

Identificación de genes asociados con la resistencia a *Listonella anguillarum* en el modelo animal pez cebra *Danio rerio* (Hamilton, 1822) mediante el análisis de perfiles de expresión diferencial

I. Rojo¹, Y. Castelruiz¹, A. Estonba² y M. A. Pardo¹

¹ Unidad de Investigación Alimentaria, AZTI-Tecnalia. Txatxarramendi ugarte, s/n. E-48395 Sukarrieta (Bizkaia), España. Correo electrónico: mpardo@suk.azti.es

² Genetika laborategia. Zientzia eta Teknologia Fakultatea. EHU-UPV. Barrio Sarriena, s/n. E-48940 Leioa (Bizkaia), España.

Recibido en octubre de 2005. Aceptado en noviembre de 2005.

RESUMEN

Se empleó el modelo de infección pez cebra *Danio rerio* (Hamilton, 1822) – *Listonella anguillarum* para identificar genes asociados con la resistencia a la infección. Se analizaron los perfiles de expresión diferencial en peces cebra infectados con la bacteria *L. anguillarum* y peces de control mediante chips de DNA y PCR cuantitativa a tiempo real. El conocimiento adquirido en este estudio será de gran valor a la hora de diseñar nuevas estrategias de selección de individuos resistentes en la industria piscícola.

Palabras clave: Inmunidad innata, expresión diferencial, *microarray*, infección bacteriana, acuicultura.

ABSTRACT

Identification of genes associated with resistance to *Listonella anguillarum* in the zebrafish *Danio rerio* Hamilton, 1822 animal model

The zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822) – *Listonella anguillarum* infection model was used to identify genes associated with resistance to the infection. In the present study we analysed differential expression profiles in *L. anguillarum* infected zebrafish compared to control zebrafish, using DNA chip array (Affymetrix technology) and quantitative real-time PCR. The knowledge acquired in this study could be valuable in designing new strategies and tools for the selection of resistant individuals for the fish industry.

Keywords: Innate immunity, differential gene expression, *microarray*, bacterial infection, aquaculture.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas en peces son una fuente de importantes pérdidas económicas en el sector acuícola. Un método potencial para reducir el impacto de las enfermedades infec-

ciosas es aumentar la resistencia del hospedador a la infección. *Listonella anguillarum* es un patógeno primario de los peces y es el responsable de graves epidemias (vibriosis) en muchas especies marinas cultivadas y silvestres, incluyendo anguila *Anguilla anguilla* (L., 1758), rodaballo

Psetta maxima (L., 1758), lubina *Dicentrarchus labrax* (L., 1758), salmón *Salmo salar* L., 1758 y bacalao *Gadus morhua* L., 1758. Aunque su incidencia es mayoritariamente en especies marinas, también se han detectado casos de vibriosis en peces de agua dulce (Eguchi, Fujiwara y Miyamoto, 2000); de hecho, recientemente, se ha demostrado la infección por *L. anguillarum* en el modelo animal pez cebra *Danio rerio* (Hamilton, 1822) (O'Toole *et al.*, 2004).

Diversos trabajos recientes se han centrado en el estudio de niveles de expresión de genes implicados en el sistema inmune de peces. Sin embargo, todos ellos están limitados por el escaso conocimiento de sus genomas. A fin de superar esta limitación, en el estudio que presentamos se ha utilizado el modelo pez cebra debido a la gran cantidad de información disponible de su genoma (www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/). Es más: ya se ha utilizado el pez cebra como modelo de infección e inmunidad por *Streptococcus iniae* (Neely, Pfeifer y Caparon, 2002), *Edwardsiella tarda* (Pressley *et al.*, 2005), rhabdovirus (Sanders, Batts y Winton, 2003) y *Mycobacterium marinum* (Meijer *et al.*, 2005).

Este proyecto pretende realizar una aproximación mediante el uso de pez cebra – *L. anguillarum* como modelo para identificar genes de resistencia a infecciones con el fin de disponer de una base genética que permita diseñar nuevas estrategias y herramientas para seleccionar individuos resistentes a vibriosis en la industria piscícola.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio de genómica funcional en el modelo de infección pez cebra – *L. anguillarum* se emplearon 60 peces cebra adultos. Los ejemplares se dividieron en dos grupos iguales (n = 30): uno que fue infectado con *L. anguillarum* y otro para control que fue tratado de igual forma que el infectado, excepto porque no recibía la dosis infectiva. La infección se realizó por inmersión de los peces durante dos horas en un acuario de 2,5 l que contenía una dosis infectiva de 10⁹ ufc/ml de *L. anguillarum* (serotipo O2a, cepa LMG11684).

