



PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
CATOLICA  
DE VALPARAISO



UNIVERSIDAD TECNICA  
FEDERICO SANTA MARIA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO  
UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

USM. BIBLIOTECA CENTRAL



3560900211969

**Diseño, síntesis y evaluación de péptidos interferentes en la  
expresión *in vitro* del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa  
(IPNV)**

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

CLAUDIO MAX JOFRÉ CONTRERAS

Director de Tesis  
DR. SERGIO MARSHALL

U.T.F.S.M.  
BIBLIOTECAS

Marzo, 2011

*El trabajo recogido en esta tesis ha sido realizado en el  
Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular y el  
Núcleo de Biotecnología Curauma (N.B.C.-P.U.C.V.),  
Bajo la dirección del Dr. Sergio H. Marshall.  
Su financiamiento corrió a cargo de una beca Mecesup;  
Una beca de pasantía en el extranjero, Conicyt, y un  
Proyecto Innova Chile, del Gobierno de Chile.*

*A mi padre, mi madre y Antonia*

## Agradecimientos

Esta tesis ha sido un trabajo desarrollado durante largos cuatro años en los que han colaborado muchas personas, tanto a nivel científico como personal.

A Sergio, mi director de Tesis, por darme la oportunidad de entrar a su laboratorio, confiar en mis capacidades. Por enseñarme nociones de virología y sus valiosos comentarios.

A Vitalia, por su confianza y oportunidad de trabajar en su grupo. Por compartir buenos momentos y disfrutar de la biotecnología de microalgas.

A todos los pertenecientes al Laboratorio, tanto “del lado claro” como “del lado oscuro”; sin ustedes no hubiera sido posible concretar este trabajo. A mis compañeros de oficina, la Carlita, Romina, Mirtha, Nilo, Ramón y en especial a Feña por el día a día, y la talla de salón. A los que ya se fueron y volverán... Jorge y Pauli, en especial Olivares, que me diste las primeras nociones de biología molecular.

A Patito, Llancahorsen y el Sr. Muñoz, por su aprecio y cariño.

Al Berensen, Edgar, Jhorn, Palacios, Claudia Ojeda, Marisela, por su buena onda y momentos de investigación conjuntos.

Al NBC, la Fanny, mi madre putativa, y a Constanza, que sin sus asertivos comentarios todo hubiera sido inalcanzable. A las chicas de ISA; Dannia, Alicia, Maca y Dagoberto Andrés. A los profesores Gloria Arenas, Luis Mercado, Verónica Rojas, por sus buenos aportes en lo científico.

Agradezco también a la secretaria del programa, es decir a Sandra, por toda su ayuda, consejos y su amistad.

También quiero agradecer los contactos generados en esta investigación doctoral, en donde pude conocer y compartir con grandes referentes mundiales de IPNV como: Vikram Vakharia, Øystein Evensen, Stephen Mutoloky y Juan Kuznar, entre otros.

Al grupo de medicina acuática de la Escuela Veterinaria de Oslo en Noruega, donde en todo momento me hicieron sentir en mi país, pero como con -5°C afuera. En especial a mi amigo chino, Chen Xu y al noruego Morten Haugmo.

No podría dejar fuera a mi querida Anita Vega por sus constructivas correcciones, de forma y fondo además de su cariño incondicional y al editor final, mi tío Tomás.

A mis amigos quintainos que con su afecto y amistad hicieron olvidar todo el estrés.

A todos quienes hicieron posible el desarrollo de este trabajo.

## RESUMEN

Nuestro país se ha posicionado como un importante competidor en el mercado de los productos acuícolas, siendo su principal ejemplo el caso del salmón, donde hemos llegado a ser el segundo mayor exportador de salmónidos del mundo. Por este motivo, es menester proteger las inversiones y garantizar una excelente calidad del producto, meta que se ha alcanzado con altos y bajos a lo largo de nuestra historia acuícola, debido principalmente a los brotes de diferentes enfermedades, que cuando provocan algún evento infectivo, generan pérdidas enormes al sector. El caso del virus de la necrosis pancreática viral (IPNV) no queda fuera de este marco, siendo ésta una amenaza real y latente en nuestros planteles de salmón. Las estadísticas revelan pérdidas del orden de los 200 millones de dólares totales anuales, por causa de este agente, lo que refleja la magnitud del problema a nivel nacional y mundial. Hasta hoy existen varias herramientas terapéuticas contra esta infección, las que tienen mayores beneficios son las vacunas con acción antigénica contra la proteína estructural VP2 de IPNV, sin embargo este tipo de protección sólo puede utilizarse en peces de tamaño mediano o grande, quedando susceptibles los estadios más tempranos de desarrollo del pez, en los cuales se ha demostrado que el virus causa las mayores pérdidas por mortalidad. Adicionalmente hay que destacar el hecho que el virus puede propagarse tanto verticalmente como horizontalmente y las herramientas actuales no tienen la capacidad de eliminar el virus, quedando individuos infectados, que se transforman en potenciales portadores. Todas estas razones hacen que sea necesario crear nuevas alternativas terapéuticas que frene las posibilidades de expansión de la infección.

Los péptidos son moléculas endógenas que cumplen una variada gama de funciones en la comunicación y actividad celular. Son secuencias aminoacídicas preferencialmente oligoméricas de entre 3-40 aminoácidos. Se ha encontrado numerosos péptidos naturales con sinnúmero funciones los que han sido caracterizados y modelados, revelando patrones comunes entre ellos. Sumado a esto, el desarrollo de la tecnología de síntesis química de péptidos se presenta como una herramienta para actuar específicamente frente a diferentes proteínas blanco, tanto intra como extracelularmente que, dependiendo del orden de la secuencia de los residuos que se encuentran, pueden formar muchísimas conformaciones diferentes, lo que los potencia como elementos interferentes de gran versatilidad.

Se conoce que el procesamiento natural del ensamblaje del virus IPN conlleva un clivaje de diferentes péptidos provenientes de un precursor de la proteína estructural VP2, llamada pVP2, además se ha revelado que la proteína VP3 esta relacionada al ensamblaje junto a VP2 en la maduración de la partícula viral.

El propósito de la presente tesis es inhibir experimentalmente la expresión e infectividad de IPNV teniendo como blanco la proteína estructural VP2, mediante el uso de péptidos sintéticos diseñados, modelados bioinformáticamente y sintetizados químicamente para ser evaluados (RT-qPCR e inmunofluorescencia semicuantitativa) en una línea celular establecida de salmones CHSE-214. Para la evaluación de la expresión se dispone además de un modelo de infección de IPNV recurrente, en células CHSE-214, es decir, un modelo de células permanentemente infectadas que no presenta estado citopático producto de la infección viral.

De un universo de mas de 32 péptidos ensayados se obtuvo 2 péptidos con capacidad inhibitoria en la expresión de IPNV tanto en el modelo persistentemente infectado, como el de infección *de novo*. Ambos péptidos, primero el GIM66, demostró inhibir la infección y la expresión, obteniéndose valores de inhibición de hasta un 76% en la infección persistente y un 99% en la infección productiva, de la misma forma GIM182, demostró inhibir la infección y la expresión, obteniéndose valores de inhibición de hasta un 97% en la infección persistente y un 36% en la infección productiva.

Finalmente, se seleccionó el péptido GIM182 con cual se realizaron ensayos mas acuciosos, en orden de determinar la acción real del péptido en el sistema de infección con IPNV.

Si bien no se erradicó el virus un 100%, en ambos modelos de infección se generó un robusto sistema de evaluación *in vitro*, y actualmente se están desarrollando pruebas *in vivo* con el péptido, que proyectan esta alternativa de terapia biocompatible, en un producto biotecnológico con capacidad de generar beneficios en la industria salmonera.

## ABSTRACT

Chile is actually a major competitor in the aquaculture industry, becoming the second largest exporter of salmon in the world. It is necessary to protect the investments and to assure the product quality, goal that has partially been achieved due to the outbreak of different diseases, generating huge losses at the sector. Such is the case of IPNV, being a real menace in the salmon industry. Statistics reveal losses of over 200 million dollars every year, because of this agent, which reflects the magnitude of the problem, both at national and international levels.

Nowadays there are some therapeutic tools against this infection; between them the ones with higher benefits are those with antigenic action against the structural protein VP2 of IPNV. However, this kind of protection can only be used from medium to large fishes, remaining susceptible the earlier stages of the fish life cycle, those in which it has been proved the virus causes the higher mortality rates. Furthermore, there is the fact that the virus can spread both vertically and horizontally and that these tools are not able to eliminate the virus, leaving infected individuals become potential carriers of the disease. These facts make necessary the search for new therapeutic alternatives that can stop the infection.

Peptides are endogen molecules that fulfill a variety of functions in cellular communication and activity. They are oligomeric amino acidic sequences of 3-40 aminoacids. There has been found many natural peptides, with a countless number of functions, which are been characterized and modeled, revealing common patterns between them. The development of chemical synthesis of peptides is now a powerful tool that allows action on a specific target, either an intra or extra cellular protein, and depending on the residue sequence and conformation, being potential and versatile interfering elements.

It is known the natural assemblage process of IPNV, which leaves to a complex cleavage of VP2 structural protein in several different peptides. Also the tridimensional structure of the capsid has been determined and its components, being relevant the homotrimer formed by PV2 protein related to assemblage and viral maturation.

The main goal of the present thesis is to experimentally inhibit the expression and infectivity of IPNV using as target the structural protein VP2 through the bioinformatics design, modeling and chemical synthesis of peptides evaluated by semiquantitative immunofluorescence and RT-qPCR on established salmon cell line CHSE-214. For the evaluation of expression, recurrent IPNV infected CHSE-214 cells (an infection model with no cytopathic effect by viral infection) was used.

From more than 32 peptides assayed, two peptides with inhibitory capacity were obtained, for the two models of infection, persistent infected (P.I.) cells and *de novo* infection. Both peptides showed inhibition. First GIM 66 inhibits infection and viral expression with an inhibition of 76% in P.I. and 99% in *de novo* infection. Otherwise, GIM 182 peptide exhibits inhibition values of 97% in the P.I. model and 36% in the productive infection (*de novo*).

Finally, the GIM 182 peptide was selected for additional assays, in order to determine the real action of the peptide in the IPNV infection system.

Although there was no 100% virus eradication, a robust *in vitro* evaluation system was generated, in both infection models, and currently there are *in vivo* trials in development that projects this biocompatible therapy as a biotechnological product capable of generating profits in the salmon industry.

# INDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
I. INDICE GENERAL	iii
II. INDICE DE TABLAS	vi
III. INDICE DE FIGURAS	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Birnavirus	2
1.1.1. VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA	2
1.1.2. Organización genómica de IPNV	3
1.1.3. Estructura de Birnavirus	6
1.1.4. Proteínas Virales	9
1.1.4.1. VP1: RNA polimerasa-RNA dependiente	9
1.1.4.2. VP2 : Proteína Mayor de la cápsida	11
1.1.4.3. VP3: Proteína interna de la cápsida	12
1.1.4.4. VP4 : Ns proteasa viral	13
1.1.4.5. VP5: Proteína dispensable	14
1.1.5. Apoptosis en células CHSE-214 infectadas con IPNV	15
1.1.6. Proceso de entrada a la célula	16
1.1.7. Signología	16
1.1.8. Huéspedes susceptibles y distribución geográfica	17
1.1.9. Vías de transmisión	17
1.1.10. Diagnósis	18
1.1.11. Persistencia y estado vector	19
1.1.12. Situación Nacional	19
1.2. PÉPTIDOS	21
1.2.1. Síntesis de péptidos en fase sólida	23
1.3. POLISOMAS	25
1.4. Péptidos inhibidores de IPNV	26
2. HIPÓTESIS	27
3. OBJETIVOS	27
3.1. OBJETIVO GENERAL	27
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. Modelos de infección para evaluación de los péptidos	28
5. PLAN DE TRABAJO	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS	32
6.1. MATERIALES	32
6.2. MÉTODOS	38
6.2.1. Síntesis de Péptidos en Fase Sólida	38
6.2.2. Caracterización mediante HPLC en fase reversa y espectrometría de masas MALDI-TOF	39

6.2.3.	Determinación de estructura secundaria mediante dicroísmo circular	39
6.2.4.	Cultivos celulares	40
6.2.5.	Línea celular persistentemente infectada	40
6.2.6.	Obtención y purificación del virus	40
6.2.7.	Titulación viral	41
6.2.8.	Electroforesis en gel de Poliacrilamida (SDS)-Page	42
6.2.9.	Diseño de Cebadores	42
6.2.10.	Obtención del ARN y síntesis del ADNc	43
6.2.11.	PCR en tiempo real	44
6.2.12.	Electroforesis en gel de Agarosa	45
6.2.13.	Aislamiento de Polisomas Virales	46
6.2.14.	Western-Blott	47
6.2.15.	Microscopía electrónica de transmisión	47
6.2.16.	Análisis de datos	48
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
7.1.	Modelamiento bioinformático de péptidos que interfieran con la expresión de IPNV	49
7.2.	Generación de batería de péptidos sintéticos interferentes	50
7.3.	Incorporación de péptidos sintéticos en células CHSE-214	53
7.4.	Concentración de péptidos tolerables para la viabilidad de la línea celular CHSE 214.	54
7.5.	Estandarización de condiciones de infección de IPNV	55
7.6.	Cinéticas de infección <i>de novo</i> de IPNV	56
7.7.	Evaluación del potencial interferente de los péptidos sintéticos sobre la expresión de la proteína VP2 de IPNV en la línea celular <b>artificialmente infectada</b>	57
7.8.	Evaluación del potencial interferente de los péptidos sintéticos sobre la expresión de la proteína VP2 de IPNV en la línea celular <b>persistentemente infectada</b>	70
7.9.	Microscopía electrónica de transmisión	76
7.10.	Selección del o los mejores péptidos interferentes	77
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>78</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>89</b>
<b>10.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>90</b>
<b>11.</b>	<b>NOMENCLATURA</b>	<b>91</b>
<b>12.</b>	<b>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</b>	<b>95</b>
<b>13.</b>	<b>Anexos</b>	<b>114</b>
13.1.	Lista de publicaciones y presentaciones a congresos	114
13.2.	Alineamiento de secuencias del segmento A de los 6 genogrupos de Birnavirus	115
13.3.	Modelos estructurales de péptidos seleccionados	119
13.4.	Clon pTOPOIPNV213pb. Resultado secuenciación	120
13.5.	Reacción de clonación Topo (para <i>E. coli</i> químicamente competentes)	123
13.6.	Curvas de calibración de RT-qPCR	124
13.7.	Artículo 1	125
13.8.	Artículo 2	132

## ÍNDICE TABLAS

<b>Tabla 1.1.:</b> Clasificación serológica de Birnavirus acuáticos (Hill y Way, 1995).	3
<b>Tabla 5.1.:</b> Partidores utilizados en RT-PCR tiempo real.	43
<b>Tabla 7.1.:</b> Péptidos sintetizados químicamente en GIM.	51
<b>Tabla 7.2.:</b> Concentraciones de péptidos a los cuales la viabilidad disminuye en un 50 %.	55
<b>Tabla 8.1.</b> Tabla resumen general de resultados.	80

## ÍNDICE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Organización genómica de IPNV.	4
<b>Figura 2:</b> Esquema de ensamblaje del virus IBDV.	7
<b>Figura 3:</b> Mapa tridimensional del birnavirus, IBDV.	7
<b>Figura 4:</b> Superficie interna de la cápsida de IBDV.	8
<b>Figura 5:</b> Expresión de VP3 en mutantes para polipéptidos reduce la replicación de IBDV.	13
<b>Figura 6:</b> Técnicas de Diagnóstico para IPNV.	18
<b>Figura 7:</b> Hallazgos de IPNV en el tiempo.	20
<b>Figura 8:</b> Esquema de síntesis en fase sólida.	24
<b>Figura 9:</b> Esquema del programa y proceso de síntesis simultánea	38
<b>Figura 10:</b> Logos del péptido GIM 66 y GIM182 de acuerdo con la alineación entre los 6 genogrupos de IPNV.	49
<b>Figura 11:</b> RP-HPLC, Espectro de masa y Dicroísmo circular de los péptidos GIM 182 y GIM 66.	52
<b>Figura 12:</b> Entrada de péptidos marcados con rodamina a células CHSE-214	54
<b>Figura 13:</b> Esquema de producción de virus y título de IPNV.	55
<b>Figura 14:</b> Cinética de infección en células CHSE-214 con IPNV a diferentes multiplicidades de infección.	56
<b>Figura 15:</b> Cinética de infección <i>de novo</i> de IPNV en células CHSE-214.	58
<b>Figura 16:</b> Expresión de VP2-IPNV en cinética infección <i>de novo</i> .	58
<b>Figura 17:</b> Expresión de VP1-IPNV cinética infección <i>de novo</i> .	59
<b>Figura 18:</b> Evaluación de la expresión de VP1 y VP2 en sobrenadante y pellet celular, en cinética de infección <i>de novo</i> con IPNV.	60
<b>Figura 19:</b> Cinética de infección <i>de novo</i> , Títulos virales.	61
<b>Figura 20:</b> Evaluación del péptido GIM 182 por RT-qPCR.	62
<b>Figura 21:</b> Evaluación del péptido GIM 182 por inmunofluorescencia semicuantitativa	63
<b>Figura 22:</b> Absorbancias a 260nm y 280nm de fracciones polisomales de células infectadas con IPNV	64
<b>Figura 23:</b> RNA total de fracciones polisomales en infección <i>de novo</i>	65

<b>Figura 24:</b> Expresión de VP2 IPNV en fracciones polisomales en infección productiva.	65
<b>Figura 25:</b> RNA total de fracciones polisómicas a tres tiempos post infección.	66
<b>Figura 26:</b> Expresión de VP1 y VP2 en gradientes continuas de sacarosa, en infección productiva con IPNV.	67
<b>Figura 27:</b> Expresión de VP1 y VP2 IPNV de células CHSE-214 infectadas con y sin péptido GIM 182, en gradientes de sacarosa.	69
<b>Figura 28:</b> Cinética de infección de IPNV en células CHSE-214 persistentemente infectadas.	70
<b>Figura 29:</b> Inhibición de los péptidos GIM 66 y GIM182 en la infección persistente.	71
<b>Figura 30:</b> Optimización de concentración de péptido GIM 182 en infección con IPNV.	72
<b>Figura 31:</b> Absorbancias 260nm y 280nm de fracciones polisomales obtenidas a diferentes tiempos post adición del péptido GIM182 en infección persistente.	74
<b>Figura 32:</b> Expresión de VP2-IPNV de fracciones polisomales obtenidas a diferentes tiempos post adición del péptido GIM182 en infección persistente.	75
<b>Figura 33:</b> Micrografía electrónica de transmisión, tinción negativa de sobrenadantes con y sin péptido GIM 182. 120.000X.	76
<b>Figura 34:</b> Esquema de Inhibición del ensamblaje de IPNV mediado por el péptido GIM 182.	88

# 1. INTRODUCCIÓN

Nuestro país es el segundo competidor mundial en el mercado del cultivo del salmón. Sin embargo, la industria ha debido soportar los altos y bajos productivos, que generalmente son provocados por agentes patógenos. Los agentes que más pérdidas han generado al sector acuícola del salmón son los virus IPN e ISA y la bacteria *P. salmonis* por solo nombrar a los más importantes. En el caso del virus de la necrosis pancreática viral (IPNV) las estadísticas revelan pérdidas del orden de los 200 millones de dólares totales anuales.

Este agente patógeno está diseminado a lo largo de todos los países productores de salmón y presenta una característica particular, se encuentra remanente en los sedimentos del fondo marino infectando a diferentes moluscos y peces nativos que circundan los cultivos sin provocar la enfermedad, e inclusive se puede aislar de pisciculturas en lagos de nuestro país. Sumado a esto, los mayores brotes de la enfermedad se presentan en estados tempranos de desarrollo, es decir primera alimentación, y en el traspaso al mar cuando los peces esmoltifican, produciéndose brotes de hasta un 70% de mortalidad.

Hasta hoy existen varias herramientas terapéuticas contra esta infección, siendo las que tienen mayores beneficios las vacunas con acción antigénica contra la proteína estructural de IPNV; sin embargo este tipo de protección sólo puede utilizarse en peces de tamaño mediano o grande.

Todas estas razones hacen necesaria la generación de una nueva alternativa terapéutica para controlar el virus en sus estados tempranos y que pueda ser usada en las etapas tempranas de desarrollo del pez que pueda complementar las herramientas desarrolladas hasta el momento.

Los péptidos son moléculas cortas compuestas por menos de 100 aminoácidos, a los que se ha encontrado un sinnúmero de funciones, tanto de comunicación como actividad celular. Muchos péptidos naturales han sido caracterizados y modelados estructuralmente, entre ellos muchos de los llamados péptidos antimicrobianos que se han modificado y sintetizado químicamente para obtener una mejora en su actividad. En el campo de desarrollo de vacunas y moléculas antigénicas los péptidos también han sido una herramienta valiosa.

