

RESUMEN DE TESIS DOCTORAL

Descubrimiento y caracterización de la actividad antiviral inducida por las moléculas tipo CRP de pez cebra (*Danio rerio*)

Melissa Belló Pérez

Directores:

Dr. Luis Pérez García-Estañ

Dr. Juan Alberto Falcó Graciá

Defendida el 23 de julio de 2019 en la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH)

Realizada en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE – UMH)

Mención *cum laude*

Resumen

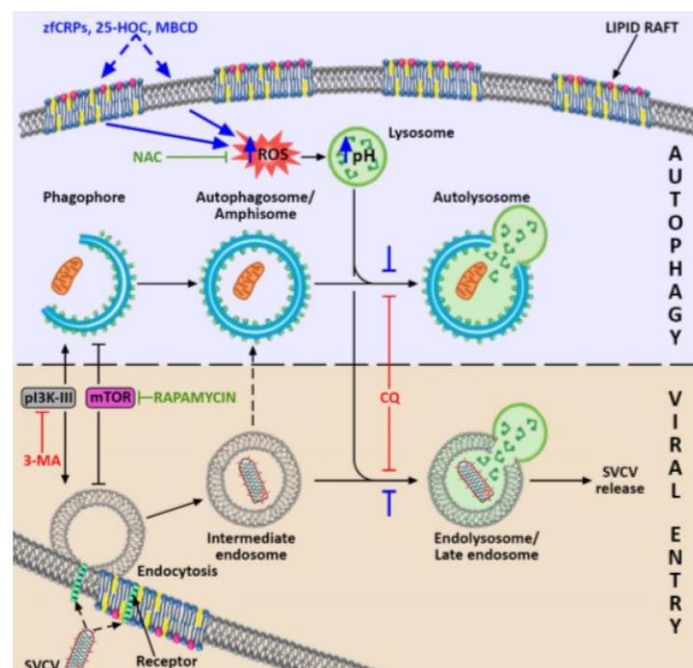
El pez cebra (*Danio rerio*) se ha convertido en un modelo cada vez más importante para los estudios sobre la interacción virus-huésped y, en particular, es excelente para estudiar las enfermedades causadas por los rhabdovirus de peces, ya que puede ser infectado naturalmente por el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) y el virus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV). El SVCV y el VHSV causan enfermedades hemorrágicas graves en ciprínidos y salmónidos, respectivamente, siendo de obligada notificación por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE). A pesar de la cantidad de investigaciones realizadas, ambas enfermedades causan anualmente pérdidas económicas masivas en la industria de la acuicultura a nivel mundial, debido a la ausencia de tratamientos antivirales y a las dificultades en el desarrollo de vacunas efectivas. Considerando todos estos aspectos, la comprensión de la respuesta inmune de los peces frente a estos virus es fundamental para desarrollar medidas de control preventivas y profilácticas. En este sentido, el sistema inmune innato de los peces nos ofrece un reservorio de moléculas con funciones ancestrales inexistentes o no descritas en vertebrados superiores por tener funciones redundantes con las respuestas adaptativas. Pensando que algunas de estas moléculas podrían tener potencial actividad antiviral, el objetivo de esta tesis fue identificar una familia de moléculas del sistema inmune del pez cebra que también estuviese presente en otros peces de interés comercial como la trucha, el salmón, la carpa y el bacalao, con capacidad actividad antiviral. Durante esta tesis se identificó la familia de las pentraxinas cortas (moléculas tipo CRP) con propiedades antivirales frente al SVCV.

La proteína C-reactiva (CRP) es una pentraxina corta cuyos niveles séricos en mamíferos aumentan en presencia de estímulos desencadenantes de la respuesta de fase aguda y, por tanto, es ampliamente utilizada en clínica como biomarcador de inflamación. Clásicamente, la CRP ha sido descrita como una molécula de reconocimiento de patrones bacterianos y de células dañadas que actúa como primera línea de defensa del huésped.