Transcurrido el periodo de infección, todos los peces se lavaron y se trasladaron a los acuarios de mantenimiento correspondientes (como grupo de control o infectado). En ese momento se estableció el tiempo 0, en el que se cogieron tres peces de control y tres peces infectados. Después, se volvió a coger tres peces infectados en los tiempos 1, 6, 48 y 96 h tras la infección.

Durante el tiempo que duró el experimento se controlaron las condiciones ambientales (pH, nitritos, amoníaco) a diario. La temperatura del agua se mantuvo a 26 ± 1 °C y se proporcionó a los peces la comida requerida para un buen desarrollo.

Tras cada toma de muestras, los peces fueron introducidos en N₂ líquido y se guardaron a –80 °C hasta el momento en que se procedió a la extracción de RNA total de tejido de cada individuo. Posteriormente, se realizó la transcripción reversa a cDNA para llevar a cabo los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real, utilizando un termociclador de PCR a tiempo real (Sequence Detection System, Abi Prism 7000, Applied Biosystems). Los productos de PCR se marcaron con el fluoróforo SYBRGreen I. Se realizó, además, un estudio de *microarray* de DNA empleando el chip GeneChip® Zebrafish Genome Array (tecnología Affymetrix); es un *array* de alta densidad de oligonucleótidos que estudia, simultánea y cuantitativamente, alrededor de 14 900 transcritos de mRNA. Partiendo de cDNA se obtuvo, por transcripción in vitro, cRNA, que se hibridó con el chip de Affymetrix, se lavó y se procedió a su escaneado, siguiendo las recomendaciones de los proveedores. Se realizó un procesamiento bioinformático de los datos obtenidos y, así, quedaron clasificados en grupos de genes expresados diferencialmente según su función.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antes de proceder al estudio de expresión génica diferencial del pez cebra, se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real utilizando unos genes marcadores de respuesta temprana ante la infección e implicados en la inmunidad innata: se estudiaron los genes de interleukina

IL 1 β), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y el gen que codifica para una proteína del sistema del complemento (C3) para asegurar que existe una respuesta a nivel genético de los peces cebra ante el estímulo bacteriano.

Se utilizó el gen de la β -actina como normalizador después de comprobar que es un gen de expresión constitutiva en la infección a estudiar. Los datos normalizados de los genes estudiados se compararon con los datos obtenidos en los peces cebra de control.

Los resultados obtenidos muestran un aumento en la expresión génica en el tiempo establecido como 0. Se observa una inducción del gen de la IL 1 β de hasta 10 veces superior al compararlo con la expresión que presentaban los peces cebra de control (figura 1). También los genes del TNF α y C3 se encontraban inducidos hasta 14 y 6 veces, respectivamente, al compararlos con los valores que se obtuvieron en los peces cebra de control (figura 1). Estos resultados

indican que existe una respuesta proinflamatoria de los peces cebra tras el contacto con *L. anguillarum*.

Tras demostrar la existencia de una respuesta inmune de los peces cebra, se procedió a hibridar el cRNA con las sondas del chip de Affymetrix. Tras el análisis de los resultados se obtuvo la expresión diferencial de más de 100 genes implicados en diversas funciones: genes involucrados en el metabolismo, en la respuesta inflamatoria, genes inducidos por estrés, genes relacionados con respuesta de fase aguda, reguladores clave de la diferenciación celular, en la homeostasis del hierro, genes con papeles en la estructura y dinámica del citoesqueleto, enzimas proteolíticos, metaloproteinasas de la matriz, genes específicos de músculo, y otros.

Posteriormente, se agruparon los genes obtenidos en función de su perfil de expresión respecto al tiempo. Algunos de ellos presentan una respuesta temprana, aumentando o reprimiendo su expresión rápidamente tras la infección (figura 2).