Actualmente se dispone de las secuencias nucleotídicas y proteicas depositadas en bases de datos, además de toda la bibliografía existente, lo que hace posible utilizar esta información como punto de partida para realizar un análisis de las proteínas del virus y la posibilidad de utilizar el enfoque de los péptidos como moléculas que puedan

interactuar tanto en la zona de procesamiento de la proteína mayor estructural VP2, como en el ensamblaje del virus IPN, y que sean capaces de interferir con el ciclo viral. Se sintetizarán químicamente péptidos específicos contra IPNV que serán evaluados *in vitro* en la línea celular CHSE-214 tanto en el modelo de infección productiva, como en el modelo de infección persistente.

### **1.1. Birnavirus**

Se definen a un grupo de virus que poseen dos segmentos de RNA de doble hebra y según la clasificación general de virus, pertenece al grupo III. Este grupo tiene ocho familias, de los cuales todos presentan simetría icosaédrica, con un diámetro de 60 nm y son “no envueltos”, además presentan dentro de los viriones 5 proteínas y entre 3 a 4 péptidos.

La familia Birnaviridae contiene el género *Aquabirnavirus*, *Avibirnavirus* y *Entombirnavirus*. El género *Aquabirnavirus* comprende birnavirus que infectan a peces, moluscos, crustáceos y rotíferos (Dobos *et al.*, 1979). Especies del género *aquabirnavirus* son la infección pancreática necrótica viral (IPNV), el virus ascites de la cola amarilla (Van Regenmortel *et al.*, 2000) y el virus de la cabeza de serpiente (BSNV; John *et al.*, 1999), que recientemente ha sido desplazado a un grupo como único miembro.

Los birnavirus acuáticos son el mayor grupo de virus dentro de la familia Birnaviridae, incluyendo varias cepas de numerosas especies de peces e invertebrados marinos. (Essbauer y Ahne, 2001).

Se destaca al virus de la necrosis pancreática infecciosa como un prototipo de birnavirus y su estudio es necesario para generar una alternativa profiláctica.

#### **1.1.1. VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA**

En los ecosistemas acuáticos existe una gran diversidad de organismos. Entre ellos, los peces, se destacan por presentar gran variedad de tamaños, formas y adaptaciones, cualidades que se asocian con alta capacidad de sobrevivencia. Sin embargo, siguen siendo susceptibles a organismos patógenos presentes en el medio. Un grupo de estos patógenos son los virus, que en muchos casos pueden vivir en armonía con los peces, pero en otros pueden actuar como sus grandes enemigos naturales. Dentro de ellos, los Birnavirus acuáticos son los que presentan mayor rango de acción, infectando a numerosas especies de peces, dentro de las cuales se encuentran las Salmonídeas. El prototipo de la familia Birnaviridae en medio acuático lo constituye el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), y se consideran miembros de este grupo, a todos los virus de RNA doble hebra (dsRNA)

bisegmentados capaces de provocar una infección clínica en una de las especies respectivas (Amos, 1985). El primer birnavirus patogénico aislado de un pez se encontró en una trucha brook (*Salvelinus fontinalis*), en el National Fish Hatchery, Leetown, West Virginia, EEUU (Wolf *et al.*, 1956). El agente fue obtenido durante una epizootia de trucha *fingerlings* sufriendo la infección necrótica pancreática (IPN). Esta infección necrótica pancreática viral (IPNV) fue depositada en American Type Culture Center (ATCC) como ATCC VR299 IPNV y ha sido detectada por años en varios lugares de Norteamérica asociada con altas tasas de mortalidad en juveniles de truchas (Essbauer y Ahne, 2001).

La mayoría de los birnavirus acuáticos están relacionados antigénicamente, representando un gran serogrupo (A) con 10 serotipos y sólo unos pocos birnavirus antigénicamente no relacionados que forman un segundo serogrupo (B) (Ver la tabla 1). La mayoría del IPNV aislado proveniente de EEUU. pertenece al serotipo A1 (West Buxton); los aislados canadienses (C1, C2, C3, Jasper) a los serotipos A6-A9, y los aislados europeos (Sp, Ab, He y Te) a los serotipos del A2-A5 y serotipo A10. En Asia han sido detectados los serotipos A1, A2 y A3 (Hill y Way, 1995).

**Tabla 1.1.** Clasificación serológica de birnavirus acuáticos (Hill y Way, 1995)

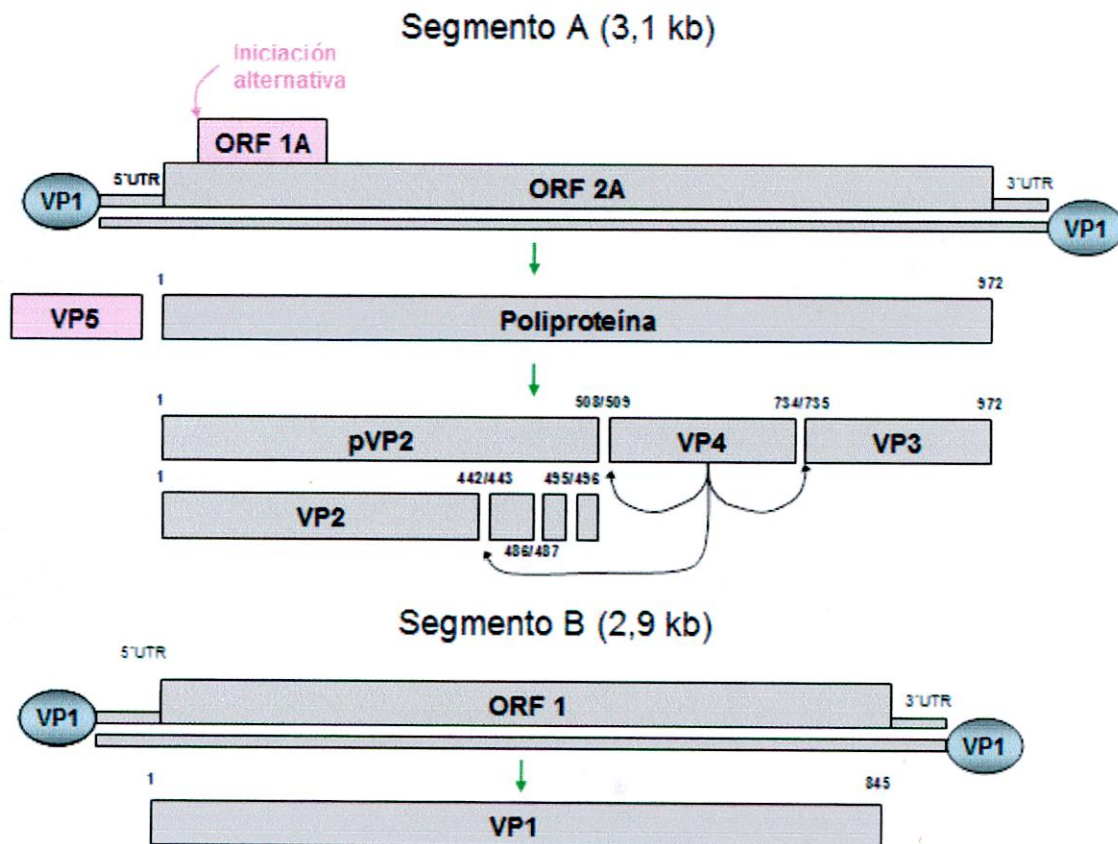
Nombre del Virus	Abreviatura	Origen	Serotipo
<b>Serogrupo A</b>			
West Buxton (ATCC VR-877)	WB <sup>a</sup>	EEUU	A1
Spjarup (ATCC VR-1318)	SP	Dinamarca	A2
Abild (ATCC VR-1319)	Ab	Dinamarca	A3
Hecht (ATCC VR-1330)	He	Alemania	A4
Tellina <sup>b</sup> (ATCC VR-1321)	Te (TV-2)	Reino Unido	A5
Canada 1 (ATCC VR-1322)	C1	Canadá	A6
Canada 2 (ATCC VR-1323)	C2	Canadá	A7
Canada 3 (ATCC VR-1324)	C3	Canadá	A8
Jasper (ATCC VR-1325)	Ja	Canadá	A9
Norway	N1	Noruega	A10
<b>Serogrupo B</b>			
Tellinavirus <sup>b</sup>	TV-1	Reino Unido	B1

<sup>a</sup> Aquí existen al menos tres subtipos del serotipo A1: West Buxton, Buhl y VR-299.

<sup>b</sup> Del molusco bivalvo marino *Tellina tenuis*.

### 1.1.2. Organización genómica de IPNV

Los birnavirus acuáticos presentan similitudes en morfología y propiedades bioquímicas y biofísicas. Los viriones de IPNV presentan las características típicas de la familia Birnaviridae. En la siguiente figura se esquematiza la síntesis proteica viral por parte de los dos segmentos de RNA de doble hebra del birnavirus IPNV.



**Figura 1.** Organización genómica de IPNV. El segmento A contiene dos ORFs que codifican la proteína VP5 y la poliproteína viral, respectivamente. La poliproteína es procesada cotraduccionalmente dando lugar a las proteínas pVP2, VP3 y VP4. pVP2 se autoprocresa postraduccionalmente en su extremo carboxilo terminal para dar lugar a la forma madura VP2. El segmento B contiene un único ORF que codifica la RpRd, VP1.

El genoma de IPNV está formado por dos segmentos de RNA de cadena doble (dsRNA) de 3,1 kb (segmento A) y 2,9 kb (segmento B) (Muller *et al.*, 1979; Muller y Nitschke, 1987) con regiones no codificantes (UTR) en los extremos 5' y 3' (Figura 1). El segmento A contiene dos marcos abiertos de lectura (ORFs) parcialmente solapantes. El primero de ellos codifica la proteína no estructural VP5 (145 aa, 17 kDa), una proteína citolítica de membrana (Lombardo *et al.*, 2000) que, aunque dispensable para la replicación del virus en cultivos celulares (Mundt *et al.*, 1997), es importante en la patogénesis *in vivo*, ya que está implicada en la liberación y dispersión de la progenie viral (Yao *et al.*, 1998; Lombardo *et al.*, 2000). Se ha descrito que esta proteína inhibe la apoptosis en los estadios iniciales de la infección (Liu *et al.*, 2006). El segundo ORF codifica una poliproteína de 107 kDa (972 aa) que se

autoprocresa proteolíticamente dando lugar a las proteínas pVP2 (508 aa, 54 kDa), VP4 (225 aa, 25 kDa) y VP3 (237 aa, 28 kDa) en un proceso cotraduccional mediado por la propia VP4 (Lejal *et al.*, 2000; Petit *et al.*, 2000). Inicialmente, se propuso que VP4, la proteasa de los birnavirus, utilizaría un mecanismo catalítico mediado por residuos de serina y lisina conservados en su centro activo, lo que la diferenciaría de otras proteasas virales (Birghan *et al.*, 2000; Lejal *et al.*, 2000; Petit *et al.*, 2000). La reciente resolución de la estructura cristalina de la proteína VP4 de varios miembros de la familia (Feldman *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Imajoh, 2007), ha confirmado la validez de dicha hipótesis, así como la homología estructural con otras proteasas con una díada catalítica Ser/Lys como la proteasa bacteriana Lon (Botos *et al.*, 2004; Botos *et al.*, 2005), las proteínas de respuesta a daño en el DNA LexA (Luo *et al.*, 2001) y UmuD' (Peat *et al.*, 1996), o el represor c1 del bacteriófago  $\lambda$  (Bell *et al.*, 2000). pVP2 es la forma precursora de la proteína estructural de la cápsida, VP2. Los 74 residuos carboxilo terminales de pVP2 son procesados para dar lugar a la forma madura, VP2 (442 aa, 48kDa). En cualquier caso, el proceso de maduración requiere el ensamblaje de la cápsida viral (Chevalier *et al.*, 2002) y los pequeños polipéptidos generados quedan retenidos en las partículas virales (Da Costa *et al.*, 2002). Dichos péptidos poseen la capacidad de desestabilizar membranas (Chevalier *et al.*, 2005; Galloux *et al.*, 2007). Al igual que ocurre en los procesos morfogenéticos de otros sistemas virales (Gallagher y Rueckert 1988; Zlotnick *et al.*, 1994; Schneemann *et al.*, 1998), este proceso de maduración proteolítica podría conferir irreversibilidad al ensamblaje de la cápsida. VP3 es una proteína multifuncional ya que además de su interacción con VP2 durante el proceso de morfogénesis de la cápsida, está implicada en múltiples interacciones con otros componentes estructurales del virión. VP3, interacciona con la RNA polimerasa RNA dependiente (VP1) y con el dsRNA viral (Lombardo *et al.*, 1999; Tacken *et al.*, 2002; Maraver *et al.*, 2003a; Maraver *et al.*, 2003b).

El segmento B contiene un único ORF que codifica la RNA-polimerasa RNA-dependiente (RpRd), una proteína de 97 kDa (845 aa) (Magyar *et al.*, 1998; Muller y Nitschke 1987; Morgan *et al.*, 1988; Von Einem *et al.*, 2004) (Figura 2). Al igual que las polimerasas de otros virus dsRNA, VP1 cataliza tanto la transcripción como la replicación del genoma viral (Spies *et al.*, 1987; Xu *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2007).

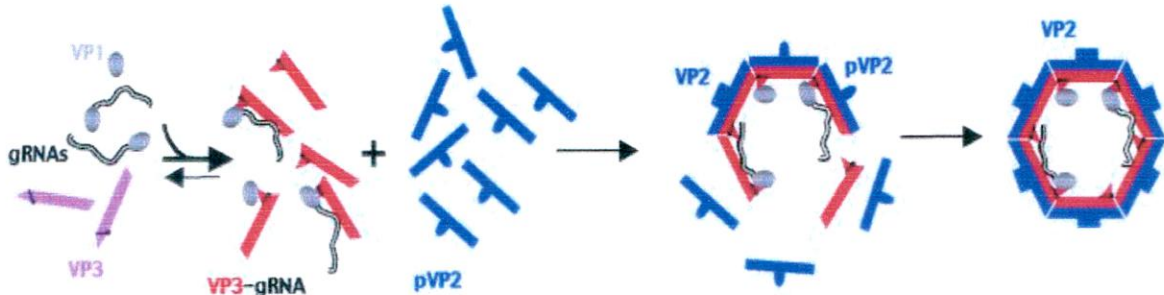
La heterogeneidad de cuasi-especies y características de mutación rápida de IPNV han sido estudiadas con huella digital de RNA, lo que ha revelado la existencia de tres grupos. Además, se ha podido establecer que IPNV Sp representa una ruta evolutiva diferente de aquellos grupos IPNV Ab y el VR 229. Algunas relaciones moleculares podrían estar correlacionadas con características biológicas (por ej.: línea celular, replicación adaptativa a alta temperatura; Hsu *et al.*, 1995). También se ha realizado una comparación filogenética de secuencias aminoacídicas deducidas de la región codificante de VP2 de 28 birnavirus acuáticos incluyendo cepas del serogrupo A, la que reveló 5 genogrupos con varios genotipos. Los virus más divergentes exhiben una similitud del 81,2%. Los genogrupos basados en el ORF entero de VP2 generalmente son correlativos con el origen geográfico y clasificación serológica (Nicholson, 1993). Investigaciones del gen VP2 por reacción en cadena de polimerasa (PCR) y análisis de grupos por *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) agrupó 17 aislados asiáticos (todos serotipos A3) en cuatro grandes genogrupos. Los grupos basados en la variación del gen VP2 son correlativos con la clasificación serológica basada en el patrón de reacción del anticuerpo monoclonal específico VP2 (Lee *et al.*, 1996). Sin embargo, la caracterización del pequeño ORF del segmento genómico A de 20 cepas de IPNV reveló tres grandes genotipos. De acuerdo con la correlación entre la clasificación serológica y genómica, más de 10 serotipos del serogrupo A son de hecho subtipos. El serotipo A4 (IPNV aislado en Alemania; Ahne, 1978b) difiere de los otros serotipos del serogrupo A (Heppell *et al.*, 1995b). Una variante del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) expresada en una línea celular de peces, mostró una dinámica de cambios morfológicos no típicos de células apoptóticas durante la infección de IPNV (Hong *et al.*, 1999b). Asimismo, inducción de la proteína antiviral Mx por interferón (IFN) protege contra IPNV en células CHSE- 214 (Nygaard *et al.*, 2000). Diferentes vacunas de IPNV han sido establecidas: una vacuna inactivada usada en Noruega, una vacuna atenuada y una vacuna recombinante disponible en Noruega basada en la proteína VP2 de la cepa N1 (Frost y Ness, 1997; Pettersen, 1997; Frost *et al.* 1998). IPNV ha sido clasificada como una enfermedad de significancia para la Oficina Internacional de Epizootias (OIE).

### **1.1.3. Estructura de Birnavirus**

Las partículas virales de RNA de doble hebra (dsRNA) son maquinarias de transcripción complejas. El genoma de estos virus ha sido escondido de los mecanismos de defensa celular en todos los pasos del ciclo de vida viral (Pous *et al.*,

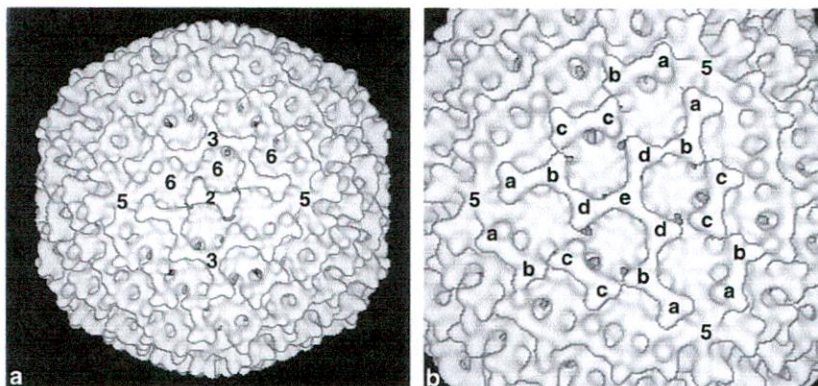
2005). La cápside de virus de dsRNA está generalmente formada por una capa de proteínas que despliegan una simetría icosaédrica (Caston *et al.*, 1997).

A continuación se esquematiza el proceso de ensamble de las partículas infectivas (viriones) de los birnavirus, propuesto para IBDV por Chevalier *et al.* (2002).



**Figura 2:** Esquema de ensamblaje del virus IBDV. (Chevalier *et al.*, 2002)

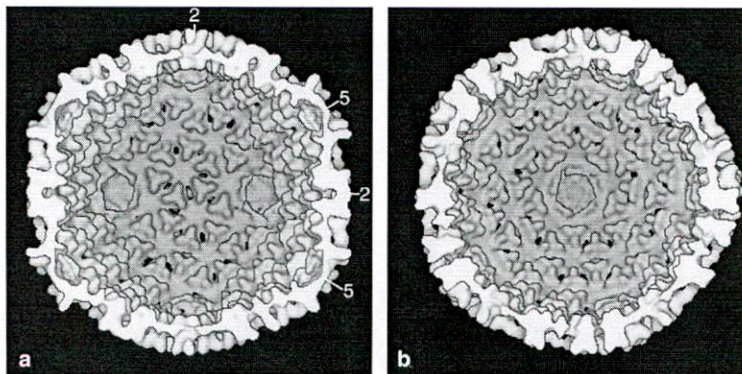
Según Bottcher y colaboradores (1997) de las 780 subunidades encontradas en la parte exterior de la cápside, forma 260 unidades triméricas, que se encuentran en 5 diferentes formas y marcadas como **a**, **b**, **c**, **d** y **e**; como se observa en la figura 3. Una clase de trímero (clase **e**) se encuentra estrictamente en el eje de 3 veces en toda la partícula y está en contacto directo con otros tres trímeros vecinos (clase **d**). Otros trímeros hacen pares unidos (por ejemplo **a-b** y **c-c**) asemejando una corbata de moño (huma), mientras que entre los trímeros **c** y **d** existen espacios entre ellos y particularmente entre los trímeros **a** que se encuentran cercanos al eje de 5-veces. La unidad asimétrica de la estructura consta de un tercio del trímero (clases **a** a **d**), formando un total de 13 unidades.



**Figura 3:** Mapa tridimensional del *birnavirus*, IBDV. (a) Vista del eje de 2-veces de toda la partícula. Son marcados los ejes de 2-, 3- 5-veces y el eje local 6-veces, el patrón indica claramente una arquitectura  $T = 13$ . (b) Close-up de la partícula vista en el eje de 3-veces, se muestra la naturaleza del trímero agrupado ensamblado observado desde fuera. Cinco clases simétricamente diferentes de trímero son indicadas con las letras **a - e**.

Las distancias inter-triméricas están correlacionadas con el radio esférico en que las unidades se encuentran. Además de esto Bottcher y colaboradores encontraron que la cápsida no es isométrica, con las unidades triméricas (clase **a**) que rodean el eje de 5-veces que se extiende a un radio de 36 nm, las unidades (clase **e**) en el eje de 3-veces se extiende a un radio de 33 nm, y las unidades (clase **c**) cercanas al eje de 2-veces se extienden a un radio de 33,5 nm. La superficie de los trímeros se extienden hacia fuera en cerca de 4 nm de una fina cáscara (la cápsida), casi continua, lo cual cierra los agujeros de los lugares cercanos a los ejes de 5- y 6-veces. Lugares (eje 5-veces) los cuales son señalados por Prasad (1996) para otros virus (*rotavirus*, *bluetongue virus*) como una especie de poro por donde pasan transcritos de RNAs mensajeros, que son exportados fuera de la cápsida. La cáscara continua es curva en la mayoría de las regiones, pero es fuertemente doblado en los ejes de 5-veces. Esto podría señalar que esta región confiere una salida y/o entrada de pequeñas moléculas a través de la cápsida.

