

Inducción de las proteínas Mx por interferón tipo I en células de dorada y de trucha

J. Béjar, E. Núñez, M. A. Fernández-Trujillo y M. C. Alvarez

Universidad de Málaga, Área de Genética, Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, 29071 Málaga, E-mail: bejar@uma.es

Abstract

Characterizing the innate immune system defence mechanisms is essential to develop preventive measures against viral infections in aquaculture. In this study, the intra-specific differential response of Mx proteins to type I interferon (IFN I) and the inter-specific conservation of the IFN I response in gilthead seabream and rainbow trout, have been addressed in *in vitro* experimental systems. The results showed that Mx induction is variable among the three isoforms of each species, both of them presenting a predominant isoform. In addition, there is no response to the IFN I of the other species, thus suggesting that in spite of the well-known conservation of the IFN I response in vertebrates, specificity is also one of the main features of the IFN I response of both species.

Resumen

La caracterización de los mecanismos de defensa del sistema inmune innato es clave para el desarrollo de medidas preventivas frente a la creciente incidencia de infecciones víricas en acuicultura. En este trabajo se ha estudiado *in vitro* un aspecto de la respuesta innata antiviral: la respuesta diferencial de las proteínas Mx de una especie a interferón (IFN) tipo I, y la conservación interespecífica de la respuesta a IFN tipo I, en dorada y en trucha. Hemos comprobado que existen diferencias en la respuesta de las Mx de ambas especies a IFN I, existiendo en ambos casos una isoforma predominante. Por otro lado, no hay respuesta al IFN I de la otra especie, por lo que a pesar de ser un mecanismo conservado en los vertebrados, la especificidad es una característica de la respuesta del IFN I de ambas especies.

Justificación

La caracterización de los mecanismos de defensa del sistema inmune innato es clave para el desarrollo de medidas preventivas frente a la creciente incidencia de infecciones víricas en acuicultura. Las proteínas Mx, dada su actividad antiviral directa, son elementos clave en el estado antiviral desencadenado por el interferón tipo I en respuesta a las infecciones virales (Haller y Kochs, 2011). En este trabajo se ha estudiado *in vitro* un aspecto muy interesante de la respuesta del IFN tipo I: las diferencias en la respuesta a interferón (IFN) tipo I de las distintas proteínas Mx de una misma especie en dorada y en trucha, y la conservación de la respuesta a IFN tipo I entre estas dos especies.

Material y métodos

Células CHSE-214 se transfectaron con vectores de expresión del IFN I de dorada y de salmón. Después de unas semanas de selección con antibióticos, las células se cultivaron en medio nuevo y se recogió el sobrenadante, que se utilizó para estimular células SAF-1, que son de dorada, y células RTG-2, que son de trucha arcoiris. Como control negativo se utilizó medio de células CHSE transfectadas con un vector vacío, y como control positivo las células SAF-1 y RTG-2 se estimularon con poli I:C, un potente inductor de la respuesta del IFN I. Las células SAF-1 y RTG-2 se recogieron a las 6, 12 y 24 h del tratamiento; y se cuantificó mediante RT-PCR cuantitativo la transcripción de los tres genes Mx en cada uno de los sistemas.

Resultados y discusión

Las tres Mx de dorada se estimularon con el IFN de dorada mostrando una cinética similar: una inducción no significativa a las 6 horas del tratamiento, seguida de un descenso en los niveles de transcripción de los tres genes a las 12 h y alcanzando el nivel máximo de expresión a las 24 h del tratamiento. La expresión fue mayor en el caso de la Mx2. En cambio, cuando las células SAF se trataron con IFN de salmón no se detectó estimulación de ninguno de los tres genes. El tratamiento con poli I:C sólo estimuló la transcripción de la Mx2, que fue significativa a las 24 h del tratamiento.

En el caso de las proteínas Mx de trucha, al estimularlas con IFN de salmón la respuesta sólo fue significativa en el caso de la Mx2 y de la Mx3 a las 24 h del tratamiento. En cambio, el IFN de dorada no estimuló la respuesta de ninguna de las tres Mx de trucha. El tratamiento con poli I:C estimuló la

transcripción sólo de la Mx2, que fue significativo a las 12, pero no a las 24 h del tratamiento, debido a la variabilidad de las muestras.