El presente trabajo aporta evidencias sobre una nueva función de esta molécula que se añade a su ya extensa lista de actividades descritas.

En esta tesis se ha demostrado, *in vitro* e *in vivo*, la actividad protectora de las CRPs de pez cebra (zfCRP1-7) frente al SVCV. Asimismo, se ha descubierto que existe una alta afinidad de las zfCRPs por los colesteroles, mostrando una unión preferencial por el 25-hidroxicolesterol (25-HOC), un lípido cuya actividad anti-SVCV ha sido descrita previamente y que muestra efectos sumatorios con la protección ofrecida por las zfCRPs. La exploración de los posibles mecanismos responsables de la protección antiviral conferida por las zfCRPs descartó la interferencia de estas moléculas con el proceso de entrada (unión al receptor y fusión) del virus, sugiriendo la regulación de algún mecanismo antiviral en la célula. También se ha descartado que esta actividad antiviral sea mediada por el sistema de interferón, el cual incluso se reprime tras el tratamiento de las células con zfCRPs. De acuerdo con nuestros resultados, las zfCRPs bloquean la autofagia o la vía endocítica del virus, dos procesos que convergen en el ciclo de replicación de otros virus. Por tanto, en este estudio se demuestra que la inhibición de la infectividad de SVCV se produce como consecuencia del bloqueo de la fusión de los endosomas/autofagosomas que contienen SVCV con el lisosoma. Este bloqueo evita la acidificación requerida para la actividad fusogénica de la proteína G vírica y, por tanto, impide la liberación del virus al citoplasma y su replicación. Este efecto también se observó tras el tratamiento de las células con 25-HOC o metil- β -ciclodextrina (secuestrador de colesterol) previo a la infección con SVCV, sugiriendo la alteración de los niveles de colesterol celulares como causa de la actividad antiviral. La desregulación de estos niveles parece estimular la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que llevaría a la inhibición de la fusión autofagosoma-lisosoma.

Los resultados de este estudio permitirán diseñar fármacos antivirales frente a infecciones originadas por rhabdovirus en peces, una aplicación industrial para el sector acuicultor de vital importancia para satisfacer la creciente demanda de pescado que se encuentra amenazada por las infecciones víricas. A su vez, abren una interesante incógnita sobre si la función antiviral de estas moléculas puede extrapolarse como estrategias terapéuticas frente a otros virus que utilicen la autofagia como mecanismo de entrada.



Palabras clave: pez cebra, rhabdovirus, respuesta inmune, autofagia, proteína C-reactiva.

Publicaciones de la Tesis

Enlace al documento completo: <http://hdl.handle.net/11000/5332>

Bello-Perez, M., Pereiro, P., Coll, J., Novoa, B., Perez, L., Falco, A. (2020). Zebrafish C-reactive protein isoforms inhibit SVCV replication by blocking autophagy through interactions with cell membrane cholesterol. *Scientific Reports*, 10(1): 566. DOI: 10.1038/s41598-020-57501-0

Bello-Perez, M., Falco, A., Novoa, B., Perez, L., Coll, J. (2019). Hydroxycholesterol binds and enhances the anti-viral activities of zebrafish monomeric c-reactive protein isoforms. *PloS one*, 14(1): e0201509. DOI: 10.1371/journal.pone.0201509

Bello-Perez, M., Falco, A., Medina, R., Encinar, J. A., Novoa, B., Perez, L., Estepa, A., Coll, J. (2017). Structure and functionalities of the human c-reactive protein compared to the zebrafish multigene family of c-reactive-like proteins. *Dev. Comp. Immunol.*, 69: 33–40. DOI: 10.1016/j.dci.2016.12.001

Bello-Perez, M., Falco, A., Medina-Gali, R., Pereiro, P., Encinar, J. A., Novoa, B., Perez, L., Coll, J. (2017). Neutralization of viral infectivity by zebrafish c-reactive protein isoforms. *Molecular Immunology*, 91: 145–155. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.09.005