La línea de la cápsida al unirse en la vecindad de los ejes de 5-veces a través de eje de 2-veces la posición es casi recta (Fig. 4.a), por lo que la cápsida tiene la forma de un icosaedro pero con caras ligeramente curvadas.



**Figura 4:** Dibujos de sección que muestran la superficie interna de la cápsida de IBDV visto por el eje de 2-veces (a) y el eje de 5-veces (b). Un conjunto de estructuras en forma de Y indica el embalaje del trímero agrupado en subunidades, excepto en las posiciones cercanas al eje de 5-veces. El segmento ecuatorial en el panel a (el más cercano al espectador) contiene los ejes de 2-y 5-veces como se indica. En el panel b, el borde que rodea la cavidad pentagonal en el eje 5-veces es claramente visible.

En la superficie interna de la cápsida, las unidades triméricas aparecen como una forma de Y característica, que sobresalen de la cubierta (Fig. 4.a). Sólo hay 200 de estas estructuras con características en forma de Y, que podemos encontrar cercanos a los ejes de 2- y 3-veces. Además podemos encontrar 60 puestos más, cercanos al eje de 5-veces que parecen estar ocupados por material que le hace un cerco

alrededor de la cavidad ubicada en el eje de 5-veces (Fig. 4.b). Asimismo, en las secciones correspondientes a la cara interna de la cápsida (26 a 27 nm), las 200 estructuras con forma de Y son claramente visibles. Sin embargo, el material que rodea inmediatamente el eje de 5-veces tiene una apariencia diferente, indicando que las 60 estructuras que presentan forma de Y ocupan estas posiciones, son muy distorsionadas o que estos sitios estarían ocupados por una proteína diferente. Según lo publicado por Pous y col. (2005), los 2 birnavirus, IBDV y IPNV presentan una geometría icosaédrica con triangulación = 13. Y sólo VP2 es la proteína que conforma la estructura externa de la cápsida.

#### **1.1.4. Proteínas Virales**

Como se ha mencionado anteriormente, IPNV necesita procesar sus propias proteínas para poder hacerse infectivo. Además de poseer 5 proteínas principales, entre ellas VP2, VP3 y VP4 presenta una serie de péptidos resultantes del procesamiento de la poliproteína. Dada la importancia de cada proteína y debido a que presentan diferencias estructurales y funcionales entre ellas a continuación se detallarán sus características principales.

##### **1.1.4.1. VP1: RNA polimerasa-RNA dependiente**

Muchos virus de RNA y DNA, como lo son adenovirus, poliovirus y birnavirus, usan moléculas partidoras para iniciar su síntesis de RNA (Pan *et al.*, 2007).

El extremo 5' del genoma de birnavirus está unido covalentemente al grupo hidroxilo de la serina de la RNA polimerasa RNA-dependiente (RdRp) VP1, a través de un enlace fosfodiéster (Villanueva *et al.*, 2004). Moléculas libres de VP1 también se encuentran en el virión, las que posiblemente se autoguanililen, produciendo VP1-pGpG, que es subsecuentemente usado como partidor para iniciar la replicación y transcripción viral (Pan *et al.*, 2007).

El sitio activo de esta serin-proteasa, contiene sólo dos residuos de aspartato, a diferencia de otras enzimas de la misma familia, otra inusual característica de ésta polimerasa RNA-dependiente. La superposición de la estructura tridimensional de un complejo en transcripción de VP1 muestra que los residuos catalíticamente importantes asumen la misma posición y similar conformación que una polimerasa típica (Pan *et al.*, 2007).

Sin embargo, los virus dsRNA de birnavirus presentan características como organización genómica, estrategia de replicación, estrategia de codificado de la poliproteína y plegamiento de la cápsida, tipo virus de hebra simple positiva de RNA (+ssRNA; Tao *et al.*, 2007).

Según Hong-Tao (2004), se evidencia que rVP1 clonados, expresados y purificados poseen capacidad de auto-guanilizarse, además de tener la habilidad de agregar un segundo GMP para producir VP1-pGpG siendo esto una característica inherente del polipéptido.

El análisis de productos de VP1 clivados química y proteolíticamente y marcados con una sonda, permitió mapear la unión de VP1 al nucleósido en el fragmento  $_{160}\text{GSY}_{164}$  de VP1 de IPNV, encontrándose finalmente que la serina en la posición 163 es necesaria para la unión al ácido nucleico (Hong-Tao *et al.*, 2004). Además, esta secuencia fue encontrada repetida en los tres géneros de Birnavirus (Hong-Tao *et al.*, 2004).

Se conoce el modelo general de las RNA polimerasas RNA dependientes (Ortín y Parra, 2006) las que presentan una estructura común: con forma de una mano derecha; con dedos, palma y pulgar, como sus subdominios, siendo ésta la estructura formada por VP1 de IPNV.

Se destaca el estudio presentado por Pan *et al.* (2007) que presenta la estructura tridimensional de la polimerasa de IBDV, en donde se encontraron tres características destacables dentro de todas las polimerasas: primero, que VP1 de los birnavirus adopta una topología única de sitios activos, que une cinco motivos esenciales de RNA polimerasas, en un orden inusual, C-A-B-D-E para formar un sitio catalítico activo conservado. Segundo, el motivo altamente conservado entre polimerasas virales: GDD en birnavirus es reemplazado por ADN en VP1 de IBDV y tercero, que el lugar Ser-166, putativo para la guanililación está localizado a aproximadamente 23Å del sitio activo de polimerasa. La VP1 de birnavirus también presenta características destacables, como por ejemplo el hecho de que la guanililación de VP1 es independiente de RNA, asimismo, se ha determinado que la proteína activa, denominada VP1c (por el núcleo de VP1) correspondería a la secuencia aminoacídica de 19-810, manteniendo la actividad polimerasa, similar a la proteína completa de VP1 (Pan *et al.*, 2007).

#### 1.1.4.2. VP2 : Proteína Mayor de la cápsida

En estudios de la morfología de IPNV, se han encontrado dos tipos de partículas virales, A o provirión, que es la primera partícula detectable post-infección simultáneamente con el RNA doble hebra, sugiriendo que el ensamble viral ocurre apenas se replica la doble hebra de RNA. También se ha determinado que esta partícula no se encuentra ensamblada completamente, donde se infiere que correspondería a un intermediario en la morfogénesis (Villanueva *et al.*, 2004). Luego de la maduración de los proviriones, son producidas las partículas infectivas B (viriones; 3-4 horas post-infección) en el mismo estudio, donde se encontraron sus proteínas maduras y plegadas completamente (Villanueva *et al.*, 2004). Con lo que se concluye que la maduración de las partículas A de IPNV no sólo significa el adquirir la capacidad infectiva, sino que también la reducción remarcada del diámetro de las partículas (Villanueva *et al.*, 2004). Esto queda explícito en un análisis densitométrico realizado de las proteínas virales de ambos tipos de partículas (A y B), en donde se observa que las partículas tipo A poseen la proteína mayor de la cápsida VP2 en la forma no madura, pVP2, y que las partículas tipo B, sólo presentan VP2 y no el intermediario pVP2.

También se han encontrado péptidos resultantes del clivaje de pVP2 en el extremo carboxi terminal, los que principalmente son 3:

- AGGRYKDVLESWA [496-508]
- AGGRYHSMA [487-495]
- WGWRDIVRGIRKVAAPVLSTLFPMAAPLIGMADQFIGDLTKTNA [443-486] y 14 péptidos derivados de esta secuencia (Galloux *et al.*, 2004).

Estos péptidos identificados como parte del procesamiento de pVP2 han sido también encontrados en los diferentes Birnavirus, y juegan un rol importante en la capacidad infectiva del virus. (Da Costa *et al.*, 2002, 2003).

Fueron identificados tres sitios de clivaje para el proceso de maduración de pVP2. Previamente se propusieron dos de estos sitios de clivaje (486-487, 495-496) como blanco de la proteasa viral VP4. (Petit *et al.*, 2000) Estos dos sitios, el sitio de clivaje primario en la unión pVP2-VP4, está definido como un motivo [S/T]XA↓A. Esta secuencia de consenso presenta alguna similitud con la secuencia SKA↓W que se encuentra en la zona 442-443, sugiriendo que VP4 estaría relacionado en el clivaje para generar VP2 madura (Galloux *et al.*, 2004).

Por otro lado, se detectó la expresión recombinante de VP2-truncada en células CHSE-214 a concentraciones de nanogramos de anticuerpo monoclonal CE4 por ELISA e Inmunoblot. Esta observación sugiere que el plegamiento y la glicosilación de VP2-truncada sería extremadamente similar a la proteína viral nativa (Labus *et al.*, 2001).

Se ha visto que la mayoría de los anticuerpos monoclonales neutralizantes reaccionan con epítopes dentro de la proteína VP2 (Caswell-Reno *et al.*, 1986; Christie y Ness, 1990; Tarab *et al.* 1993; Frost *et al.*, 1995; Liao y Dobos, 1995; Tarab *et al.*, 1995), se han sugerido epítopes para neutralización para VP3 (Tarab *et al.*, 1995). También se ha demostrado tres epítopes, dos variables y uno conservado, ubicados en el tercio central de VP2 (Frost *et al.*, 1995). Es importante destacar el modelo tridimensional de VP2 propuesto por Coulibaly (2005) que muestra a VP2 como un trímero, en la que se identifican tres dominios, uno basal (B), otro con forma de concha (S) y un dominio protector (P), el cual ha demostrado ser el más variable entre los diferentes aislados de IPNV, siendo además el dominio que posee actividad inmunogénica.

Recientemente se ha determinado el potencial electrostático de la superficie del trímero formado por VP2, en donde se encuentra un bolsillo con carga negativa, que podría ser un epítope funcional (Coulibaly *et al.*, 2010).

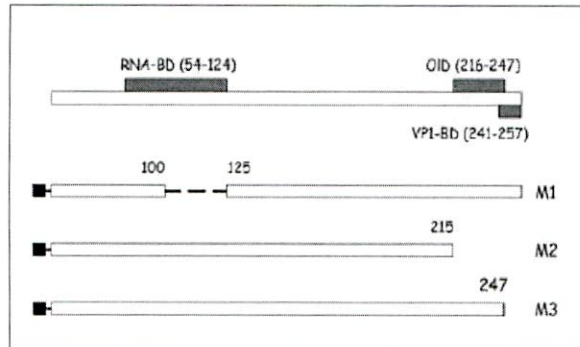
En resumen y con los antecedentes descritos anteriormente se seleccionarán péptidos correspondientes a la zona de procesamiento del precursor de VP2 y las zonas de interacción entre VP2 que forman la triada, para evaluar su posible actividad antiviral.

#### **1.1.4.3. VP3: Proteína interna de la cápsida**

VP3 controla el ensamble del mayor polipéptido de la cápsida VP2 (Maraver *et al.*, 2003; Martínez-Torrecedrada *et al.*, 2000; Oña *et al.*, 2003) e interactúa con ambos, el genoma viral (Kochan *et al.* 2003; Tacken *et al.*, 2002) y con VP1 (Lombardo *et al.*, 1999). Adicionalmente, varios dominios funcionales de VP3 han sido mapeados y caracterizados (Maraver *et al.*, 2003; Martínez-Torrecedrada *et al.*, 2000; Kochan *et al.*, 2003; Lombardo *et al.*, 1999).

El estudio de González *et al.* (2005) en el cual se realiza una expresión recombinante de VP3 con diferentes secuencias borradas, presentó que esta proteína viral posee: un dominio de unión al genoma (RNA-BD), un dominio de oligomerización (OID) y un dominio de unión a VP1 (VP1-BD). Péptidos mutantes con estos dominios faltantes

demonstraron la importancia de estos sitios para el correcto desarrollo e infectividad del birnavirus IBDV, como lo señala la figura 5:



**Figura 5:** Expresión de VP3 en mutantes para polipéptidos reduce la replicación de IBDV. El diagrama presenta los polipéptidos M1, M2 y M3 que son mutantes con aminoácidos faltantes, expresados en rBV (Baculo Virus recombinante). Rectángulos en gris indican la presencia de 6-histidinas marcadas unidas al N-terminal de los diferentes constructos para derivados de VP3. La parte superior del diagrama muestra el polipéptido de VP3 silvestre (257 residuos), indicando las posiciones de unión al RNA (RNA-BD), oligomerización (OID), y el dominio de unión a VP1 (VP1-BD) (Fuente: González *et al.*, 2005)

#### 1.1.4.4. VP4 : Ns proteasa viral

El procesamiento proteolítico de los precursores de proteínas virales es un paso crucial en el ciclo de vida de la mayoría de los virus que infectan células eucariotas, y proteasas virales que son generalmente asociadas a estos eventos (Babé *et al.*, 1997).

La traducción del segmento A produce una poliproteína y una pequeña proteína, VP5. La poliproteína cuyo orden es NH<sub>2</sub>-pVP2-VP4-VP3-COOH, es procesada co-traduccionalmente y clivada en las uniones pVP2-VP4 y en VP4-VP3 por VP4 (también llamada NS) con actividad proteasa asociada (Manning y Leong, 1990; Manning *et al.*, 1990).

La conversión de pVP2 en VP2 considera el clivaje o clivajes de pVP2 cerca del extremo carboxilo como sucede con IBDV (Azad *et al.*, 1987). Este procesamiento es lento y para IPNV ha sido propuesto que este proceso estaría más relacionado con proteasas de células del hospedero que con la acción proteolítica de VP4 (Dobos, 1995).

En el trabajo de Petit *et al.* (2000), el comportamiento de la poliproteína alterada en las posiciones serina 633 y lisina 674 sugieren que VP4 podría usar un mecanismo Serina-Lisina, similar a aquella propuesta para peptidasas de señales de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (Nunnari *et al.* 1993; Paetzel *et al.*, 1998; Strynadka *et al.*, 1992; Tschantz *et al.*, 1993; Van Diji *et al.*, 1995).

Los sitios exactos de clivaje en las uniones pVP2-VP4 y VP4-VP3 fueron determinados y están caracterizados por secuencias Ser/Thr-X-Ala-Ser/Ala, un motivo que muestra alguna similitud en sitios de clivaje con peptidasas de señales y herpes simplex virus (HSV; Petit *et al.*, 2000).

¿Por qué la expresión de la poliproteína *in vitro* o en un sistema de baculovirus sólo produce pVP2 sin el posterior procesamiento de pVP2 a VP2, según lo observado en células infectadas con IPNV? Una posible explicación es que el producto pVP2 es resultante de un autoclivaje de la poliproteína, como un proceso intramolecular, en contraste con la conversión de pVP2 en VP2, que envuelve una reacción bimolecular. Por lo tanto, la concentración de pVP2 y VP4 puede influenciar dramáticamente la tasa de conversión en VP2 (Petit *et al.*, 2000).

El trabajo de Lee y Delmas (2006), en donde se señala la primera estructura cristalográfica de una proteasa viral de birnavirus, (BSNV) provee de información acerca del mecanismo caracterizado recientemente como perteneciente al grupo de serin-proteasas que utiliza una lisina como base general y revela la estructura de potenciales blancos de terapias antivirales, para birnavirus (Feldman *et al.*, 2006, Imajoh *et al.*, 2007).

#### **1.1.4.5. VP5: Proteína dispensable**

Se ha encontrado que VP5 es dispensable para la virulencia y persistencia de IPNV. Algunos resultados muestran que VP5 no es necesaria para la replicación viral *in vivo*, y su ausencia no altera las características de virulencia o el establecimiento de infección permanente (Santi *et al.*, 2005). Asimismo, Hong, (2002) encontró un dominio conservado Bcl-2 en parte de la proteína VP5, este dominio está relacionado con la vía apoptótica y que regularía negativamente la inducción a apoptosis, sugiriendo que IPNV y otros birnavirus tendrían esta estrategia para regular el proceso de muerte celular programada, tanto en células embrionarias de peces como de aves (CHSE-214 y CEF, respectivamente).

### 1.1.5. Apoptosis en células CHSE-214 infectadas con IPNV

La apoptosis es un proceso de muerte celular cuidadosamente regulado, que puede ser gatillado por una gran variedad de estímulos, siendo uno de éstos la infección viral. Algunas características de la infección viral son reconocidas por las células como nocivas, promoviendo una respuesta defensiva que concluye con la muerte celular. La inducción de apoptosis en la mayoría de los casos, es un desafío para el éxito de la replicación viral (Espinoza, *et al.*, 2005). Sin embargo algunas veces una adecuada manipulación de la respuesta apoptótica resulta en un mecanismo de muerte celular, que aumenta el desarrollo del virus (Roulston *et al.*, 1999; Hay y Kannourakis, 2002). Se ha publicado que IPNV, como muchos otros virus, induce apoptosis en células cultivadas. Esta respuesta fue observada durante los primeros estados de multiplicación de IPNV implicando severos daños morfológicos en las células infectadas como por ejemplo, el arredondamiento y aburrujamiento (Hong *et al.*, 1999b). La expresión de este programa de muerte celular puede ser interpretada como un mecanismo de defensa de la célula frente a la multiplicación de IPNV. Sin embargo, la mayoría de las células infectadas no presentan una respuesta apoptótica, al menos la mitad de las células infectadas no expresan señales apoptóticas en ningún momento durante la multiplicación viral (Hong y Wu, 2002).

Se ha demostrado que el ensayo de Annexin V es sensible a los cambios morfológicos más tempranos producidos en la célula, y puede ser empleado como un marcador temprano de apoptosis, inclusive detecta apoptosis antes de la activación de la vía de las caspasas (Hay y Kannourakis, 2002). En el estudio de Espinoza *et al.* (2005) se aprovechó el dominio de la técnica de marcaje de las proteínas virales, donde además se examinaron diferentes signos de apoptosis, como el arredondamiento celular, condensación de la cromatina y cuerpos multivesiculares, junto a Annexin V, demostrando primero que la apoptosis raramente precede a la necrosis, y segundo, que el porcentaje de células expresando apoptosis nunca había excedido el 12% de toda la población infectada, mientras que el porcentaje de células necróticas había alcanzado el 75% durante el transcurso de la infección. Por otro lado, IPNV codifica una pequeña proteína no estructural de 17kDa denominada VP5 (Magyar y Dobos, 1994). Esta proteína posee un dominio homólogo al factor Bcl2 (Hong *et al.*, 2002) que ha sido propuesto como supresor de apoptosis, sugiriendo que IPNV ocuparía esta proteína para regular negativamente la apoptosis, permitiendo el aumento en la producción de progenie viral.

### 1.1.6. Proceso de entrada a la célula

En general el ciclo infeccioso de los virus sin envoltura es bastante conocido, comienza con la absorción de éstos a la superficie celular; una vez absorbido, entra a la célula por endocitosis, para luego atravesar la membrana endosomal, con la posterior replicación del genoma y la síntesis de macromoléculas (ácidos nucleicos y proteínas), las que son ensambladas en viriones maduros capaces de infectar otra célula blanco (Dimmock, 1982).

En el citoplasma la transcripción de la doble hebra de RNA viral es realizada por la polimerasa viral y ocurre dentro del virión, de manera que el dsRNA nunca está expuesto al citoplasma. El transcripto positivo es utilizado como templado para la traducción de las proteínas virales. Finalmente los RNAs de cadena positiva son encapsidados en la partícula viral, donde se transcribe la hebra negativa, las que se unen formando las dsRNAs (Dobos, 1995), finalmente los viriones salen de la célula.

Existen evidencias que demuestran que el virus del IPN utiliza la vía endosomal como mecanismo de internalización. En estudios con microscopía electrónica se ha observado a las partículas virales tanto en vesículas de internalización como en compartimentos endosomales, demostrándose esto último con la co-internalización de virus con ferritina catiónica (Couve *et al.*, 1992).

### 1.1.7. Signología

El IPNV causa una enfermedad aguda y contagiosa principalmente en truchas juveniles y peces salmonídeos (Novoa *et al.*, 1995). La susceptibilidad generalmente disminuye con la edad, a excepción del Salmón Atlántico (*Salmo salar*), el cual puede sufrir la enfermedad tempranamente desde que es transferido al agua de mar (*Disease of Fish*, 1995).

Los signos de un salmón enfermo aparecen usualmente en forma progresiva, incrementándose diariamente la mortalidad. Los signos clínicos incluyen pigmentación oscura, una pronunciada distensión abdominal, exoftalmia, a veces hemorragias en el área ventral. Internamente aparecen múltiples petequias en el área pilórica; el hígado y páncreas están pálidos. El tracto digestivo está habitualmente sin comida y un mucus de apariencia blanquecina aparece en el estómago e intestino anterior. Además, se puede observar un particular nado en espiral (Amos, 1985; O.I.E., 1995).

La mortalidad acumulada, en peces en cultivo, puede variar desde el 10% a más del 90%, dependiendo de una combinación de factores, como la cepa viral, huésped y el medio. Esta elevada mortalidad en peces jóvenes afecta en forma significativa la productividad de las empresas de cultivo de peces, y por ende tiene un indiscutible impacto económico a nivel mundial (Huang, 1986).

