-Rosado¹, M. Carmen Alonso¹ y Julia Béjar²

¹Universidad de Málaga, Departamento de Microbiología

²Universidad de Málaga, Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología

Abstract

Senegalese sole (*Solea senegalensis*) is susceptible to marine Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) isolates, but it is not affected by freshwater VHSV isolates. In addition, the sole type I interferon (IFN I) response is lower after infection with a marine VHSV isolate than in response to a freshwater isolate. In order to disclose the reasons of such differential response, in this study the antagonistic activity of both kinds of VHSV isolates against IFN I system was characterised using an *in vitro* experimental system consisting of RTG-2 cells stably transfected with the luciferase gene under the control of the Senegalese sole *mx* promoter, which is one of the most induced interferon-stimulated genes. Our results showed that both isolates exert a dose-dependent negative effect on the response triggered by type I interferon, acting in the signal cascade pathway induced by IFN I, since the transcription of the gene coding for this cytokine is not affected. However, much higher levels of the non-pathogenic freshwater isolate were necessary to detect such antagonistic activity. Therefore, the inefficient antagonistic activity of the freshwater VHSV isolate might be involved in the lack of virulence of this isolate to Senegalese sole.

Resumen

El lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) es susceptible a aislados marinos del Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV), pero no a aislados de agua dulce, frente a los cuales, además, hay una respuesta del sistema del interferón tipo I (IFN I) más intensa. Para averiguar las razones de esta respuesta diferencial, el objetivo que del presente estudio era caracterizar y comparar la actividad antagonista de ambos aislados de VHSV frente al sistema del IFN I. Con este fin se utilizó un sistema experimental *in vitro* consistente en células RTG-2 transfectadas de forma estable con el gen de la luciferasa bajo el control del promotor del gen *mx*, que es uno de los genes inducidos por IFN I que más se estimulan en respuesta a infecciones víricas. Los resultados obtenidos muestran que ambos aislados de VHSV producen una interferencia negativa sobre la respuesta desencadenada por el IFN I. Dicha interferencia ocurre tras la síntesis de IFN I, y es dependiente de la dosis vírica. Sin embargo, para detectarla es necesario infectar las células con una dosis mucho más alta del aislado de agua dulce que del marino. Por lo tanto, la ineficiente actividad antagonista del aislado de agua dulce podría estar implicada en la no virulencia de este tipo de aislados en lenguado.

Justificación

El sistema del interferón tipo I (IFN I) es la primera línea de defensa frente a infecciones virales en vertebrados. Esta citoquina promueve la generación de un estado antiviral activando la transcripción de cientos de genes que tienen actividad antiviral y/o inmunomoduladora (Zou y Secombes, 2011). Entre estos genes estimulados por IFN I destaca el gen *mx*, por su alto nivel de estimulación y por su actividad antiviral directa. Por su parte, muchos virus poseen mecanismos que bloquean este sistema de defensa, facilitando así su rápida replicación en el hospedador. Los genes *mx* son diana de la actividad antagonista de varios virus frente al sistema del IFN I (Collet *et al.*, 2007), por lo que sirven de modelo para la caracterización de esta vía de interacción virus-hospedador.

El lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), una de las especies piscícolas más relevantes en la acuicultura española, es susceptible a aislados marinos del Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV), familia *Rhabdoviridae*, género *Novirhabdovirus*, pero no se ve afectado por aislados de agua dulce de este mismo virus, frente a los cuales, además, se ha descrito una respuesta del sistema del IFN I más intensa (Álvarez-Torres *et al.*, 2016). Para averiguar las razones de esta respuesta diferencial, el objetivo del presente estudio era la caracterización de la actividad antagonista de los dos aislados de VHSV frente al sistema del IFN I. Para ello se utilizó un sistema experimental *in vitro* consistente en células RTG-2 transfectadas de forma estable con el gen de la luciferasa bajo el control del promotor del gen *mx* de lenguado.

Material y Métodos

La línea RTG-2 se transfectó por lipofección con el plásmido que contenía el gen de la luciferasa bajo el control del promotor *mx* de lenguado (Álvarez-Torres *et al.*, 2013). Tras varias semanas de cultivo en presencia de puromicina, se obtuvo una población estable a la que se le denominó RTG-2 pSsMx-luc. Los dos aislados víricos se propagaron y titularon en la línea BF2.