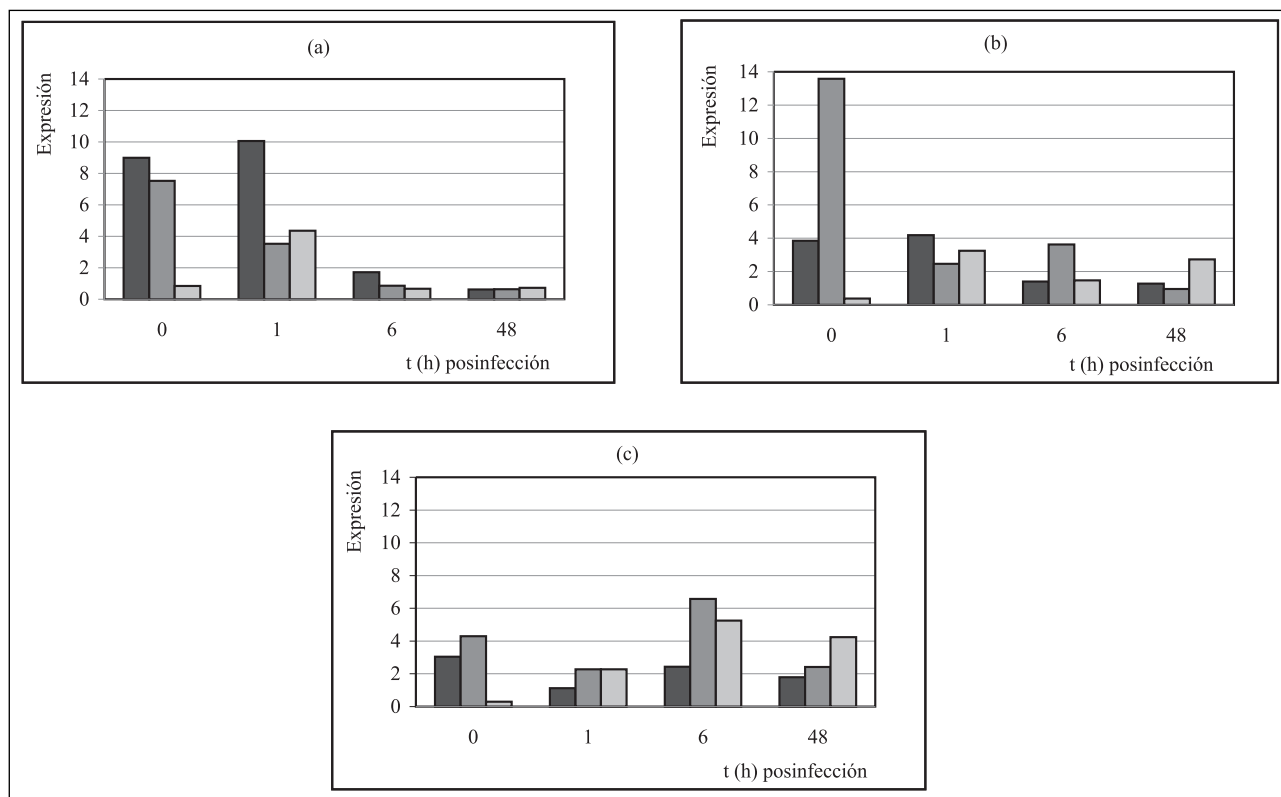


Figura 1. Valores de expresión diferencial de IL 1 β (a), TNF α (b) y C3 (c). En cada tiempo (t) se muestran tres individuos distintos. Las barras representan el nivel de expresión de cada gen normalizado con la β -actina y con los peces de control.

Otros genes, por el contrario, se agrupan en lo que sería una respuesta más tardía a la infección, ya que los valores máximos de expresión o represión génica ocurren a tiempos tardíos (figura 2). Finalmente, se halló un grupo de genes con una respuesta progresiva, es decir: la expresión o represión es progresiva con el tiempo (figura 2).

Actualmente se sigue realizando un estudio pormenorizado de los genes obtenidos con expresión diferencial, de los que se procederá a seleccionar aquéllos relacionados con una respuesta temprana o inmunidad innata, ya que se trata de una respuesta inespecífica, por lo que el estudio de los genes involucrados en respuestas tempranas frente a la presencia de *L. anguillarum* podría generalizarse a otros patógenos y a estrés.

Los estudios futuros estarán orientados a verificar los datos obtenidos del análisis de los *microarrays*, mediante ensayos de RT-PCR cuantitativa a tiempo real con los genes seleccionados, para, posteriormente, realizar ensayos de asociación ligados con la resistencia a la enfermedad mediante el estudio de polimorfismos de un solo nucleótido, o SNPs, que podrán ser extrapolados por homología a especies de interés en acuicultura.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por el Departamento de Industria, Comercio y Turismo del Gobierno Vasco.