#### **1.1.8. Huéspedes susceptibles y distribución geográfica**

Como se ha mencionado anteriormente, los birnavirus acuáticos son los virus que presentan mayor rango de acción, con representantes que infectan a numerosas especies de peces, donde se destacan los peces salmónidos, como por ejemplo, Trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), Trucha de río (*Salvelinus fontinalis*), Trucha café (*Salmo trutta*), Trucha de lago (*Salvelinus namaycush*), Salmón atlántico (*Salmo salar*), Salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), y numerosos invertebrados y peces marinos como anguilas (*Anguilla anguilla*, *Anguilla japonica*), pez rayado, tilapia (*Tilapia mossambica*), moluscos marinos y algunos crustáceos de las costas europeas y japonesas (Amos, 1985; O.I.E, 1995; Brown, 1986; De Kinkelin *et al.*, 1985). En consecuencia, de acuerdo con las regiones o habitats de las especies mencionadas, se considera al virus IPN endémico en muchas partes de América, Europa y Asia, no siendo excluyente para nuestro país. (Roberts y Shepherd, 1986).

Recientemente, un IPNV cercanamente relacionado con IPNV fr21 y N1 fue detectado por primera vez en Australia (Crane *et al.*, 2000).

#### **1.1.9. Vías de transmisión**

El IPNV es transmitido vía fecas, secreciones urinarias y sexuales de peces infectados. Por este motivo puede ser transmitido verticalmente vía ovas. Los estudios de factores que afectan la transmisión y los brotes de IPN indican que los iodóforos usados como desinfectantes durante procesos de fertilizaciones artificiales no erradican completamente la infectividad de IPNV (Anhe *et al.*, 1989). El virus también es transmitido horizontalmente, peces sobrevivientes a brotes de IPNV se transforman en vectores y pueden portar el virus todo el tiempo de vida (Hill, 1982; Wolf, 1988).

IPNV puede ser transmitido también por las fecas de aves piscívoras (McAllister y Owens, 1992).

### 1.1.10. Diagnósis

Los métodos estándar para la detección de los birnavirus acuáticos requieren de la inoculación de cultivos celulares (*in vitro*) con extractos crudos de tejido del pez (Bols, 1991; Mallipeddi *et al.*, 1990). Una vez que el virus ha sido aislado (Olesen *et al.*, 1988), es identificado mediante ensayos de neutralización de infectividad con antisueros monoclonales y policlonales (Kusuda *et al.*, 1993; Hedrick *et al.*, 1985; Nicholson, 1993). También es posible identificar un virus en particular al contar con anticuerpos específicos para proteínas codificadas por el genoma de dicho virus (Magyar y Dobos, 1994; Mundt *et al.*, 1995; Tarab *et al.*, 1993).

Recientemente se han descrito ensayos de reacción en cadena de polimerasa (PCR; Blake *et al.*, 1995; Shankar *et al.*, 1994), aplicables a la detección de birnavirus acuáticos, ya que el conocimiento de sus secuencias nucleotídicas ha permitido desarrollar iniciadores específicos que permiten identificar todos o la gran mayoría los serotipos de un grupo de virus que presentan grandes regiones genómicas conservadas (Blake *et al.*, 1995; Shankar *et al.*, 1994; Duncan y Dobos, 1986; ver Figura 6).

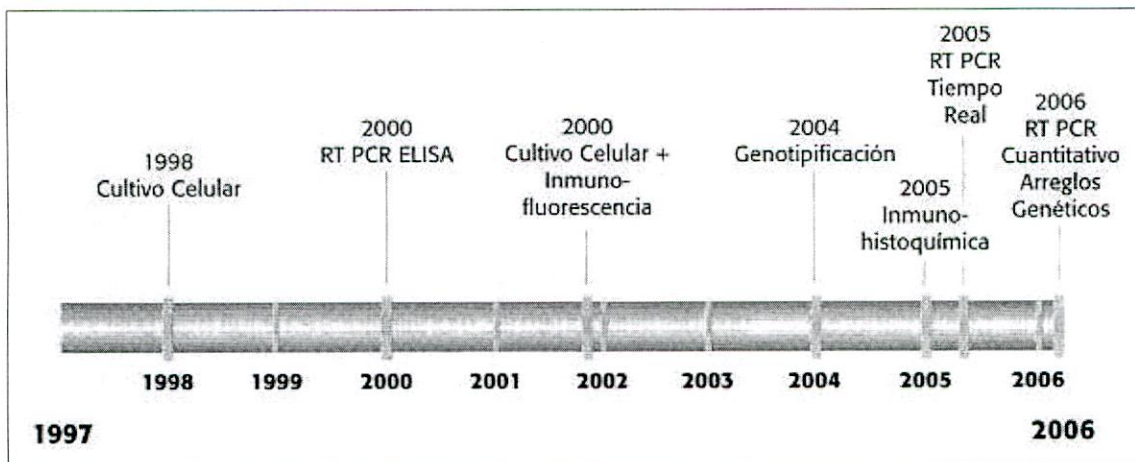


Figura 6. Técnicas de Diagnóstico para IPNV. Fuente: *Aquagestión S.A.*

### 1.1.11. Persistencia y estado vector

Por lo general, menos del 10% de las células sobreviven a las infecciones con aislados de IPNV muy virulentos (Hedrick *et al.*, 1978). Hedrick demostró que IPNV puede establecer una infección persistente en cultivo celular (Hedrick *et al.* 1978), y el título del virus en cultivos persistentemente infectados es de  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml, mientras que el título en una infección aguda / lítica es típicamente alrededor de  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml, dependiendo de la línea celular utilizada (Hedrick *et al.*, 1978).

Células persistentemente infectadas fueron creadas por aislamiento y crecimiento de células CHSE que sobrevivieron a una infección por virus IPN. Las células rescatadas tuvieron una infección no lítica con un rendimiento de virus en el sobrenadante de  $10^3$  –  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml, parecido a lo que se puede encontrar en una infección persistente *in vivo* (Bootland *et al.*, 1986). Es por esta razón que la población resistente a la infección queda infectada pero asintomática, distribuyendo la enfermedad horizontalmente.

La persistencia de las células infectadas implica la activación de mecanismos para suprimir una carga viral normal, manteniendo así el número de partículas de virus en baja proporción. Alternativamente, el virus podría haber adquirido una estrategia para mantener baja la tasa de replicación con el fin de escapar o reducir al mínimo las respuestas inmunes del anfitrión. (Inderjit *et al.*, 2010)

La hibridación substractiva realizada a cultivos persistentes con IPNV demostró una sobre regulación de genes implicados en la degradación de las proteínas virales y genes implicados en la inhibición de la traducción. Lo que se traduce empíricamente en una disminución en la carga de las partículas infectivas liberadas al medio (Inderjit *et al.*, 2010).

### 1.1.12. Situación Nacional

El virus del IPN es un problema para la salmicultura a nivel mundial y fue aislado en Chile el año 1984 (McAllister y Reyes, 1984; Espinoza *et al.*, 1985) después de numerosos brotes del virus en la etapa de agua de mar (Figura 7), especialmente en salmón Atlántico (*Salmo salar*); el patógeno pudo ser mitigado gracias a exitosos programas de vacunación intraperitoneal. La primera vacuna intraperitoneal contra IPNV fue comercializada por *Novartis Chile S.A.* en 1999, posteriormente se han desarrollado diferentes presentaciones de vacunas inactivadas o recombinantes, por parte de los grandes laboratorios farmacéuticos implicados en el área. No obstante

dicho avance, los peces más pequeños parecieran seguir desprotegidos, siendo justamente esa etapa donde la enfermedad aún causa bastante mortalidad.

En cuanto a su diseminación, la enfermedad se encuentra en la mayor parte de los lugares en que hay salmónidos nacionales y está presente en cerca del 80% de los peces que se cultivan en el país. Por otra parte, se estima que en la etapa previa a la vacunación, las pérdidas a nivel de la industria, deben llegar cerca del 15-20% (Constantino Siderakis, *Novartis Chile S.A.*). También existen aproximaciones respecto al alcance en agua dulce, que puede estar entre un 10-25% y en agua de mar entre un 2-10%, dependiendo de la virulencia que afecte al plantel (Samuel Valdevenito, G.G., *Veterquímica Ltda.*).

En cuanto a los montos invertidos por la industria para mitigar los efectos de esta enfermedad hay bastante más coincidencia entre los números, que corresponderían al costo de vacunas, *screening* y bioseguridad. La salmicultura nacional estaría destinando entre US\$ 10 – US\$ 12 millones anualmente por concepto de vacunas contra IPNV (Aqua, 2006). Con respecto a la inversión por concepto de *screening*, las opiniones son variadas y van desde los US\$ 250 mil hasta US\$ 1,2 millones. El desacuerdo probablemente tiene su origen en que no hay unanimidad acerca del número de reproductores existentes, la metodología utilizada, la cantidad de *pooles* y el valor de cada análisis.

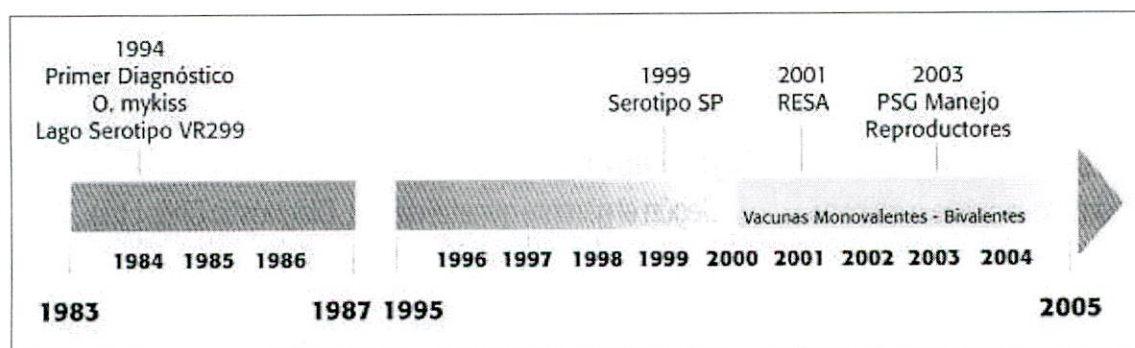


Figura 7. Hallazgos de IPNV en el tiempo. Fuente: *Aquagestión S.A.*

Varios especialistas coinciden en que considerando que la mayor mortalidad en agua dulce se presenta en aquellos peces que no pueden ser vacunados intraperitonealmente, las vacunas orales y por inmersión podrían ser la solución a la encrucijada que enfrentan los productores. Por otro lado, las acciones más significativas que se están realizando para prevenir IPNV son: uso de vacunas, inmuno estimulantes y aditivos en las dietas, así como el incremento en los niveles de bioseguridad en las compañías, los análisis de peces y los programas de *screening*.

Es importante notar que los antecedentes expuestos en la "situación nacional" corresponden a datos de empresas privadas, con lo que se presenta algún sesgo de la situación real; sin embargo, la información al respecto sólo fue encontrada en revistas del sector acuícola nacional (AquaNoticias).

## 1.2. PÉPTIDOS

Se considera péptido a secuencias menores de 100 aminoácidos. Los péptidos funcionan como neurotransmisores, neuromoduladores y hormonas en la transducción de señales mediada por receptores. Asimismo, más de 100 péptidos son reconocidos con funciones en el sistema nervioso central y periférico, en procesos inmunológicos, en el sistema cardiovascular y en el intestino. Además los péptidos influyen la comunicación célula-célula mediante su interacción con receptores y están incluidos de un gran número de procesos bioquímicos, como el metabolismo, dolor, reproducción y respuesta inmune (Sewald y Jukubke, 2002).

El aumento en el conocimiento del modo de acción de péptidos bioactivos ha incrementado el interés de la farmacología, la ciencia médica y la biotecnología por este tipo de compuestos. El aislamiento y aplicación dirigida de este tipo de sustancias endógenas como drogas potenciales, ha ganado importancia, principalmente para el tratamiento de procesos patológicos. Es por esto que nuevos métodos basados en péptidos para una serie de enfermedades, donde estos péptidos jueguen un rol funcional, podrán servir de herramienta para el desarrollo de nuevas terapias.

En los últimos 20 años, se han diseñado péptidos como herramienta innovadora y curativa para diferentes enfermedades de humanos (Patarroyo M.E. *et al.*, 1988) y de animales (Patarroyo J.H. *et al.*, 2002). presentándose como una alternativa real en el tratamiento de diversas enfermedades, como es el caso del síndrome de la inmunodeficiencia humana VIH, el virus de la hepatitis C, la influenza, el rotavirus y el alzheimer, entre otros.

Los péptidos antimicrobianos catiónicos son generalmente definidos como de menos de 50 residuos de aminoácidos con una carga promedio positiva, conferida por la presencia de múltiples residuos de lisinas y argininas, y una sustancial proporción (50%) de residuos hidrofóbicos, principalmente de los grupos hidrofóbicos de las cadenas laterales, como prolina, fenilalanina y triptófano. Estos péptidos pueden poseer actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas,

hongos (Mohammad *et al.*, 1995) y protozoos (Aley *et al.*, 1994) y exhiben concentraciones inhibitorias mínimas a 0,25-4 microgramos/ml (Hancock and Lehrer, 1998). Ciertamente los péptidos catiónicos han demostrado inhibir la replicación de virus envueltos, como influenza A virus (Murakami *et al.*, 1991), el virus de la estomatitis vesicular virus (VSV) y el virus de la inmunodeficiencia (HIV-1) (Masuda *et al.*, 1992). Los péptidos catiónicos pueden poseer actividad anticáncer (Johnstone *et al.*, 2000) o promover la cicatrización de heridas (Gallo *et al.*, 1994). Estudios recientes han indicado también a péptidos catiónicos con el rol de efectores en la respuesta inmune innata. Estas son propiedades que hacen a los péptidos catiónicos como excelentes candidatos para agentes terapéuticos.

Interesantemente, los péptidos cortos catiónicos caen en el emergente campo de péptidos que penetran células (CPP). Estos péptidos consisten en pequeñas secuencias de aminoácidos que contienen una gran carga positiva neta que hacen posible la penetración de casi cualquier célula, acarreado inclusive grandes proteínas, o oligonucleótidos y drogas (Jarver y Langel, 2006). Desde hace ya 10 años de su descubrimiento, la forma de cómo ellos manejan la translocación a través de la membrana aún no es resuelta. Recientemente ha sido descubierta la posibilidad de una vía independiente de energía que traspasa los conceptos fundamentales asociados con las interacciones con proteínas de membrana (Herce y García, 2007).

Hace una década fue reconocida por primera vez que la proteína recombinante TAT de HIV-1 es tomada por las células (Frankel y Pabo, 1988) y unos pocos años después la secuencia mínima responsable de la entrada a las células se redujo a 11 aminoácidos (YGRKKRRQRRR) (Vives *et al.*, 1997). Durante el mismo período, fue encontrada otro fragmento derivado de la *Drosophila Antennapedia* homeodomain (RQIKIWFQNRRMKWKK), también llamada penetratina, con propiedades similares (Derossi *et al.*, 1996). Estos dos descubrimientos han estimulado nuevas investigaciones que llevaron a concluir acerca de esta familia de péptidos. Diez años han pasado desde entonces y varios otros CCP han sido descubiertos, algunos de ocurrencia natural, como la penetratina, y otros péptidos sintéticos como "transportan". El denominador común para todos estos péptidos ha sido el número significativo de aminoácidos como arginina y lisina (Futaki *et al.*, 2001; Futaki *et al.*, 2002).

El parecido entre los CPP y los péptidos antimicrobianos es muy fuerte. De hecho, los péptidos antimicrobianos son también cargados y pueden utilizar mecanismos similares para la formación de poros.

### 1.2.1. Síntesis de péptidos en fase sólida

La síntesis de péptidos en fase sólida (*solid phase peptide synthesis*, SPPS), descrita inicialmente por Merrifield (1963), es la mejor tecnología y más madura para la síntesis de péptidos de pequeño a mediano tamaño (Guzmán *et al.*, 2007). La SPPS consiste en la elongación de la cadena peptídica unida a una matriz sólida por la adición sucesiva de amino ácidos que son unidos en el enlace amida (péptido), entre el grupo carboxil del amino ácido entrante y el grupo amino del amino ácido previamente unido a la matriz, hasta que el péptido de secuencia y largo deseado haya sido sintetizado (Nilsson *et al.*, 2005).

La SPPS ha sido llevada a cabo bajo dos grandes esquemas de protección, que son conocidos como las estrategias Boc/Bzl y Fmoc/tBu (Chan y White, 2000). En la estrategia Boc/Bzl el grupo Boc (tert-butoxicarbonilo) es usado para la protección del grupo amino  $N\alpha$  y benzilo o clorhexilo para la cadena lateral de varios amino ácidos (Albericio, 2000). Las variables más relevantes en la SPPS, tanto en la estrategia de síntesis (Fmoc o t-Boc) son: la naturaleza del carrier sólido, los agentes acoplantes y los procedimientos de clivaje del péptido a la matriz sólida.

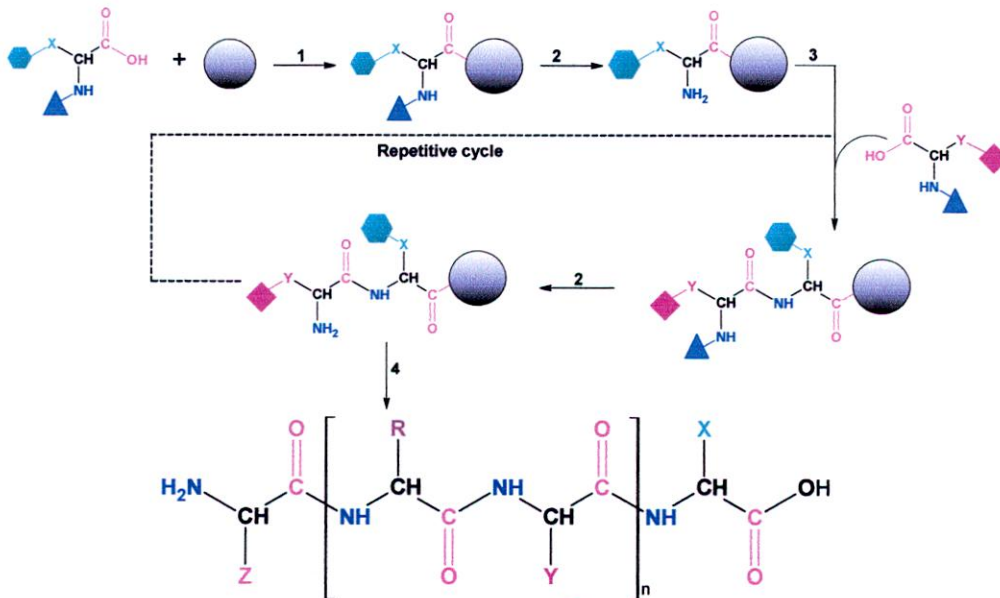
La SPPS puede ser realizada de diferentes maneras: existen metodologías manuales y automatizadas disponibles para pequeña y mediana escala de síntesis de sólo un péptido o de varios péptidos al mismo tiempo (síntesis múltiple de péptidos). Todas las operaciones en la SPPS, llámese acoplamiento, desprotección y remoción de la matriz, se realizan en el mismo recipiente donde múltiples pasos de lavado son llevados a cabo. A pequeña escala, los reactivos son usados en excesos para aumentar la velocidad de reacción y se complete en menos tiempo; a gran escala, estos excesos son optimizados en términos de costos.

La síntesis manual de péptidos individuales puede ser realizada en jeringas de diferentes tamaños proveídas con un filtro en la parte inferior. La síntesis múltiple a nivel micromolar puede ser realizada en celulosa funcionalizada, polipropileno o membranas de polivinilideno difluorido (PVDF) de acuerdo a la metodología de "spots" desarrollada por Frank (2002). La síntesis múltiple de péptidos Fmoc/tBu y tBoc/Bzl hasta nivel milimolar puede ser realizada usando la metodología de bolsitas tipo de té (tea-bag) desarrollada por Houghten (1985), en la cual hasta 400 péptidos de 20 amino ácidos o menos, pueden ser sintetizados al mismo tiempo. El sistema de bolsitas para la síntesis química en fase sólida ha sido exitosamente empleada para la construcción de librerías de péptidos (Houghten *et al.*, 2000). Sin embargo éste

sistema es apropiado para la síntesis a pequeña escala y para familias de péptidos como el Scan-Ala.

La determinación de la estructura de un péptido puede ser realizada por dicroísmo circular (CD) (Brahms y Brahms, 1980) y resonancia magnética nuclear (NMR) (Rance *et al.*, 1983). La determinación de la estructura secundaria por CD puede ser hecha con sólo 200 microgramos de péptido en una celda de 0,1 ml. El análisis determinará si el péptido tiene estructura secundaria y si la estructura es  $\alpha$ -hélice (un máximo a 193nm y dos mínimos a 208 y 222nm), o hoja- $\beta$  (un máximo a 198nm y un mínimo a 217nm). Si el péptido no tiene estructura secundaria, sólo un máximo se obtendrá a los 211nm. Otras estructuras relevantes en péptidos son las  $\beta$ -turns, las que pueden dar que no tienen estructura, sin embargo tienen un espectro similar a los péptidos sin estructura (Guzmán *et al.*, 2002).