Para detectar la actividad antagonista de los aislados víricos, las células RTG-2 pSsMx-luc se inocularon con distintas dosis de cada aislado (expresadas como multiplicidad de infección, MOI) y, a las 12 horas,

se añadió al medio de cultivo poli I:C (10µg/ml), un potente estimulador del sistema del IFN I. A las 24 h de este tratamiento se midió la actividad luciferasa de las células utilizando el kit Glo-Luciferase reporter assay (Promega). A su vez se extrajo ARN de las células para cuantificar la transcripción de IFN I mediante qPCR.

Resultados y Discusión

La potente estimulación del promotor que desencadena el poli I:C se ve reducida por la presencia de ambos aislados (Figura 1); es más, el virus bloquea la estimulación de la respuesta del IFN I de forma dosis-dependiente. Sin embargo, para poder detectar este bloqueo, fue necesario infectar las células con una dosis elevada del aislado de agua dulce (MOI 0.4 - 1), mientras que la interferencia se detectó con dosis víricas mucho menores (0.025 - 0.1) en el caso del aislado marino. Para determinar si la actividad antagonista detectada se realiza a nivel de síntesis de IFN I, se cuantificó la transcripción de dicho gen mediante qPCR, no encontrándose diferencias significativas entre los distintos tratamientos (resultados no mostrados), por lo que la interferencia ocurre en las etapas posteriores del proceso.

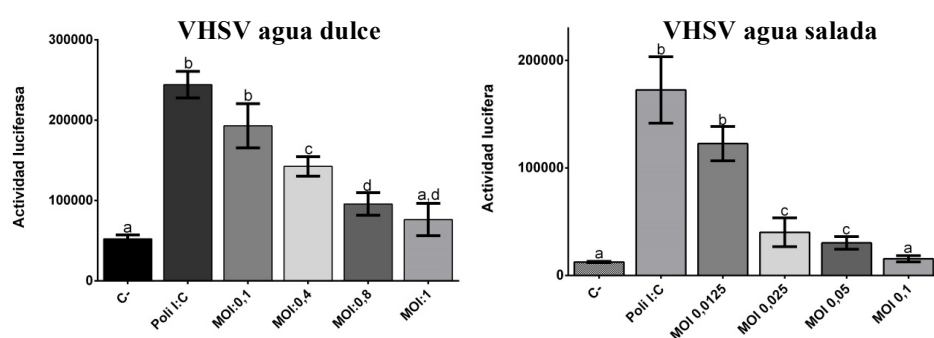


Figura 1. Actividad luciferasa en células RTG-2 pSsMx-luc tratadas solo con poli I:C, o con poli I:C 12 h después de ser infectadas con distintas dosis del aislado de VHSV de agua dulce (izquierda) o de agua salada (derecha). Las distintas letras sobre las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Estos resultados sugieren que la actividad antagonista del aislado de agua dulce es menos eficiente que la del aislado marino, ya que requiere mayor cantidad de virus para manifestarse. Es tentador por tanto pensar que la falta de virulencia del aislado de agua dulce podría estar relacionada con esta ineficiente actividad antagonista que se ha detectado.

Bibliografía

- Alvarez-Torres, D., J. Béjar, B. Collet, M.C. Alonso, E. Garcia-Rosado. 2013. Structural and functional characterization of the Senegalese sole Mx promoter. *Fish Shellfish Immunology* 35: 1642-1648.
- Álvarez-Torres D., A.M. Podadera, J. Béjar, I. Bandín, M. Carmen Alonso, E. García-Rosado. 2016. Role of the IFN I system against the VHSV infection in juvenile Senegalese sole. *Veterinary Research* 47: 3.
- Collet, B., E.S. Munro, S. Gahlawat, F. Acosta, J. Garcia, C. Roemelt. 2007. Infectious pancreatic necrosis virus suppresses type I interferon signalling in rainbow trout gonad cell line but not in Atlantic salmon macrophages. *Fish Shellfish Immunology* 22: 44-56.
- Zou, J., y C.J. Secombes. 2011. Teleost fish interferons and their role in immunity. *Developmental and Comparative Immunology* 35: 1376-1387.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. C. P. Dopazo (Universidad de Santiago de Compostela, Spain) el envío de los aislados de VHSV utilizados en este trabajo.