En ningún caso se observó estimulación de las Mx en las células a las que se añadió el sobrenadante de las células transfectadas con el plásmido control.

Estos resultados indican que en ambos casos existe una respuesta diferente de las tres proteínas Mx de ambas especies. En el caso de la dorada, el patrón de respuesta a IFN I de su misma especie es similar para las tres Mx, que sólo presentan ligeras diferencias en cuanto a la magnitud de la inducción, máxima en el caso de la Mx2. Es decir, el IFN sintetizado en las células CHSE y secretado al medio de cultivo es capaz de iniciar su cascada de señalización en las células SAF y estimular la transcripción de los tres genes Mx de dorada de forma muy parecida. En cambio, la respuesta a la estimulación con poli I:C es variable entre las tres Mx de dorada, siendo significativa sólo en el caso de la Mx2. Es posible que la concentración de IFN en el sobrenadante sea más elevada que la que se genera al tratar las células con poli I:C o puede que la respuesta de Mx1 y Mx3 sea más tardía, por lo que la proteína Mx2 de dorada parece ser más sensible o detectar antes la señal desencadenada por el poli I:C. Esto concuerda con otros estudios que apuntan a que la Mx2 parece ser la isoforma predominante en la respuesta temprana de esta especie a la infección viral (Fernández-Trujillo y cols., 2011).

En cuanto a las Mx de trucha, el patrón de respuesta al IFN de salmón es distinto en cada Mx: la respuesta no es significativa para la Mx1, y sí para Mx2 y Mx3, presentando Mx2 la respuesta mayor. Los resultados obtenidos con poli I:C son similares: respuesta significativa sólo en el caso de Mx2 y Mx3, siendo en este caso la respuesta de Mx2 más temprana (12 h) y de mayor magnitud (3x aproximadamente) que tras la estimulación con IFN de salmón. A pesar de que salmón atlántico y trucha arcoiris son dos especies muy relacionadas, es posible que las diferencias sutiles que existen entre los IFN de ambas especies sean responsables de esta diferencia (Collet, 2014). En cualquier caso, parece haber una isoforma predominante, la Mx2, al igual que ocurre en dorada, y una isoforma que, al menos en las condiciones de nuestro estudio, no responde a la señal de IFN tipo I.

Respecto a la respuesta al IFN de la otra especie, no se observó estimulación de ninguna de las Mx en ambas especies, es decir, a pesar ser el mismo tipo de IFN, su presencia no resultó en la estimulación de las proteínas Mx, por lo que la conservación a nivel funcional entre estas especies no es suficiente como para iniciar la cascada de señalización. Los receptores del IFN I lo forman las proteínas IFNAR1 e IFNAR2, y esta familia de proteínas es, al igual que ocurre con las Mx o los IFN, especialmente diversa en peces, por lo que podrían ser responsables de la ausencia de respuesta observada.

En definitiva, en este trabajo hemos comprobado que el sobrenadante de las células CHSE transfectadas con el IFN tipo I de dorada y de salmón es capaz de estimular la expresión de Mx en células de dorada y de trucha respectivamente; y hemos observado que existen diferencias en la respuesta de las Mx de ambas especies a IFN I, lo cual puede ser uno de los recursos que utilizan los sistemas inmunes de dorada y de trucha para enfrentarse a las infecciones virales.

Referencias

- Collet, B., 2014. Innate immune responses of salmonid fish to viral infections. *Dev. Comp. Immunol.* 43, 160-173.
- Fernández-Trujillo, M.A., Novel, P., Manchado, M., Sepulcre, M.P., Mulero, V., Borrego, J.J., Álvarez, M.C., Béjar, J., 2011. Three Mx genes with differential response to VNNV infection have been identified in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Mol. Immunol.* 48, 1216-23.
- Haller, O., Kochs, G., 2011. Human MxA Protein: An Interferon-Induced Dynammin-Like GTPase with Broad Antiviral Activity. *J. Interferon Cytokine Res.* 31, 79-87.