En la figura 8 se puede observar el esquema de síntesis empleado en fase sólida.



**Figura 8:** Esquema de síntesis en fase sólida. ●: resina, ▲: Na grupo protector en extremo amino, ●◆ grupos protectores del extremo de la cadena. 1: Pegado del primer residuo; 2: desprotección del grupo amino; 3: pegado del siguiente residuo (ciclo repetitivo); 4: clivaje y desprotección de la cadena.

### 1.3 POLISOMAS

Hasta el año 1962 se creía que las proteínas eran sintetizadas por un ribosoma libre. La realidad fue descubierta por Rich y coautores los que mostraron que polipéptidos son hechos por un grupo de ribosomas, llamados polirribosomas o polisomas. El polisoma es un complejo compuesto de un variable número de ribosomas individuales, a los cuales podemos llamarles monosomas, los cuales permanecen unidos a una cadena de RNA mensajero, éste perfil de polisomas puede ser afectado exponiendo a las células a análogos de amino ácidos (Thomas y Mathews, 1984).

Da Costa y Herculano (1997), utilizando el fraccionamiento de polisomas durante condiciones de estrés pudieron caracterizar el nivel de inhibición proteica en Mayaro virus bajo esas condiciones, un virus de RNA de hebra simple y cápside icosaédrica similar a IPNV.

Con una gradiente de sacarosa podemos separar las fracciones polisomales a diferentes tiempos post infección y describir el perfil de transcripción, analizando el RNA de cada fracción polisomal, asimismo podemos analizar una parte de cada fracción para analizar la traducción centrándonos en la generación de la proteína *target* mediante *western blott*.

#### 1.4. Péptidos inhibidores de IPNV

Estudios anteriores han demostrado la eficacia del uso de péptidos sintéticos en el control de ciertas enfermedades virales. En nuestro país el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) se ha convertido en un fastidioso patógeno que afecta año a año gravemente la industria salmonera. Por este motivo es de suma urgencia encontrar un método efectivo para su control. El presente proyecto de tesis se basa en la utilización de péptidos sintetizados químicamente con el fin de inhibir el ensamblaje y/o atenuar la infectividad de IPNV en un modelo *in vitro*.

La estrategia para el diseño y modelamiento de los péptidos contra IPNV contempló el uso de técnicas bioinformáticas. Para ello se tomó como patrón los modelos estructurales de VP2 existentes de los Birnavirus, y se usaron dos criterios de diseño: Péptidos que puedan actuar tanto en el procesamiento de VP2 para el ensamblaje del virus, como la zona de interacción entre VP2s que generarán las triadas que conformarán la estructura de la cápside, de manera que no se permita el ensamblaje de la partícula viral.

Para el desarrollo de la investigación se cuenta con la experiencia de los miembros del laboratorio en la síntesis de péptidos y modelación por bioinformática, cultivo celular, técnicas de biología molecular, y virología para tratar de dilucidar los resultados obtenidos y el alcance de aquellos.

Para demostrar la efectiva entrada de los péptidos a la línea celular, se marcarán los péptidos con rodamina, y se evaluará vía microscopía de fluorescencia, el ingreso de los péptidos a las células. Subsecuentemente se evaluará la capacidad citotóxica de los péptidos mediante azul tripán y MTT. Junto a esto, se determinará la capacidad de expresión del virus mediante un análisis cuantitativo utilizando la técnica de "transcripción reversa PCR tiempo real". Para obtener resultados cuantitativos en la inhibición de la infectividad y calcular los títulos de las partículas virales en ambos modelos de infección se realizará inmunofluorescencia semicuantitativa.

Sumado a esto, se evaluará mediante gradientes continuos de velocidad en sacarosa, el perfil o distribución polisomal de los cultivos infectados con IPNV sujetos al péptido y sin el péptido.

Se espera que alguno de los péptidos diseñados tengan actividad interferente frente a la infección por IPNV, los que servirán de producto base para la generación de un nuevo producto profiláctico para la industria salmonera.

## **2. HIPÓTESIS**

Péptidos sintéticos diseñados para interferir con el proceso de ensamblaje viral inhiben la producción de IPN *in vitro*.

## **3. OBJETIVOS**

### **3. 1. OBJETIVO GENERAL**

Establecer las bases de una alternativa profiláctica para controlar la infectividad y persistencia de IPNV *in vitro* mediante la obtención de péptidos sintéticos interferentes.

### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Diseñar y sintetizar péptidos de secuencias seleccionadas para interferir con la expresión intracelular del virus.
- 2.- Evaluar la incorporación de los péptidos sintéticos previamente seleccionados a células de peces cultivadas *in vitro*.
- 3.- Establecer el potencial citotóxico de los péptidos sintéticos seleccionados.
- 4.- Definir las condiciones de infección que permitan evaluar la acción de los péptidos seleccionados.
- 5.-Evaluar la capacidad interferente de los péptidos seleccionados en células infectadas *de novo*.
- 6.- Evaluar la capacidad interferente de los péptidos seleccionados en células persistentemente infectadas.

#### **4. Modelos de infección para evaluación de los péptidos**

Para evaluar el potencial interferente de los péptidos y cumplir con los objetivos propuestos se definieron dos modelos alternativos de infección.

**Modelo 1: Línea celular persistentemente infectada CHSE-214 (LCPI).** Células aparentemente sanas, sin embargo, producen bajas cantidades de virus infectivos en el medio de cultivo. Presupone un control estricto de la expresión global del virus dado que no presenta efecto citopático detectable. Se traspasan normalmente sin perder su condición infectiva.

**Modelo 2: Células CHSE-214 limpias, infectadas de novo (LCIdN).** Esta es una infección regular, que gracias a un virus infectivo genera un efecto citopático máximo. Es decir, producción masiva de partículas virales al medio producto de lisis celular.

## 5. PLAN DE TRABAJO

### Actividades

#### Objetivo 1

- Análisis de secuencias nucleotídicas y proteicas de IPNV serotipo Sp.
- Modelamiento de péptidos con potencial inhibitorio contra IPNV.
- Síntesis química de péptidos.
- Purificación de péptidos por RP-HPLC.
- Caracterización de péptidos sintetizados por espectrometría de masas MALDI-TOF.
- Determinación de estructura secundaria de los péptidos por Dicroísmo Circular.  
Hito: Péptidos interferentes sintetizados y caracterizados.

#### Objetivo 2

- Marcación de péptidos con moléculas fluorescentes.
- Evaluación de la incorporación de los péptidos a las células, mediante microscopía de fluorescencia.  
Hito: Péptidos interferentes incorporados.

#### Objetivo 3

- Determinación de la viabilidad celular a diferentes concentraciones de péptidos (0,1;1;10 y 100  $\mu\text{M}$ ) con la tinción vital Tripan Blue.  
Hito: Concentración no tóxica de péptidos definida.

#### Objetivo 4

- Propagar Línea Celular CHSE-214.
  - Aislamiento preparativo de IPNV.
  - Titulación de IPNV.
  - Ensayos de multiplicidad de infección MOI (0,1;1;10 y 100), el modelo de **infección *de novo***:
    - Cuantificación de transcritos blanco (VP1 y VP2) de IPNV mediante RT-PCR tiempo real.
    - Normalización frente a un *house keeping gene* (Factor de Elongación Proteica).
    - Caracterización de polisomas virales y la síntesis *de novo* de proteínas blanco VP1 y VP2, vía mRNAs.
      - a) Gradiente de Sacarosa fraccionada.
      - b) RT-PCR-tiempo real.
      - c) Western-Blott.
  - Titulación de progenie viral.
  - Cuantificar transcritos de VP2, mediante RT-PCR tiempo real, cinéticas en modelo de infección persistente y *de novo*.
- Hito: Modelo y Cinética de infección definida.

#### Objetivo 5

- Evaluación del potencial interferente de los péptidos sintéticos en la **infección productiva**, mediante:
  - Cuantificación de transcritos blanco (VP1 y VP2) de IPNV por RT-PCR tiempo real.
  - Normalización frente a un *house keeping gene* (Factor de Elongación Proteica).
  - Caracterización de polisomas virales y la síntesis *de novo* de proteínas blanco VP1 y VP2, vía mRNAs:
    - a) Gradiente de Sacarosa fraccionada.
    - b) RT-PCR-tiempo real.
    - c) Western-Blott.

Hito: Péptidos evaluados en células infectadas *de novo*.

## Objetivo 6

- Evaluar la capacidad interferente de los péptidos en la **línea celular persistentemente infectada** mediante:
  - Cuantificación de transcritos blanco (VP1 y VP2) de IPNV por RT-PCR tiempo real.
  - Normalización frente a un *house keeping gene* ( Factor de Elongación Proteica).
  - Caracterización de polisomas virales y la síntesis *de novo* de proteínas blanco VP1 y VP2, vía mRNAs:
    - a) Gradiente de Sacarosa fraccionada.
    - b) RT-PCR-tiempo real.
    - c) Western-Blott.

Hito: Péptidos evaluados en células persistentemente infectadas.

- Selección de los péptidos con mayor actividad inhibitoria.  
Hito: Péptidos seleccionados.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. MATERIALES

#### Reactivos Síntesis de péptidos en Fase sólida

- Resina 4-(2',4'-Dimetoxifenil-Fmoc-aminometil-fenoxi (AMIDA RINK).
- Diclorometano, (DCM).
- Piperidina 20% en DMF.
- Hidroxibenzotriazol, (HOBt).
- Tetrafluoroborato O-benzotiazol-il-N,N,N',N',tetrametiluronium (TBTU).
- N,N-diisopropiletilamina, (DIEA)100%.
- Dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida.
- Pentóxido de fósforo.
- Triton X 100.
- 2-Propanol o isopropanol.

#### Aminoácidos

- N-Fmoc- L- Alanina H<sub>2</sub>O.
- N-Fmoc- L- Arginina (pbf).
- N-Fmoc-L- Asparagina (trt).
- N-Fmoc -L- Ac. Aspártico (O-Tbu).
- N-Fmoc -L-Cisteína (Trt).
- N-Fmoc -L- Fenilalanina.
- N-Fmoc Glicina.
- N-Fmoc- L- Ac. Glutámico (Otbu).
- N-Fmoc- L-Glutamina (Trt).
- N-Fmoc - L-Histidina (Trt).
- N-Fmoc - L-Histidina (Boc).
- N-Fmoc - L-Isoleucina.
- N-Fmoc - L-Leucina.
- N-Fmoc - L-Lisina (Boc).
- N-Fmoc - L-Metionina.
- N-Fmoc - L-Prolina H<sub>2</sub>O.

- N-Fmoc - L-Serina (Tbu).
- N-Fmoc - L-Tirosina (Tbu).
- N-Fmoc - L-Treonina (Tbu).
- N-Fmoc - L-Triptófano (Boc).
- N-Fmoc - L-Valina.

### **Material Biológico**

Se cuenta con la línea celular proveniente de células embrionarias de Salmón Chinook, CHSE-214, obtenidas de ATCC (American Type culture collection), EEUU.

Se obtuvo la línea CHSE-214-persistentemente infectada con IPNV, con el Dr. Oystein Evensen (*Norwegian School of Veterinary Science*).

El virus, cepa NVI015 (TT) fue suministrado gentilmente por el Dr. Oystein Evensen, Oslo, Noruega.

El virus, cepa VR-299 fue suministrado por el laboratorio ADL Diagnostic, X Región.

### **Medios de Cultivo**

- Medio mínimo esencial Eagle (MEM) (Sigma Chemical Co).
- Medio MEM Eagles deficiente.
- Medio L15 (Sigma Aldrich).
- Suero fetal bovino (Bio-Whittaker).
- L-glutamina (Sigma Aldrich).
- Gentamicina (Bio-Whittaker).

### **Materiales Electroforesis Geles**

- Acrilamida (Merck).
- N,N'-metilen-bis acrilamida.
- N,N,N',N-tetrametilendiamida (TEMED) (SERVA).
- Persulfato de Amonio (Sigma).
- n-butanol (Merck).

## Soluciones

Acrilamida/Bisacrilamida:

- Acrilamida 30%(P/V)
- Bisacrilamida 0,8%(P/V)
- Persulfato de amonio 10%(P/V)

## Colorantes reactivos y estándares para geles

- Agarosa
- Ácido acético glacial (Merck)
- Azul coomassie (Merck)
- Metanol (Merck)
- Kit de marcadores de peso molecular (Sigma Chemical Co.)
- Bromuro de Etidio
- Gel Red

## Tampones

Tampón corrida (pH 8,8)

- Trizma HCl 0,02M (Sigma Chemical Co.)
- Glicina 0,192M (Sigma Chemical Co.)
- Duodecilsulfato de sodio (SDS) 0,1% (Sigma Chemical Co.)

Tampón Ruptura (ESB 2X)

- Trizma HCl 0,04M pH 6,8 (Sigma Chemical Co.)
- SDS 2% (p/V) (Sigma Chemical Co.)
- Glicerol 20% (v/v) (Merck)
- 2-mercaptoetanol 4% (v/v) (Sigma Chemical Co.)
- Azul de Bromofenol 0,002% (p/v) (Merck)

Tampón para Gel de Separación

- Trizma HCl 1,5M pH 8,8 (Sigma Chemical Co.)
- SDS 0,4% (p/v) (Sigma Chemical Co.)

#### Tampón para Gel de Concentración

- Trizma HCl 0,5M pH 6,8 (Sigma Chemical Co.)
- SDS 0,4% (p/v) (Sigma Chemical Co.)

#### Tampón Fosfato salino (PBS) pH 7,5 y 5,5

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM (Merck, Darmstadt, Alemania)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM (Merck, Darmstadt, Alemania)
- KCl 2,68 mM (Merck, Darmstadt, Alemania)
- NaCl 0,137 mM (Merck, Darmstadt, Alemania)

#### Tampón TNE pH 7,3

- Trizma base 10 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)
- Ácido tetracético etilendiamina (EDTA) 1 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)
- NaCl 100 mM (Merck, Darmstadt, Alemania)

#### Tampón X pH 7,4

- HEPES 10 mM
- MgCl<sub>2</sub> 5 mM
- KCl 100 mM

#### **Purificación del Virus**

- Buffer TNE pH 7,3
- Agua DEPC
- Sacarosa (Merck, Darmstadt, Alemania)

#### **Extracción de RNA viral**

- Trizol (Invitrogen)
- Agua Libre de Nucleasas
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol 100%, 75% en agua destilada y filtrada 0,2um.
- Qiagen RNAeasy viral kit: Etanol 100%

## **Transcripción reversa**

- La generación de cDNA a partir del RNA viral se llevó a cabo con el kit de Stratagene, AffinityScript QPCR cDNA
- cDNA Synthesis Master Mix: un buffer que es específicamente optimizado para un rendimiento QRT PCR, lo que permite un protocolo rápido y la reducción de la variabilidad en las mediciones de CT entre las reacciones. Además del buffer optimizado, la mezcla maestra contiene MgCl<sub>2</sub> y dNTPs.
- AffinityScript RT/ RNase Block Enzyme Mixture: Es un mix de una versión mejorada por ingeniería genética de la transcriptasa reversa del Virus Murino de Leucemia (RT-MMLV), que es altamente termoestable.
- Random primers.
- RNase-free H<sub>2</sub>O.

## **Reacción de polimerización en cadena tiempo real (PCR real time)**

- Se utilizó el kit para tiempo real Statagene, Brilliant® II SYBR® Green QPCR. Kit
- La mezcla Brilliant II Master es ideal para la cuantificación de cDNA en un RT PCR de 2 pasos para ser usado en combinación con AffinityScript™ QPCR Kit de Síntesis de cDNA.
- Brilliant II SYBR Green QPCR master mix: incluye SureStart® Taq DNA polymerase y MgCl<sub>2</sub> en concentraciones optimas.
- Partidores de avance retroceso específicos VP1, VP2, ELF1α
- Agua libre de nucleasas.
- Primers específicos, VP1, VP2 y ELF 1 α
- Tampón de qPCR Platinum® SyBR® (Invitrogen).
- Agua destilada estéril.

## **RT- PCR tiempo real en un paso**

- Para optimizar el tiempo de análisis y disminuir el ruido producido por exceso de procedimientos a seguir, la RT-PCR puede ser realizada en solo un paso, agregando a la reacción la enzima retro-transcriptasa. Se utilizaron 2 kits de diferentes proveedores:
- Stratagene con el kit: Brilliant® II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix Kit, 1-Step.

- Invitrogen con el kit: EXPRESS One-Step SuperScript® qRT-PCR Kits.
- Ambos kits constan de un master mix que posee la taq polimerasa, los buffers y las sales en concentraciones óptimas, así como también cuentan con la retro transcriptasa.

#### **Reactivos Varios**

- Ácido trifluoroacético (TFA)
- Agar (Merck)
- Cristal Violeta 0,5% (p/v) (Merck)
- Solución de formaldehído 37% (Merck)
- 3,3'-diaminobenzidina tetrahydroclorido DAB (Pierce, Rockford, IL, USA)
- H<sub>2</sub>O tratada con Dietil pirocarbonato (agua DEPC).

## 6.2. MÉTODOS

### 6.2.1. Síntesis de Péptidos en Fase Sólida

La síntesis se llevó a cabo utilizando la síntesis simultánea de péptidos para la cual se utiliza un programa que permite identificar cada secuencia con un número, y distribuye la síntesis paso a paso según la secuencia:

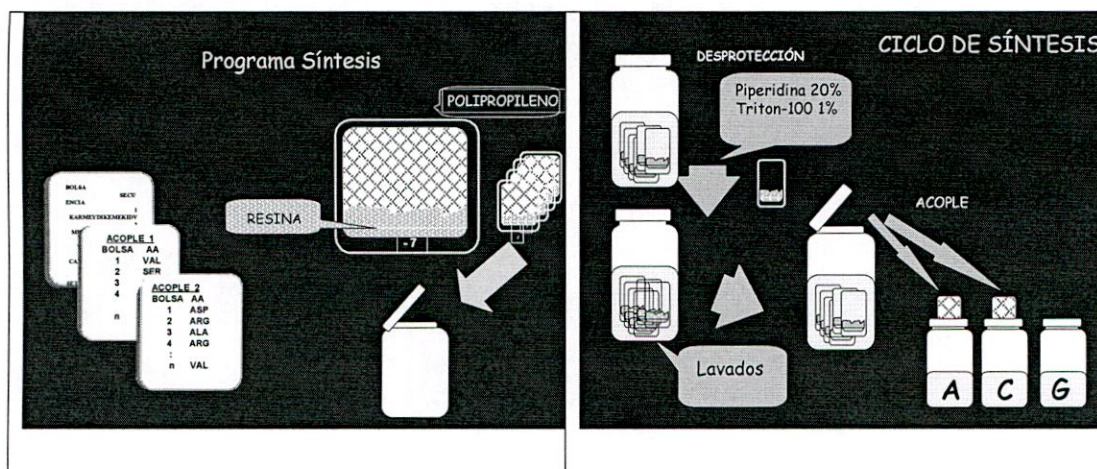


Figura 9. Esquema del programa y proceso de síntesis simultánea.

El proceso de síntesis de péptidos según la estrategia F-moc se detalla a continuación:

Cada adición de aminoácido presenta el mismo ciclo:

- Desprotección del grupo F-moc (piperidina 20% en DMF).
- Lavados con DMF (5x1 minuto).
- Reacción de acople (Aminoácido: Activador\*: HOBT: DIEA) (3:3:3:8).  
\* Se utiliza una batería de activadores según la secuencia a sintetizar  
ej: DIPCD;TBTU HBTU.
- Agitación durante mínimo las 3 horas.
- Realización de un test de ninhidrina o test de Kaiser (Kaiser *et al.*, 1970) para comprobar la presencia de grupos amino libres (en el caso de bolsas Azul de bromofenol).
- Clivaje de péptidos : Una vez terminada la síntesis se seca la resina y se realiza la desprotección con Mezcla B (TFA:TIS:H2O:etanoditiol) (92.5:2.5:2.5:2.5) si tiene o no los aminoácidos triptofano (W), metionina (M) o cisteina (C) la mezcla A (TFA:TIS:H2O) (95:2.5:2.5) si no tiene los anteriores aminoácidos .

La reacción de desprotección se deja por 2 horas y luego el péptido se precipita con eter frío, y se lava 5 veces; una vez que se seca el péptido, se disuelve en agua MiliQ. Se congela y se liofiliza.

### **6.2.2. Caracterización mediante HPLC en fase reversa y espectrometría de masas MALDI-TOF.**

Como paso preliminar a la caracterización y purificación, los péptidos fueron desalinizados en columnas de 20 cm. x 0,5 cm. empacadas con Sephadex G-10 (Sigma-Aldrich), las cuales se hidrataron 30 minutos con agua destilada y posteriormente el péptido fue eluído con agua MiliQ. Finalmente, las soluciones fueron congeladas a -70°C y liofilizadas.

