

Papel del inmunogen *isg15* de lubina (*Dicentrarchus labrax*) en las infecciones por betanodavirus

Patricia Moreno*, Esther García-Rosado, Juan José Borrego, M. Carmen Alonso.

Universidad de Málaga, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias. Campus Teatinos s/n 29010, Málaga. patriciamgarcia@uma.es

En peces, al igual que en vertebrados superiores, la respuesta antiviral innata está mediada por el sistema interferón tipo I (IFN I), que actúa mediante la activación de genes denominados *isg* (*interferon-stimulated genes*), entre los que se incluye el gen *isg15*. La proteína codificada por este gen, denominada ISG15, presenta actividad antiviral actuando como citoquina, o mediante un mecanismo denominado ISGilación, que consiste en su unión covalente a proteínas víricas o celulares.

Entre las enfermedades de etiología viral que afectan a la lubina (*Dicentrarchus labrax*), destaca la necrosis nerviosa viral, causada por el virus de la necrosis nerviosa (NNV, género *Betanodavirus*), que presenta dos segmentos de ARN monocatenario de polaridad positiva: ARN1 (polimerasa viral) y ARN2 (proteína de la cápside). Las diferencias en la secuencia de la región variable T4 del segmento ARN2 permiten su clasificación en 4 genotipos, siendo el genotipo RGNNV el único asociado a episodios de elevada mortalidad en lubina.

El presente estudio contribuye a ampliar el conocimiento del papel del sistema IFN I en lubina frente a infecciones por betanodavirus, describiéndose la estructura del gen *isg15*, analizando su transcripción en respuesta a poli I:C y RGNNV; y evaluando su actividad *in vitro*.

La lubina presenta un gen *isg15*, compuesto por dos exones y un intrón localizado en la región 5'-UTR. El ORF, de 474 pb, codifica una proteína de 157 aminoácidos constituida por dos dominios tipo ubiquitina y un motivo RLRGG en el extremo carboxilo terminal. La clonación del ORF en el plásmido pcDNA His/Max, y su posterior transfección en la línea celular E-11, ha permitido obtener una línea celular estable (DLISG15-E11), en la que se ha demostrado, mediante inmunofluorescencia indirecta, la localización citoplasmática de esta proteína.

El análisis de transcripción muestra una respuesta más temprana e intensa tras la inducción por poli I:C que por RGNNV. Poli I:C estimula la expresión génica desde las 4 hasta las 24 h post-inyección (p.i.) en ambos órganos, y con una cinética similar. Sin embargo, ambos órganos difieren en el nivel de transcripción del gen tras la infección por RGNNV, produciéndose una estimulación temprana, desde las 12 h p.i., y de mayor nivel en el cerebro que en el riñón cefálico, órgano en el que la expresión comienza a las 72 h p.i.

La actividad antiviral se ha evaluado mediante el análisis comparativo de la replicación de RGNNV, determinada mediante PCR cuantitativa, en células DLISG15-E11 y células control no transfectadas, no observándose diferencias significativas. Sin embargo, ISG15 podría actuar a otro nivel del ciclo de multiplicación viral, por lo que se están realizando ensayos de rendimiento vírico extracelular mediante titulación, y de ISGilación mediante Western-blot.

El hecho de que el cerebro sea el principal órgano diana para la multiplicación de betanodavirus, y el papel antiviral atribuido a la ISG15, junto con los resultados obtenidos, contribuyen a dilucidar la importancia de este gen frente a las infecciones por RGNNV en lubina, incrementándose el conocimiento del papel del sistema del IFN I en la defensa frente a las infecciones víricas y la relación patógeno-hospedador.