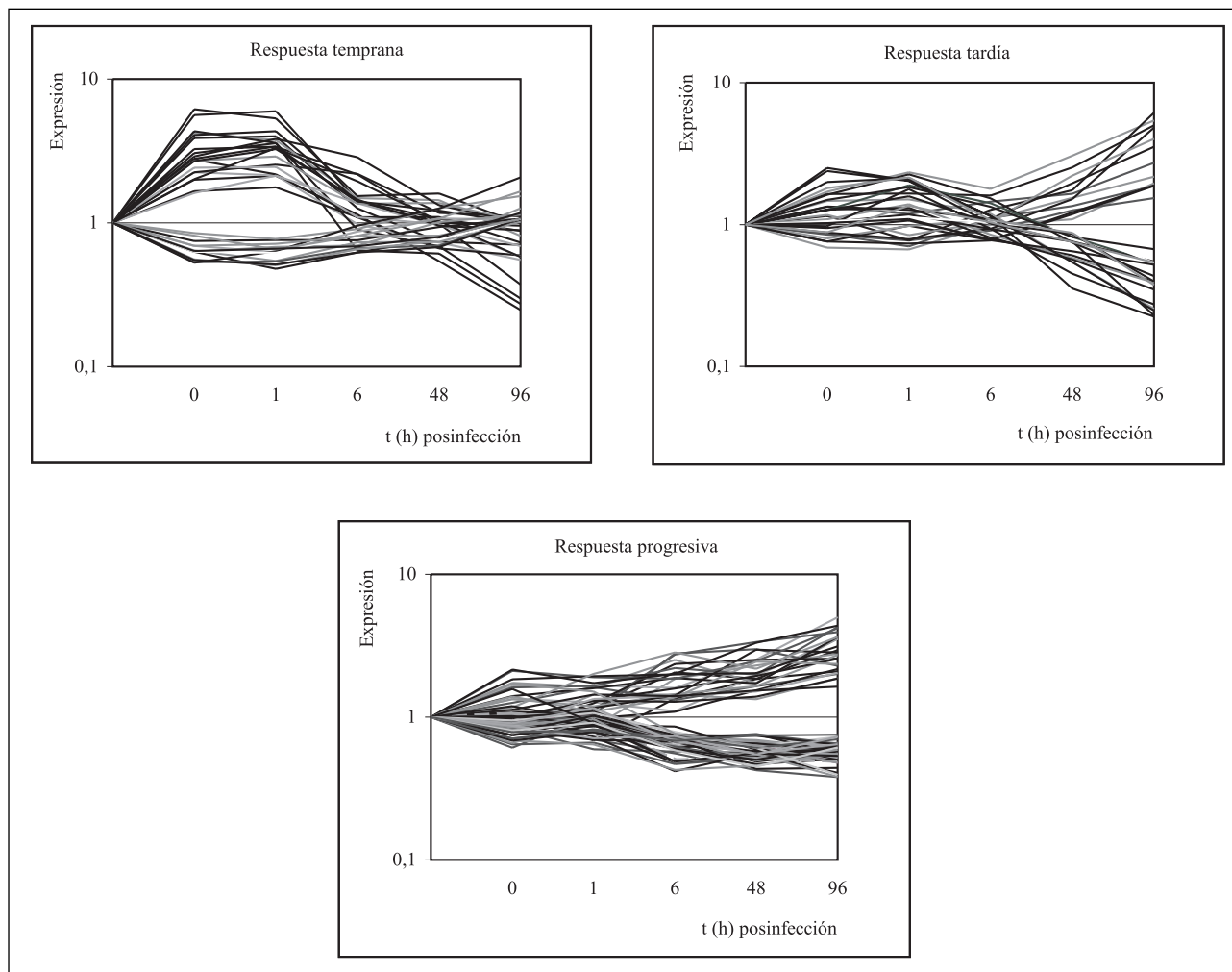


Figura 2. Perfiles de expresión diferencial, en el transcurso del tiempo (t), de los resultados obtenidos en los ensayos con *microarrays*.

BIBLIOGRAFÍA

- Eguchi, M., E. Fujiwara y N. Miyamoto. 2000. Survival of *Vibrio anguillarum* in freshwater environments: adaptation or debilitation? *Journal of Infection and Chemotherapy* 6 (2): 126-129.
- Meijer, A. H., F. J. Verbeek, E. Salas-Vidal, M. Corredor-Adamez, J. Bussman, A. M. van der Sar, G. W. Otto, R. Geisler y H. P. Spaink. 2005. Transcriptome profiling of adult zebrafish at the late stage of chronic tuberculosis due to *Mycobacterium marinum* infection. *Molecular Immunology* 42 (10): 1185-1203.
- Neely, M. N., J. D. Pfeifer y M. Caparon. 2002. Streptococcus-zebrafish model of bacterial pathogenesis. *Infection and Immunity* 70 (7): 3904-3914.
- O'Toole, R., J. von Hofsten, R. Rosqvist, P. E. Olsson y H. Wolf-Watz. 2004. Visualisation of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*. *Microbial Pathogenesis* 37 (1): 41-46.
- Pressley, M. E., P. E. III. Phelan, P. E. Witten, M. T. Mellon y C. H. Kim. 2005. Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish. *Developmental & Comparative Immunology* 29 (6): 501-513.
- Sanders, G. E., W. N. Batts, y J. R. Winton. 2003. Susceptibility of zebrafish (*Danio rerio*) to a model pathogen, spring viremia of carp virus. *Comparative Medicine* 53 (5): 514-521.