Previo a la purificación, se realizó la caracterización de los péptidos crudos en un cromatógrafo Jasco con detector UV-2075 Plus, con una columna analítica Atlantis® C18 utilizando un gradiente de 0 – 70% de acetonitrilo en 30 minutos y detección a 220 nm.

Finalmente, se determinó las masas de los diferentes péptidos sintetizados en un espectrómetro de masas Proteomics Analyzer 4700 (Applied Biosystems) serie MALDI-TOF en la Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Santiago. Las matrices utilizadas fueron:  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (ACH) y ácido 2,5- dihidroxibenzóico (DHB). La matriz se preparó a una concentración saturada de 10 mg/mL en acetonitrilo/ácido fórmico 1:1 (v/v).

### **6.2.3. Determinación de estructura secundaria mediante dicroísmo circular.**

Los espectros de dicroísmo circular de los péptidos sintetizados fueron realizados en un espectropolarímetro J-810 (Jasco Corporation) en el Parc Científic, Universidad de Barcelona, España, usando cubetas de cuarzo cilíndricas de 1 mm (Hellma). Cada uno de los péptidos fue disuelto en agua MiliQ a una concentración de 1 mM y la estructura secundaria fue estabilizada con TFE a una concentración final de 12,5% (v/v) a pH 7. Los espectros fueron registrados en el intervalo de longitudes de onda entre 195 a 260 nm a 25 °C. La corrección de la línea base y el análisis de los resultados se realizó con el programa Spectra Manager, Versión 1.53.04 (Jasco Corporation).

#### **6.2.4. Cultivos Celulares**

La línea celular utilizada proviene de células epiteliales obtenidas de embriones de *Oncorhynchus tshawytscha* (Salmón Chinook), denominada CHSE-214 (Fryer, 1965; Wolf y Mann, 1980).

Los cultivos se realizaron en botellas plásticas de cultivo celular de 25 y 75 cm<sup>2</sup> de superficie (Orange™), microplacas de 6 y 24 pocillos, a una temperatura de 17°C con medio mínimo esencial Eagle (MEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SBF) como medio de crecimiento y suplementado con 2% de SBF como medio de mantención y para evitar la contaminación bacteriana se empleó Gentamicina 50 mg/L.

#### **6.2.5. Línea celular persistentemente infectada**

Se utilizó una línea celular CHSE-214, superviviente a un proceso de infección con IPNV NVI015 y las células sobrevivientes (un 10%) fueron traspasadas por más de 60 veces en el Laboratorio de Medicina Acuática de la Escuela de Veterinaria de Noruega, y gentilmente cedida por el Profesor Dr. Øystein Evensen.

Las células CHSE-214 persistentemente infectadas fueron crecidas en medio L15, suplementado con 5% de suero fetal bovino, 200mM de L-glutamina y 50ug/ml gentamicina. (Inderjit *et al.*, 2010)

#### **6.2.6. Obtención y purificación del virus**

La suspensión viral se obtuvo tras la infección con IPNV monocapas confluentes de células CHSE-214, contenidas en botellas de 75 cm<sup>2</sup> de superficie, a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 unidades focales fluorescentes (FF/cel) cultivadas en medio mínimo esencial (MEM), complementado con 2% de suero fetal bovino (FBS) y sin antibiótico. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 20°C por 5 a 7 días, tiempo suficiente para observar un efecto citopático máximo.

El virus fue alicuotado en tubo de 1,5ml y mantenidos a 4°C hasta su posterior uso. En el caso de las células persistentes, debido al bajo título viral obtenido fue necesario concentrar. Para precipitar el virus se utilizó un método modificado por Romero (2009) según se detalla a continuación: la suspensión viral fue sometida a centrifugación a 16.000 g durante 30 minutos para separar los restos celulares y el sobrenadante;

posteriormente fue sometido a una ultracentrifugación a 100.000 g durante 2 horas a 4°C (Ultracentrífuga Sorval Thermo), el pellet fue resuspendido en 100uL de agua tratada con Dietil pirocarbonato (agua DEPC), y mantenido a 4°C hasta su uso.

### 6.2.7. Titulación Viral, inmunofluorescencia

Para cuantificar el virus IPN se utilizó el ensayo de placas infectivas o plaqueo (Luria, 1978), modificado con la técnica de inmunofluorescencia de Espinoza *et al.* (2000). En este ensayo, se incuban monocapas confluentes de células CHSE-214, en placas de cultivo celular de 24 pocillos, junto con 50uL de diluciones seriadas de virus IPN ( $1 \times 10^{-1}$  –  $1 \times 10^{-9}$ ). Las diluciones se preparan en MEM. Luego de 1 hora de absorción a 20°C, se retira el inóculo y las placas se cubren con MEM 2% SFB.

Las placas posteriormente son incubadas a 18°C por un período de entre 16-18 horas post infección y luego de retirar el sobrenadante, fijadas con una solución metanol:acetona (3:1) frío ( $\leq 0^{\circ}\text{C}$ ) e incubadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por un período de 30 minutos; posteriormente se retira el fijador y se lava una vez con PBS 1X.

Seguidamente se agrega el primer anticuerpo anti VP2-VP3 de IPNV (IPNV Fluorotest, BiosChile) a una dilución de 1:80 en un volumen de 80uL y se incuba en oscuridad a 15°C por 45 minutos. Posteriormente se lava 4 veces con PBS y se agrega el segundo anticuerpo unido a FITC, a una dilución de 1:80 y a un volumen de 80uL, para ser incubado por 45 minutos a 15°C en oscuridad. Finalmente las monocapas son cuidadosamente lavadas con PBS 1X cuatro veces y son dejadas con 200uL para su conteo en microscopio de fluorescencia invertido.

Se calcula posteriormente el título viral expresado en unidades fluorescentes por campo, obteniendo un valor en mL.

La ecuación utilizada es la siguiente:

$\text{n}^{\circ} \text{ de partículas virales / ml} = \text{n}^{\circ} \text{ de conteos promedio} / \text{dilución} * \text{volumen de inóculo viral.}$

### 6.2.8. Electroforesis Monodimensional en geles de Poliacrilamida en presencia de Sodio Dodecilsulfato Sódico (SDS)-Page

Las proteínas virales se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida según el método descrito por Laemmli (1970), en síntesis:

- Preparación de las placas de vidrio que sirven de soporte del gel.
- Preparación del gel de separación.
- Introducción del gel de separación a las placas.
- Una vez gelificado el gel de separación, se llena con el gel de concentración e introducción del separador de muestras mientras el gel concentrador aún se encuentra en fase líquida.
- Introducción de las muestras de proteínas previamente preparadas en tampón de ruptura y hervidas durante 5 minutos en las ranuras dejadas por el separador de muestras.
- Llenado de la cámara con tampón y conexión del sistema a la fuente de poder. Aplicación de una corriente eléctrica de 25 mA durante 2 a 3 horas.
- Fijación y tinción del gel

#### Visualización de las Bandas Proteicas

Tinción con Azul Brillante de Coomassie R-250.

Luego de fijar el gel con metanol-ácido acético (40%: 7%) durante 1-2 horas, se coloca en la solución del colorante azul de Coomassie a temperatura ambiente durante 1-2 horas con agitación continua; transcurrido este tiempo se procede a desteñir con metanol-ácido acético (30%: 7% v/v).

Solución Colorante: 0,2% p/v Coomassie Blue

50% v/v metanol

7% v/v ácido acético.

### 6.2.9. Diseño de Cebadores

Para diseñar los partidores para detectar IPNV se utilizará la secuencia específica del aislado a utilizar (VR-299 y NVI015). Además es necesario utilizar un “*house keeping gene*” que en este caso será el Factor de elongación Proteica 1 $\alpha$  (ELF-1  $\alpha$ ) proveniente de Salmón Chinook.

Los cebadores serán diseñados con el programa Primer 3. Los cebadores serán sintetizados por Invitrogen (CA, EEUU). A continuación se muestra la tabla con los partidores utilizados en el siguiente trabajo:

**Tabla 6.1. : Partidores utilizados en RT-PCR tiempo real**

Gen	Amplicón (p.b.)	Primer	Secuencia 5'-3'	E
VP1 IPNV <sup>(a)</sup>	507	LVP1 501 RVP1 1014	CTG GTC CAG AAA CCC TAA GAC GTG TGT ATC TCT CCC CTT TTG G	1,98
VP2 IPNV <sup>(a)</sup>	213	VP2SNP-F VP2SNP-R	CAA CAG GGT TCG ACA AAC CAT AC TTG ACG ATG TCG GCG TTT C	1,95
ELF 1 $\alpha$ <sup>(B)</sup>	57	ELF1 $\alpha$ -F ELF1 $\alpha$ R	CCC CTC CAG GAC GTT TAC AAA CAC ACG GCC CAC AGG TAC A	2,15

(a) Inderjit, Laboratorio de Medicina Acuática, Escuela Noruega de Veterinaria.

(B) Snow et al., 2006

#### 6.2.10. Obtención del ARN y síntesis del ADNc.

El ARN total se obtuvo de células CHSE-214 cultivadas tanto en botellas de 25 y 75 cm<sup>2</sup> de superficie, como también a cultivos en placas de 24 pocillos, realizando una extracción con Trizol® de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen™), para posteriormente ser solubilizado en agua libre de nucleasas y mantenido a -80°C hasta su posterior uso. Como para diferentes ensayos serán evaluados RNAs de las células como también las de los sobrenadantes se utilizará Trizol® y Trizol®-LS respectivamente.

Además de usar la técnica antes descrita, se utilizó también la extracción de RNA viral para cuantificar bajas concentraciones de virus con el kit de extracción de RNA viral Qiagen (RNAeasy viral mini kit, Quiagen).

Del RNA total se tomará 1 µg que se mezclará con 50 ng/µl del oligo-(dT) 12-18 en 50 µl de volumen de reacción conteniendo 1 mM de dNTPs, 1 unidad/µl de RnaseOUT (Invitrogen™) y utilizando 200 unidades/µl de la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina-maloney (MMLV) en su tampón correspondiente.

La amplificación del cDNA en una etapa preliminar se llevará a cabo usando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción se llevará a cabo en 50 µL conteniendo 0.66 µg del cDNA, 0.2 U de *Taq* polimerasa (Amersham), 100 µM de dNTP's, 50 pmoles de cada primer, 1X del tampón de reacción (Amersham) y agua

destilada estéril hasta completar 50 µL. La reacción de amplificación se realizará en un termociclador Techne CYCLOGENE y los productos de amplificación se analizarán en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

### 6.2.11. PCR en tiempo real

La cuantificación relativa de los diferentes geles se realizará por PCR en tiempo real, en un equipo *JM Research* modelo PTC-200, acoplado a un detector de fluorescencia *CHROMO 4*. Las amplificaciones por PCR se realizarán utilizando el tampón de qPCR Platinum® SyBR® (Invitrogen). La especificidad del producto obtenido será analizada en geles de agarosa y también por medio del análisis de curvas de fusión.

La expresión relativa de cada gen será calculada en base al “crossing point (Cp)” de cada producto de PCR extraído a partir del ARN de células infectadas versus el control apropiado (producto PCR del ARN extraído de células no tratadas), y expresados en comparación a un gen de referencia (EF o GPDH). El valor de expresión relativa será calculada por el método propuesto por Livak *et al.* (2001).

Se utilizará la siguiente ecuación:

$$\text{Ratio} = (E_{\text{target}})^{\Delta \text{Ct}[\text{target}(\text{control} - \text{IPNV infectado})]} / (E_{\text{ELF1a}})^{\Delta \text{Ct}[\text{ELF1a}(\text{control} - \text{IPNV infectado})]}$$

Donde *E* es la eficiencia de cada partidior.

Para la cuantificación absoluta se realiza lo siguiente:

Debemos tener nuestro estándar de número de copias, para lo cual, primero se clona en vector TOPO el inserto que se amplifica en el RT-PCR. Posteriormente se transfecta químicamente en bacterias *E. coli* (TOP 10) quimiocompetentes, las que son seleccionadas por *colony picking*, y por un lado, enviadas a secuenciar para verificar la secuencia nucleotídica del inserto, y por otro lado se hace crecer el cultivo de *E. coli* transformada en medio líquido hasta obtener suficiente biomasa para extraer el plásmido.

Luego de realizada la extracción del plásmido con el inserto, éste es cuantificado en Nanodrop, calculando su masa molecular mediante la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned}
\text{Peso en Daltons (g/mol)} &= (\text{tamaño plásmido p.b.} + \text{inserto}) (330 \text{ Da} \times 2 \text{ nucleótidos/ p.b.}) \\
&= (\text{pCR}^{\text{®}}2.1\text{-TOPO, } 3931 \text{ p.b.} + 213 \text{ p.b. inserto}) (330 \text{ Da} \times 2/\text{pb}) \\
&= (4144 \text{ p.b.}) (330 \text{ Da} \times 2/\text{p.b.}) \\
&= 2735040 \text{ g/mol.}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\text{Número de copias} = \text{g/ moléculas} &= (\text{g/mol}) / \text{número de Avogadro} \\
&= 2735040 / 6,02214199 \times 10^{23} \\
&= 4,542 \times 10^{-18} \text{ g/molécula}
\end{aligned}$$

Luego conociendo la concentración del plásmido, el número preciso de moléculas puede ser determinado como sigue:

$$\begin{aligned}
\text{Moléculas} / \mu\text{L} &= \text{concentración del plásmido (g}/\mu\text{L}) / \text{g/molécula} \\
&= (3 \times 10^{-7} \text{ g}/\mu\text{L}) / (4,542 \times 10^{-18} \text{ g/molécula}) \\
&= 6,6 \times 10^{10} \text{ moléculas} / \mu\text{L}
\end{aligned}$$

Con el valor del número de plásmidos en la solución, se realiza la dilución más concentrada en 2 $\mu$ L ( $10^{10}$ ), y posteriormente se hacen diluciones seriadas hasta obtener  $10^0$  o una copia en 2 $\mu$ L de solución de plásmido.

En cada ensayo de RT-PCR tiempo real se adicionó la curva estándar mencionada anteriormente. Para obtener el valor de número de copias de cada muestra fue necesario interpolar los valores en la curva estándar.

Además se envió a secuenciar el inserto tanto del aislado NVI015 como el aislado nacional.

### 6.2.12. Electroforesis en gel de Agarosa

#### *Preparación del gel de agarosa*

Se prepara una solución de agarosa al 1%-3%, en buffer TAE; para disolver totalmente la agarosa se calienta hasta que hierva. Agitando en forma constante con agitador magnético a baja revolución por minuto. Se vierte la agarosa aún líquida en la cámara de electroforesis, junto con las peinetas, y se deja enfriar de 10-20 min. Una vez gelificado se retiran las peinetas.

## Electroforesis

A cada tubo de ADN digerido se agregan 5  $\mu$ L de la tinción de carga (D) y una gota muy pequeña de bromuro de etidio. Se centrifugan brevemente (5 segundos) las muestras de ADN digeridas. Se agrega una gota muy pequeña de bromuro de etidio al marcador de peso molecular.

El gel es colocado dentro de la cámara de electroforesis, con las celdas vacías del gel hacia el polo negativo (negro) del sistema.

Se adicionan 275 ml de buffer TAE y se cargan las muestras de ADN, 20  $\mu$ L, y el marcador de peso molecular. Se aplica un voltaje constante de 100 volts por 30 minutos.

### 6.2.13. Aislamiento de Polisomas Virales

Tiempo de evaluación: 6, 12 y 18 horas post infección.

Se sembraron botellas de 75cm<sup>2</sup> con células CHSE-214 hasta confluencia en medio MEM + 5% de SFB ( $\pm$  11 Millones de células) e infectadas con IPNV NVI015(TT) a Multiplicidad de infección = 1

Se realizó infección diferencial para obtener todas las muestras al mismo tiempo.

De las botellas infectadas con IPNV se extrajo las células y luego lisadas con buffer X (menor volumen posible), el sobrenadante obtenido es centrifugado (1000 g durante 7 minutos) para eliminar los núcleos celulares, luego es cargado sobre una gradiente continua de sacarosa en buffer X desde 0,5 a 1,5 M, en un volumen total de 30ml.

Se centrifugó a 150.000 g por 120 minutos en una ultracentrifuga Thermo (Sorvall) y rotor superspin 630.

Posterior a la ultracentrifugación se determinó la densidad óptica a 260 y 280 nm, de cada fracción colectada.

Se recuperaron entre 13 y 20 fracciones de aproximadamente entre 0,6-1ml c/u. de las cuales se alicuotó 60uL para absorbancia a 260 y 280nm, 60uL en 4X *sample buffer*, para análisis de proteínas y 480 uL restantes en 1ml de trizol para extracción de RNA total.

#### **6.2.14. Western-Blott**

##### *Transferencia*

Los geles de acrilamida bis, entre 8-12% ya corridos, fueron depositados sobre la membrana de nitrocelulosa, en una cámara de transferencia semi-seca y se aplicó voltaje de 15V por 45 minutos sobre el buffer tris-glicina SDS metanol.

##### *Bloqueo de la Membrana*

Se bloquea la reacción con leche al 3% v/v o BSA 1,5-3% p/v por 60 minutos a 37°C.

##### *Marcación*

Se utilizó anticuerpo monoclonal anti-VP2, clon 1B3/E10 comercial, Bios Chile®. Anticuerpo contra antígeno específico en la dilución recomendada. 30-60 minutos a 37°C o toda la noche (*over night*) a 4°C.

Lavado con buffer PBS o TBS, 3 lavados por 5 minutos cada uno.

##### *Detección*

El segundo anticuerpo HRP (*horseradish peroxidase*). Se incuba a 37°C por 30-60 minutos.

Tres lavados con PBS por 5 minutos cada uno.

##### *Revelado*

Se realizó con una solución de diaminobenzidina o 100mg/10ml en PBS 1X adicionando peróxido de hidrógeno 200µL.

Luego se lee sobre las reacciones positivas donde se observa la membrana de nitrocelulosa como bandas de color café.

#### **6.2.15. Microscopía electrónica de transmisión**

Se cultivaron células CHSE-214 en placas de cultivo celular (6 pocillos) hasta confluencia, crecidas en medio MEM suplementado con 5% de SFB. A dichas células posteriormente se le realizó una infección con IPNV a multiplicidad de infección igual a 1, dejando absorción durante una hora y posterior lavado con PBS 1X, luego se agrega medio de cultivo fresco suplementado con 2% de SFB con y sin péptido. Se incuban las células a 18°C por 48 horas hasta obtener efecto citopático incipiente (presencia de múltiples vacuolas en el citoplasma celular), se remueve la monocapa celular y se deposita tanto el sobrenadante como las células en un tubo de 1,5ml.

Se centrifuga a 3000g por 10 minutos para eliminar las células, posteriormente se filtra el sobrenadante a 0,1µm y se mantiene a 4°C hasta uso.

Las muestras deben estar frescas, es decir, deben tener a lo más 48 horas antes de la microscopía.

Para la microscopía, las grillas soporte de las muestras son carbonizadas, en una cámara al vacío durante 5 minutos mediante un arco eléctrico entre grafito electrificado. Posteriormente se ionizan las grillas para hacerlas hidrofílicas, finalmente las grillas están listas para ser cargadas con la muestra.

Se carga cada grilla con 10 µL de muestra, se deja absorber por 1 minuto y se quita el exceso de muestra con un papel filtro, luego se hizo la tinción negativa, 10 µL de acetato de uranilo al 1% en solución acuosa durante un minuto y se quitó el exceso con papel filtro. Dejar secar al aire durante 5 minutos y se monta la grilla en el soporte para introducirla en la cámara del microscopio electrónico de transmisión.

La microscopía electrónica se llevó a cabo en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, utilizando el Microscopio Electrónico de Transmisión Philips Tecnai 12 Bio Twin.

#### **6.2.16. Análisis de datos**

Para cuantificar las variaciones temporales y de expresión viral, abundancia de la infección de células CHSE-214 con IPNV, considerando la concentración celular, concentración viral y el tiempo (cinéticas). Se realizaron ANOVA de una y dos vías según el Modelo General Linear (GLM) y para establecer diferencias específicas entre niveles de los factores, se utilizó una Prueba a-posteriori de Tukey (Zar, 1996). Se utilizó para este fin el software estadístico STATISTICA 7.0 de ©StatSoft Inc.

Es importante considerar que el análisis de varianza ANDEVA (ANOVA) está relacionado directamente con la variabilidad ocurrida en el experimento, y esta varianza es función de las desviaciones cuadráticas  $(X_i - \bar{X})^2$  que quiere decir: La suma de los cuadrados totales (SST) = Suma de los cuadrados entre grupos (SSA) + Suma de los cuadrados dentro de los grupos (SSA). El estadístico F en anova representa la proporción entre la variación entre grupos dividida por la variación dentro de los grupos, un F grande es evidencia de diferencias entre los grupos.

La significancia: P, es la Probabilidad de que por puro azar obtengamos una muestra “más extraña” que la obtenida.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Modelamiento bioinformático de péptidos que interfieran con la expresión de IPNV

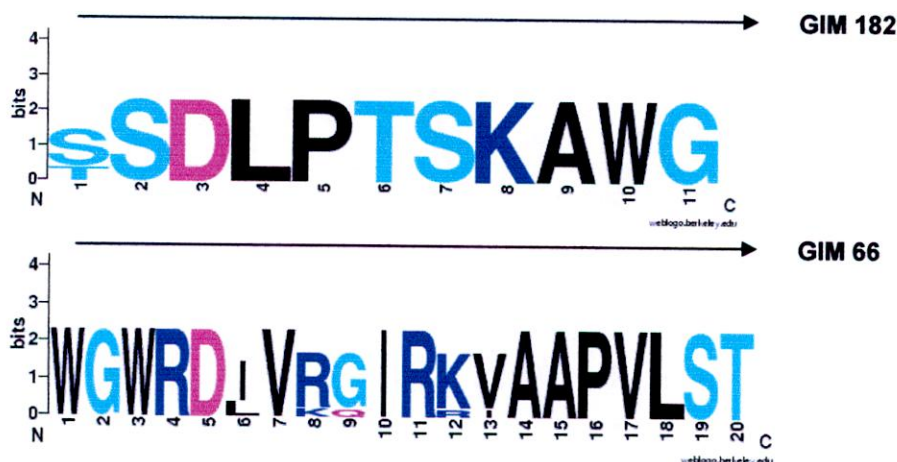
- Análisis de secuencias nucleotídicas y amino acídicas de IPNV

Se analizaron todas las secuencias depositadas en bases de datos, las que se describen a continuación, de Nucleótidos y de Aminoácidos de IPNV correspondientes a los 6 genogrupos identificados (alineamientos en anexo 1).

- Modelamiento y selección de péptidos con potencial inhibitorio contra IPNV.

Se seleccionó la zona de procesamiento pVP2- VP2, y de ella, los dominios más conservados de VP2 (dominio protector), y los dominios de interacción entre moléculas de VP2 para ser evaluados como potenciales generadores de péptidos interferentes. Los 2 péptidos seleccionados y sus modelos en anexo 2.

De ellos se eligió el que aparecía con mayor potencial (GIM 182). La figura 10 muestra el grado de conservación de cada aminoácido en la secuencia del péptido escogido, de ahora en adelante, para GIM 182 y la alternativa de segundo lugar, GIM 66 (Tabla 7.1.)



**Figura 10.** Logos de los péptidos de acuerdo con la alineación entre los 6 genogrupos de IPNV. Arriba GIM182, abajo GIM66, entre residuos 11-20. La propensión de un residuo determinado está relacionado con el tamaño de los caracteres correspondientes. (Crooks *et al.*, 2004)

Los criterios de interferencia para seleccionar y diseñar los péptidos, se centraron en los potenciales de inhibición tanto en el procesamiento del precursor de la proteína VP2, (pVP2) como en el sitio de corte del procesamiento de las proteínas VP2/VP3, dado que ellas tienen directa participación en el ensamblaje de la partícula viral. El análisis y la posterior selección se hizo sobre secuencias peptídicas conservadas no solo entre diferentes aislados de IPNV reportados, sino también entre otros tipos de Birnaviridae, con especial énfasis en IBDV. Para ello se utilizaron programas disponibles *on line*, primero para descargar las diferentes secuencias de nucleótidos y sus correspondientes secuencias aminoacídicas y luego para realizar alineamientos múltiples en orden de conocer las regiones más conservadas, y finalmente generar el algoritmo que nos permitiera predecir la estructura secundaria posible de cada péptido seleccionado. Nos centramos en las más confiables, a nuestro juicio, que fueron:

1.- Las del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica), que contiene 267 secuencias nucleotídicas para IPNV y 50 para IPNV sp, así 322 como secuencias amino acídicas para IPNV y 59 para IPNV sp, y 3 para IPNV Jasper. Así, al tener un perfil global de las secuencias disponibles, ello permitió seleccionar las potencialmente más representativas para poder realizar el alineamiento múltiple..

2.- Las del CLUSTAL W: Del Instituto Bioinformática Europeo, que provee una herramienta confiable para realizar alineamientos múltiples, tanto para secuencias nucleotídicas como para secuencias de aminoácidos. Así se definieron los dominios más conservados entre los diferentes tipos de Birnaviridae y los diferentes genogrupos de IPNV.

3.- Las de SOPMA: Del Polo de Bioinformática de Lyon, en la red de Análisis de secuencias proteicas, algoritmo que nos permitió predecir la estructura secundaria de los péptidos seleccionados (Geourjon y Deleage, 1994; 1995).

Con esta información integrada se diseñaron y sintetizaron 32 péptidos (Tabla 7.1.) que con posterioridad fueron ensayados *in vitro* para evaluar su acción sobre la expresión/infectividad del virus IPN.

## **7.2. Generación de batería de péptidos sintéticos interferentes.**

- Síntesis química, purificación y caracterización de los péptidos.

Se sintetizaron químicamente los péptidos propuestos mediante síntesis en fase sólida, utilizando la metodología de síntesis simultánea, la que se encuentra estandarizada en nuestro laboratorio (Houghten, 1985; Houghten *et al.*, 2000) Los péptidos fueron recuperados de un soporte sólido, la resina RINK amida, que produce

péptidos en su extremo C terminal amidados, es decir CO-NH<sub>2</sub>. (Brown y Nuss, 1997). Estos fueron purificados por RP-HPLC, desalinizados y su masa molecular determinada por espectrofotometría de masas MALDI-TOF y su estructura definida por Dicroísmo Circular.

A continuación se muestra la tabla de péptidos sintetizados para su posterior evaluación del potencial interferente.

**Tabla 7.2.: Péptidos sintetizados químicamente en GIM.**

Lista de péptidos Sintetizados Químicamente

PEPTIDO	SECUENCIA	PESO MOLECULAR	FAMILIA
2	SLPTS YDL	895,1	IPNV
3	ASIPDDTLEKH	1225,5	IPNV
4	VTEYGRFDP	1083,4	IPNV
37	HKELTDDPISA	1225,5	R-IPNV
38	PDFRGYETV	1083,2	R-IPNV
66	<b>WGWRDIVRGIRKVAAPVLST</b>	2280,9	IPNV-pVP2
67	FPMAAPLIGMADQFIGDLTK	2136,8	IPNV-pVP2
68	WGWRDIVRGI	1257,6	IPNV-pVP2
69	RKVAAPVLST	1041,3	IPNV-pVP2
70	FPMAAPLIGM	1047,5	IPNV-pVP2
71	ADQFIGDLTK	1107,3	IPNV-pVP2
72	AGGRYHSMA	949,3	IPNV-pVP2
73	AGGRYKDVLE	1107,4	IPNV-pVP2
74	YEGNADIVN	994,1	IPNV-VP2 (74)
75	STTVTGDIN	907,0	IPNV-VP2 (74)
76	FSLPGGLTT	892,2	IPNV-VP2 (74)
77	DNRYDFQLD	1185,2	IPNV-VP2 (74)
78	FVGLDNDVP	975,1	IPNV-VP2 (74)
79	VVSTSSVL	772,9	IPNV-VP2 (74)
80	ATADNFNGV	908,0	IPNV-VP2 (74)
81	SAKFTQSIPT	1208,3	IPNV-VP2 (74)
82	ITKPITRVK	1055,4	IPNV-VP2 (32)
83	LAYQLNQQT	1077,9	IPNV-VP2 (32)
176	YRWNLNQTALEFD	1669,8	IPNV-68-80 VP2
177	CYRWNLNQTALEFD	1773,0	IPNV-176-C
178	STLPAGLYALN	1119,5	IPNV-108-118 VP2
179	CSTLPAGLYALN	1222,7	IPNV-178-C
180	LIPNPELLKNM	1281,7	IPNV-374-384 VP2
181	CLIPNPELLKNM	1384,9	IPNV-180-C
182	<b>TSDLPTS KAWG</b>	1162,4	IPNV-431-441 VP2
183	CTSDLPTS KAWG	1265,6	IPNV-182-C
152	TLEEFSAKL	1037,1	K-1, Control

Todos estos péptidos fueron testeados en el modelo de infección persistente a una concentración de 100ng y 500ng de péptido, medidos por RT-qPCR 48 horas post tratamiento. Se evaluó el impacto que tienen estos péptidos como inhibidores y se seleccionaron los que presentan mayor actividad. Siendo éstos el péptido GIM66 y el GIM182.

En la siguiente figura se muestran los perfiles de pureza de los péptidos sintetizados.

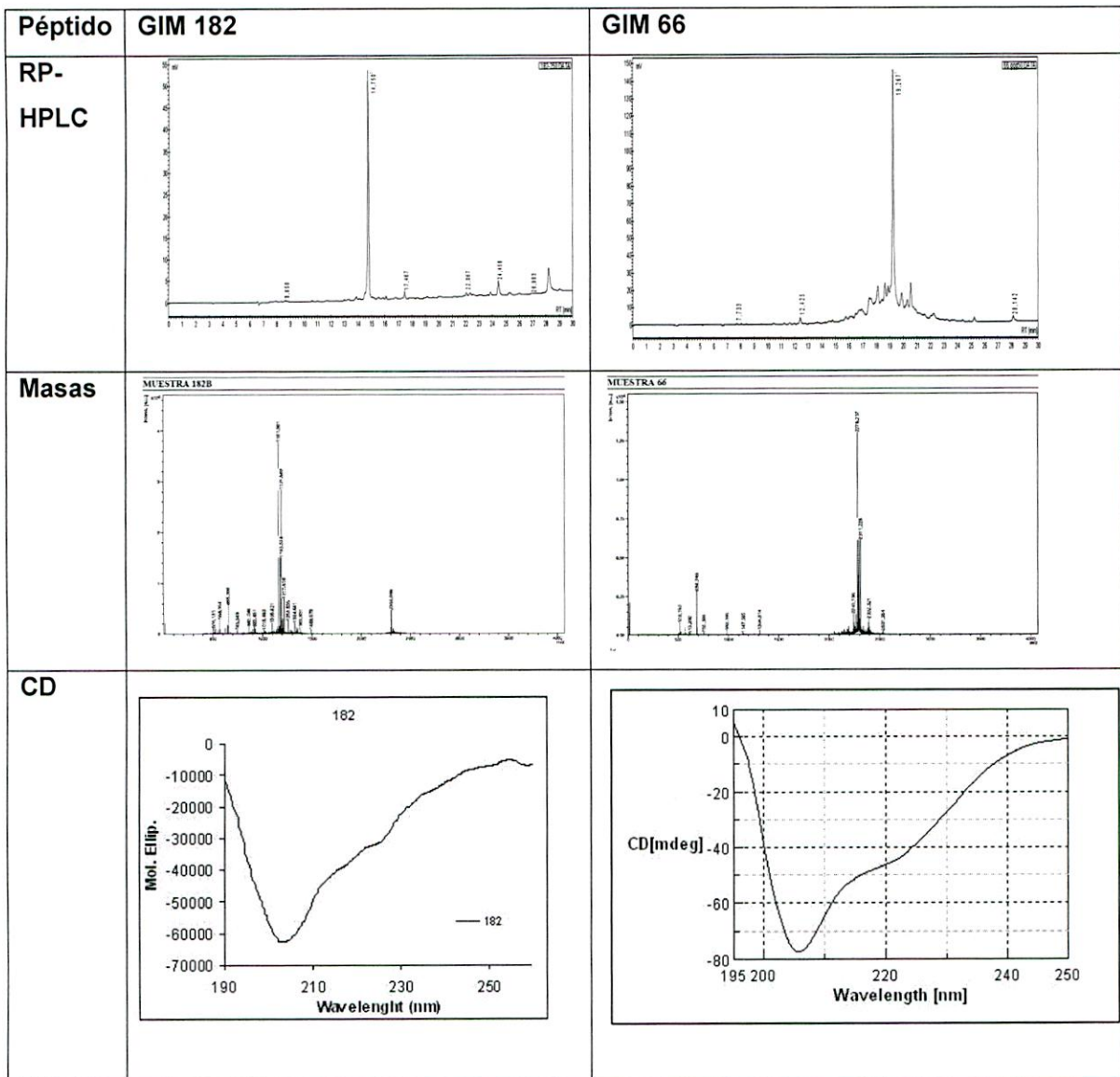


Figura 11. RP-HPLC, Espectro de masa y Dicroísmo circular de Péptido GIM 182 y GIM 66.

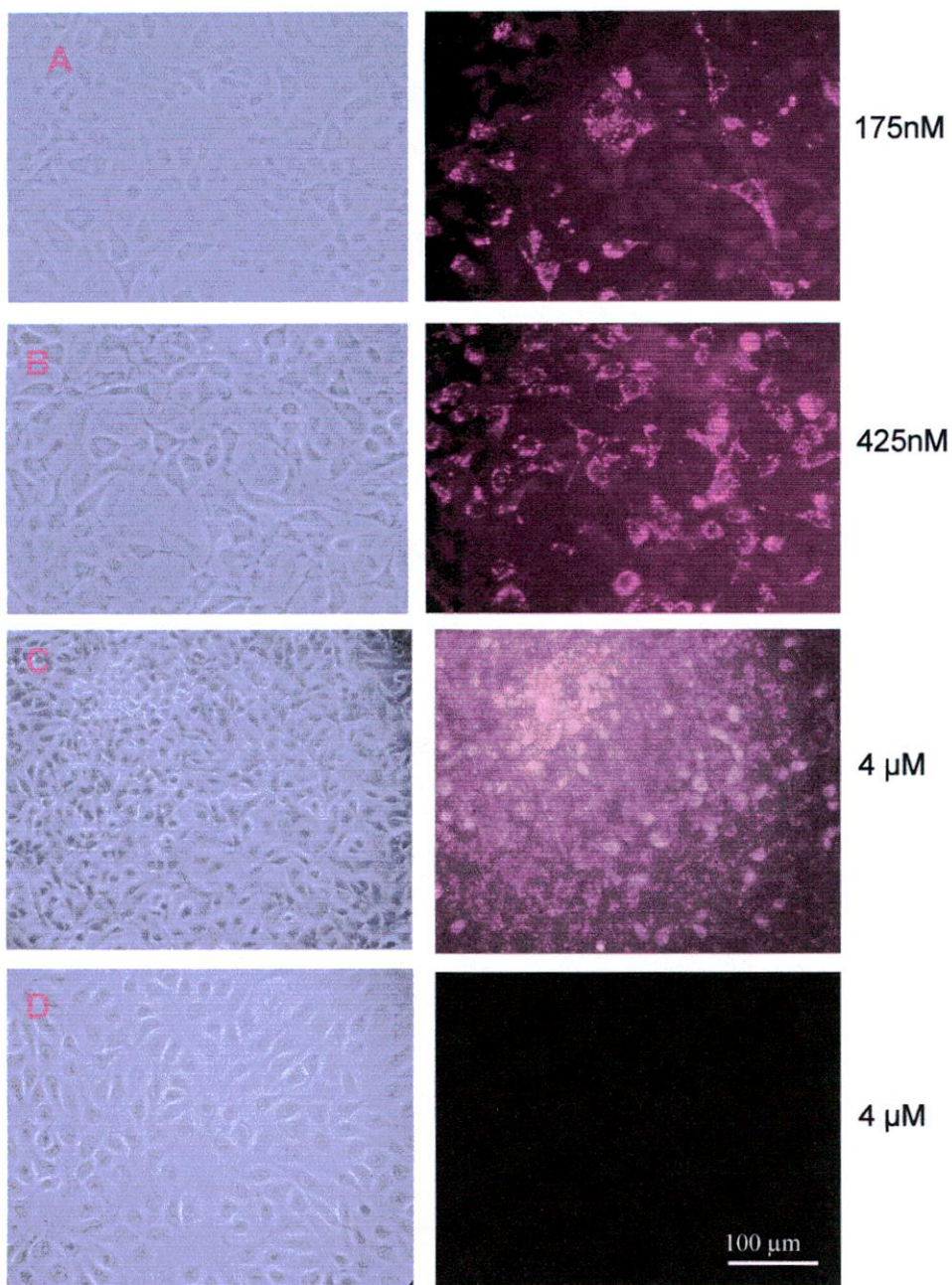
El péptido GIM 182 no muestra estructura bien definida en la condición ensayada. A 25°C a una concentración de péptido 0,125 mg/ml en 30% de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), el péptido GIM 66 posee estructura helicoidal, característica de una  $\alpha$ -hélice.

La estructura de poliprolina tipo I y II son estructuras peptídicas helicoidales, la tipo II (Adzhubei y Sternberg, 1993), se asemeja al perfil obtenido con el péptido GIM 182. Se obtuvo una estructura helicoidal para el péptido GIM 66, de acuerdo al patrón de absorción obtenido entre los 200 y los 220nm. (Chen *et al.* 2007).

Según Adzhubei, describe la estructura de poliprolina II como una hélice, con una torsión diferente a las  $\alpha$  hélices: éstas, sin embargo, mantendrían la capacidad de penetrar membranas celulares.

### **7.3. Incorporación de péptidos sintéticos en células CHSE-214.**

Para evaluar una eventual incorporación pasiva de los péptidos a las células blanco, ellos se marcaron con Rodamina, formando un complejo conjugado péptido-rodamina los que luego fueron agregados al medio de cultivo durante 4 horas, lavados y porcesados por observación a campo claro y fluorescencia. Los péptidos conjugados con rodamina fueron agregados a células CHSE-214 en placas de 24 pocillos en 3 concentraciones diferentes (10, 100 y 500ng /pocillo). Como control se utilizó Rodamina sola. La Figura 12 muestra que los péptidos entran pasivamente a las células



**Figura 12.** Entrada de péptidos marcados con rodamina a células CHSE-214. A y B; 175 y 425nM de péptidos 182, C; 4  $\mu$ M de péptido 66, D; control solo rodamina, 4  $\mu$ M.

En la figura 12 se observan a la izquierda células en campo claro a 200X de aumento, y a la derecha la fluorescencia asociada al péptido aplicado.

De los péptidos ensayados, todos obtuvieron patrones semejantes, es decir todos los péptidos propuestos como interferentes en la infección con IPNV, tienen la capacidad de entrar a las células CHSE-214.

#### 7.4. Concentración de péptidos tolerables para la viabilidad de la línea celular CHSE 214.

- Determinación del impacto de diferentes concentraciones de péptidos sobre la viabilidad celular.

Las células blanco fueron expuestas a concentraciones crecientes de péptidos para evaluar su potencial tóxico. Se utilizaron concentraciones de 0,1;1;10;100 y 1000  $\mu\text{M}$  y el impacto medido utilizando la tinción Tripán Blue, que discrimina entre células vivas y muertas, procedimiento estandarizado en nuestro laboratorio para células CHSE 214 (Rojas *et al.*, 2009). Complementariamente utilizamos la técnica de MTT (*CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*) que mide actividad celular funcional, vía actividad mitocondrial, con una directa correlación con los resultados obtenidos por Azul Tripán (datos no mostrados). Los péptidos seleccionados no presentan toxicidad a concentraciones de hasta 100 veces mayor a las utilizadas en los ensayos. La Tabla 7.2. muestra los niveles de concentración de péptidos a los cuales hay un 50% de mortalidad en las células.

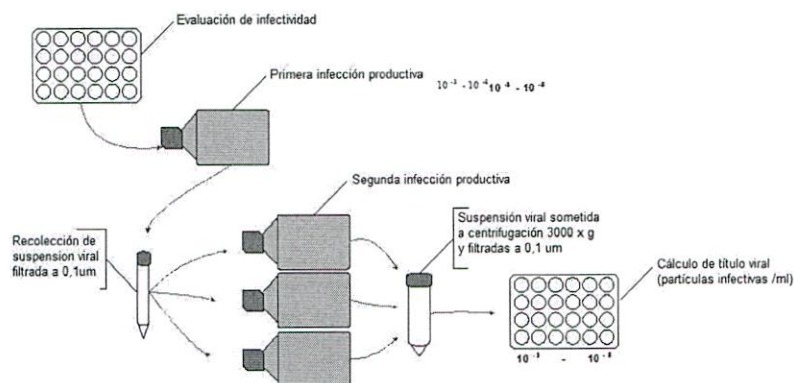
**Tabla 7.2.: Concentraciones de péptidos a los cuales la viabilidad disminuye en un 50 %.**

Péptidos	Concentración citotóxica (50% de muerte celular)
GIM 66	1,2mM
GIM 182	1,08mM

#### 7.5. Estandarización de condiciones de infección de IPNV

- Aislamiento preparativo de IPNV.

El aislamiento preparativo del virus se realizó de acuerdo al siguiente esquema.



**Figura 13.** Esquema de producción de virus y título de IPNV.

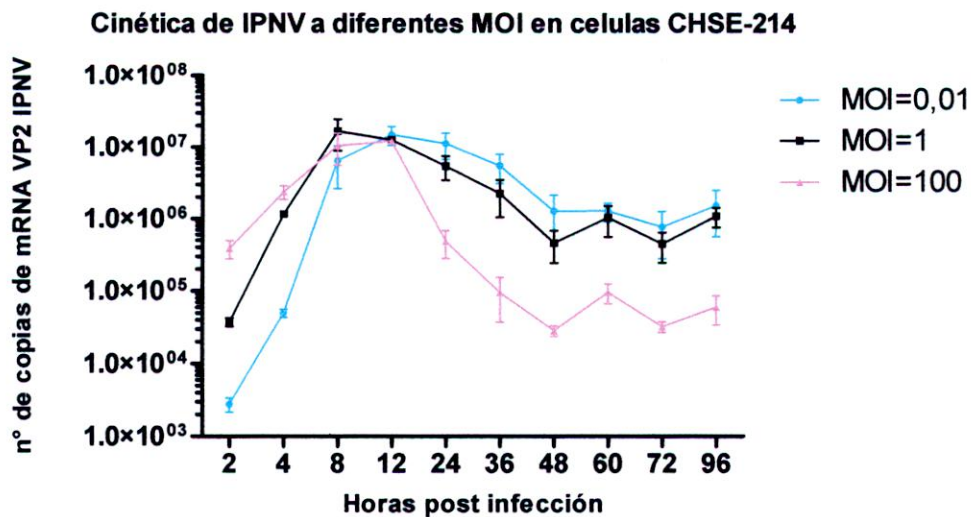
- Titulación de IPNV.

Se estimó el número de partículas infectivas de IPNV mediante el método de focos fluorescentes, obteniéndose títulos variables, desde  $10^5$  hasta  $10^9$  partículas de IPNV/ml. Los títulos más altos obtenidos se produjeron debido a que el medio de cultivo utilizado se disminuyó a la mitad, concentrando las partículas virales infectivas.

### 7.6. Cinéticas de infección *de novo* con IPNV

Cuantificación de transcritos blanco (VP1, VP2) de IPNV mediante RT-PCR tiempo real.

Para poder definir los tiempos de evaluación de los péptidos en su capacidad inhibitoria, en la infección *de novo* y poder compararla con la de las células persistentemente infectadas, se ensayaron tres diferentes multiplicidades de infección en la línea celular CHSE-214: 0,01; 1 y 100, sobre células confluentes con los inóculos indicados en placas de cultivo celular de 24 pocillos, con tres réplicas por tiempos variables y un control de no infección por cada tiempo. Se extrajo RNA total y se realizaron los análisis por RT-PCR en tiempo real con partidores específicos para VP2. La Figura 14 muestra que, en concordancia con lo expuesto en literatura, la síntesis máxima de RNA es a las 12 horas post infección, lo que nos permitió definir los tiempos de 12, 18, 24 y 48 horas para realizar las evaluaciones en los dos (cuando se presentaron) modelos de infección y la multiplicidad elegida fue de 1.0.



**Figura 14:** Cinética de infección en células CHSE-214 con IPNV a diferentes multiplicidades de infección (0,01; 1 y 100), evaluación del número de copias de mRNA de VP2-IPNV, por RT-PCR tiempo real.

Análisis de Varianza (ANDEVA) de 2 vías (GLM)	F(5,36) = 40,57	p = 0,0001	95% de confianza
--	-----------------	------------	------------------

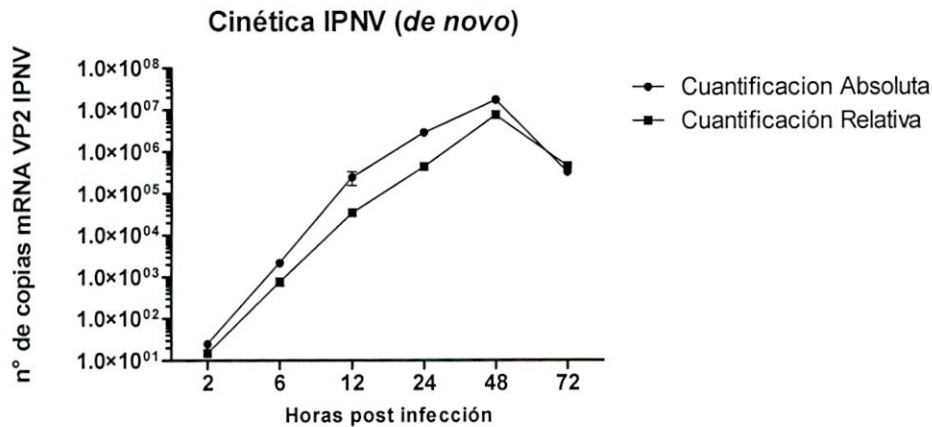
A multiplicidades altas, 100 partículas por célula (“LISIS DESDE FUERA”), el número de mensajes es 10 veces menor que a multiplicidades de 1 y 0,01. Esto ha sido vagamente expuesto y se postula que la generación de partículas interferentes defectivas DI (Kennedy y Macdonald, 1982) podría ser la explicación, sin embargo en literatura sólo se ha evidenciado que estos títulos son menores en la capacidad de infectar, pero no se hace referencia que la generación de partículas sea menor. (Dobos, 1995).

### **7.7. Evaluación del potencial interferente de los péptidos sintéticos sobre la expresión de la proteína VP2 de IPNV en la línea celular infectada de novo.**

- Cuantificación de transcritos blanco (VP1 y VP2) de IPNV por RT-PCR tiempo real.

Para evaluar el potencial interferente de los péptidos, fue necesario, en primer lugar obtener valores de referencia en una cinética de infección con el virus, respecto a: expresión de VP1 y VP2 dentro de las células y en el sobrenadante, así como también la generación de las partículas virales ensambladas infectivas.

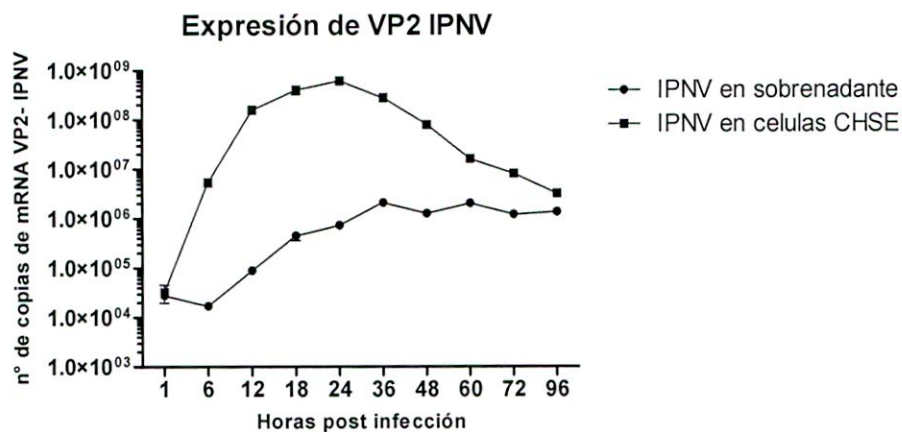
Se crecieron células CHSE-214 en confluencia en placas de 24 pocillos y se infectaron con una alícuota de IPNV a una multiplicidad de infección de 1 y se evaluó la expresión de IPNV midiendo el número de transcritos de VP2 normalizados frente a un gen de referencia, el “*House Keeping gene*” ELF 1 $\alpha$  (factor de elongación de la biosíntesis proteica). La Figura 15 muestra que ambas metodologías de cuantificación presentan la misma tendencia, sin embargo, el análisis de varianza nos indica que las rectas difieren entre sí significativamente.



**Figura 15:** Cinética de infección de IPNV en células CHSE-214 a diferentes tiempos post infección. Evaluación mediante RT-PCR tiempo real. Utilizando una multiplicidad de infección = 1. Se muestran la cuantificación absoluta del número de copias de IPNV y una cuantificación relativa normalizada con la expresión celular factor de elongación ELF 1a,

Análisis de Varianza (ANDEVA) de 2 vías (GLM)	F(27,80) = 36,544	p = 0,0001	95% de confianza
--	-------------------	------------	------------------

Seguidamente, se evaluó el número de copias de IPNV en el sobrenadante de los cultivos así como en las células intactas, para determinar en cada caso, los genómicas que preferentemente se encuentran como virus encapsidados en el exterior, contra los transcritos de VP1 y VP2 que preferentemente están en el interior de las células infectadas. La Figura 16 muestra que la síntesis viral intracelular es muy acelerada principalmente en tiempos tempranos de infección (1-24 horas post infección); sin embargo la liberación de partículas al medio exterior tiene una pendiente menor. En ambos casos, posterior al tiempo 48 horas, las células se encuentran casi completamente lisadas.

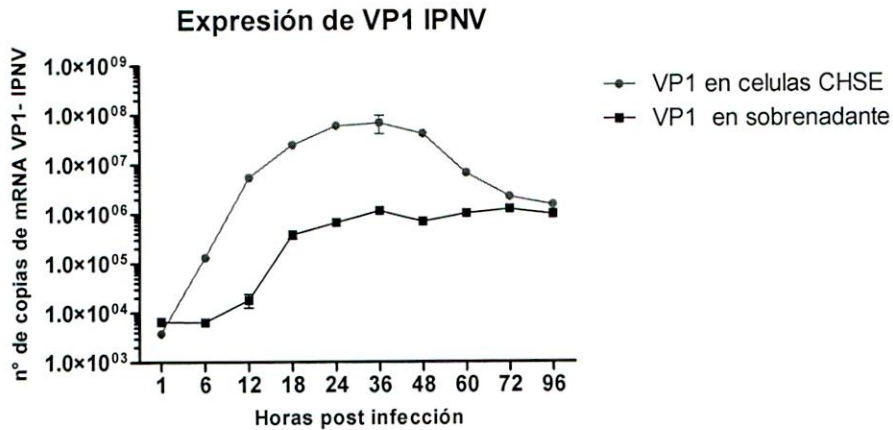


**Figura 16:** Expresión de VP2-IPNV a diferentes tiempos post infección. Copias nuevas de IPNV fueron detectadas en el sobrenadante donde la extracción de RNA fue hecha usando

Quiagen RNAeasy kit, y también se evaluó las copias nuevas en el pellet celular, usando Trizol en la extracción de RNA. Ambas evaluaciones fueron hechas usando RT-qPCR, y la expresión de IPNV fue detectando transcritos de VP2.

Análisis de varianza ANDEVA de 2 vías (MGL)	F(27,80) = 36,544	p = 0,0001	95% de confianza
---	-------------------	------------	------------------

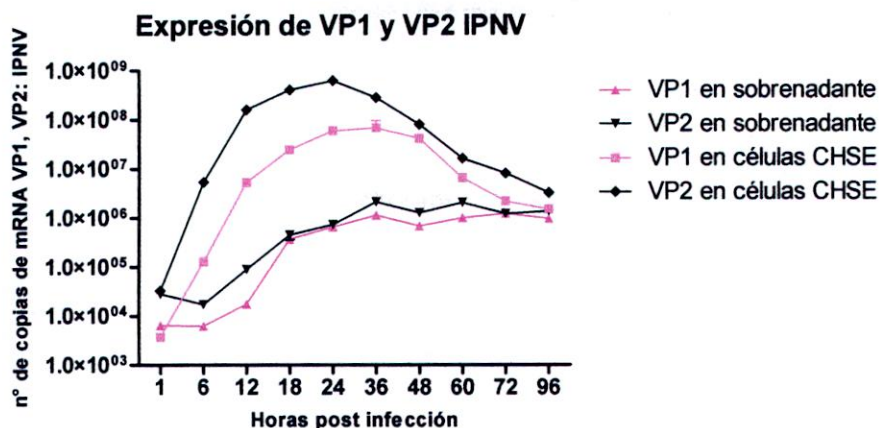
El análisis de varianza muestra significancia en la diferencia entre las curvas de sobrenadante y pellet celular.



**Figura 17:** Expresión de VP1-IPNV a diferentes tiempos post infección. Copias nuevas de IPNV fueron detectadas en el sobrenadante donde la extracción de RNA fue hecha usando Quiagen RNAeasy kit. También se evaluaron las copias nuevas en el pellet celular, usando Trizol en la extracción de RNA. Ambas evaluaciones fueron hechas usando RT-qPCR, y la expresión de IPNV fue detectando transcritos de VP1.

análisis de varianza ANDEVA de 2 vías (MGL)	F(9,40) = 7,895	p = 0,0001	95% de confianza
---	-----------------	------------	------------------

Consistencia en la diferencia entre las curvas de sobrenadante y pellet celular.



**Figura 18:** Cinética de infección de IPNV en células CHSE-214. Se evaluó la expresión de VP1 y VP2 en sobrenadante y pellet celular. El número de copias de los diferentes transcritos se evaluó por RT-PCR tiempo real.

análisis de varianza ANDEVA de 2 vías (MGL)	F(45,120) = 35,304	p = 0,0001	95% de confianza
---	--------------------	------------	------------------

En el modelo de infección productiva, el análisis de la expresión vía RT-qPCR tiempo real no dio diferencias significativas entre la evaluación absoluta y la referente a la expresión del gen ELF 1 $\alpha$ , de manera que la evaluación en células es posible realizarla en forma absoluta, haciendo menos laborioso el análisis práctico de las muestras y consumiendo menos reactivos de diagnóstico.

En la gráfica anterior, la pendiente de la expresión en las células es exponencial a pocas horas post infección, mostrando una tasa de síntesis mayor a las 12 horas post infección (Dobos, 1995).

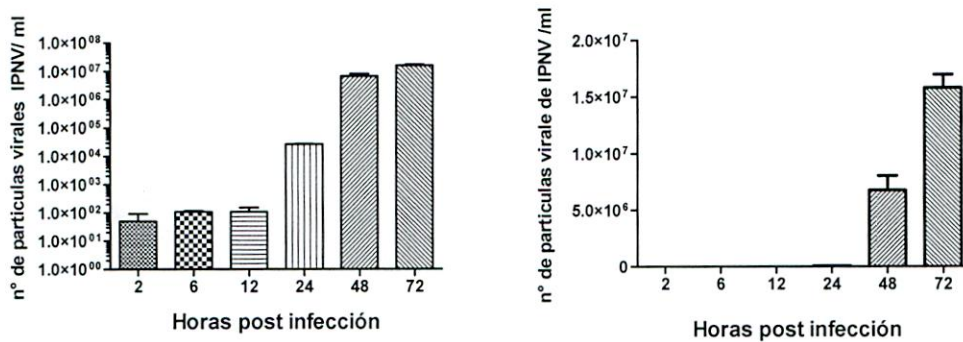
Según Oystein Evensen (pers com) la síntesis de IPNV tope es a las 36 horas post infección, y se obtuvo una expresión alta de VP1, la polimerasa viral hasta ese tiempo, posteriormente la muerte celular influye en la evaluación de la monocapa celular.

La expresión de VP1 en relación a VP2 es por lo general 100 veces menor. (Shivappa *et al.*, 2004)

- Cuantificación de partículas virales ensambladas por inmunofluorescencia semicuantitativa.

Posteriormente se realizó la cinética de aparición de partículas infectivas de IPNV.

### Producción viral MOI =1

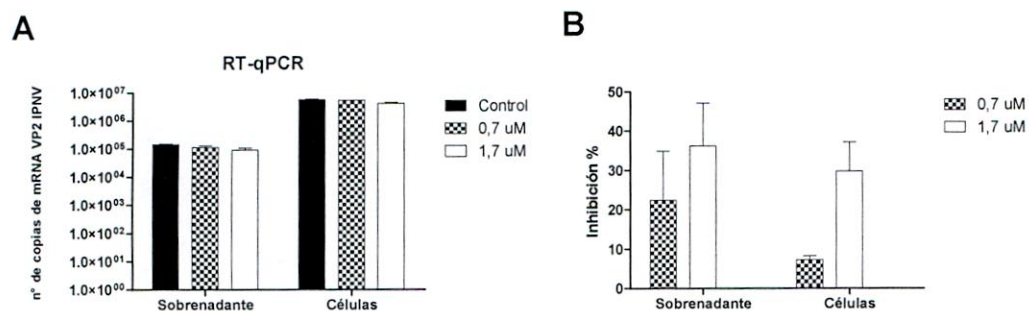


**Figura 19:** Producción de partículas virales en células CHSE-214 por inmunofluorescencia semicuantitativa. Células CHSE-214 en placa de cultivo de 24 pocillos fueron infectadas con IPNV a multiplicidad de infección 1, por una hora, luego se descartó el inoculo viral y se reemplazo con medio de mantención. A cada punto el sobrenadante fue titulado por inmunofluorescencia semicuantitativa, el título fue obtenido haciendo diluciones seriadas de cada punto ( $10^0$ -  $10^{-7}$ ). Se evaluó el número de focos fluorescentes por microscopía de fluorescencia y se estimó el número de partículas virales infectivas /ml. Ambas gráficas representan lo mismo, Izquierda, el eje Y en escala logarítmica y la grafica derecha en escala lineal.

análisis de varianza ANDEVA de 2 vías (MGL)	F(5,13) = 54,235	p = 0,0001	95% de confianza
---	------------------	------------	------------------

En relación a la liberación de las partículas virales a causa de la infección aguda de las células CHSE-214, a las 18 horas post infección se comienza a obtener partículas en el sobrenadante, y a las 72 horas post infección es fácilmente obtener títulos de  $10^7$  (Romero-Brey *et al*, 2009).

Luego se procedió a evaluar la efectividad inhibitoria del péptido GIM 182 en este modelo de infección productiva.



**Figura 20: A**, Evaluación del péptido GIM 182 en células CHSE-214 infectadas con IPNV 48 horas post infección, RT-PCR tiempo real de mRNA de VP2 obtenido del sobrenadante y de las monocapas celulares. **B**, Inhibición de expresión de VP2 IPNV en sobrenadante y células CHSE-214 infectadas *de novo* con péptido GIM 182.

<b>A*</b>	ANDEVA de 1 vía (MGL)	F (1,22) = 338,71	p = 0,00001	95% de confianza
<b>B</b>	ANDEVA de 2 vías (MGL)	F (1,12) = 4,01	p = 0,068	95% de confianza.
<b>B**</b>	ANDEVA de 1 vía (MGL)	F (1,14) = 4,1082	p = 0,06216	95% de confianza

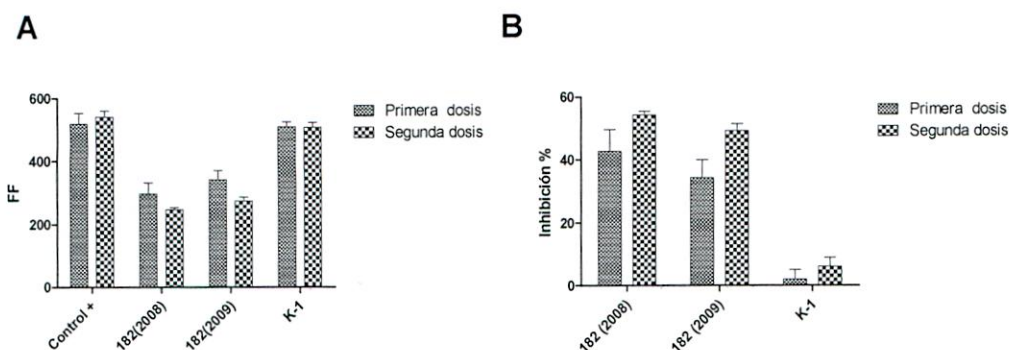
\* Comparación entre el sobrenadante v/s el pellet celular.

\*\* Comparación entre el % de inhibición v/s la concentración (0,7 y 1,7uM)

En la figura 20, A no es posible distinguir el grado de inhibición, transformado los datos respecto al blanco tenemos lo siguiente en 20 B.

A la concentración mayor de 1,7µM se observa una inhibición de la expresión de IPNV de un 30% tanto en la monocapa celular como en el sobrenadante. El resultado es más evidente evaluando el sobrenadante celular, donde se obtienen valores directamente proporcionales a la dosis de péptidos administrada.

Para corroborar los valores obtenidos en la expresión de VP2 de IPNV, se realizó un ensayo de infectividad del aislado viral con el péptido GIM 182. Además se ensayó una y dos dosis consecutivas administradas, la primera una hora post infección y la segunda 6 horas post infección. 18 horas post infección las placas de cultivo celular fueron evaluadas por fluorescencia. Además se verificó con este ensayo la estabilidad del péptido disuelto, que fue mantenido a  $-20^{\circ}\text{C}$  por más de un año.



**Figura 21:** **A**, Inhibición de expresión por el péptido GIM182 en células infectadas con IPNV utilizando inmunofluorescencia semicuantitativa. Se adicionó 1 y 2 dosis de péptido. Los valores de FF corresponden a focos fluorescentes o unidades formadores de placa, que corresponden a células individuales fluorescentes. **B**, Inhibición de células infectadas con IPNV utilizando inmunofluorescencia semicuantitativa. Se adicionó 1 y 2 dosis de péptido. Los valores de FF fueron transformados a valores de porcentaje de inhibición.

<b>A*</b>	ANDEVA de 1 vía (MGL)	F (3,28) = 60,005	p = 0,00001	95% de confianza
<b>B</b>	ANDEVA de 2 vías (MGL)	F (1,18) = 9,0743	p = 0,00748	95% de confianza
<b>B**</b>	ANDEVA de 1 vía (MGL)	F (2,21) = 48,793	p = 0,00001	95% de confianza

\* Al comparar la unidades de foco fluorescente v/s el péptido.

\*\* Al comparar el % de inhibición v/s el péptido.

En la figura 21, se observan los valores de inhibición, para los cuales con la segunda dosis se potencia la acción inhibitoria. Con la primera dosis tenemos una inhibición promedio de 39% y en la segunda dosis un promedio de 51,5%.

La expresión del virus en presencia del péptido fue disminuida al utilizar una segunda dosis sucesiva, disminuyendo también el número de partículas infectivas en el sobrenadante.

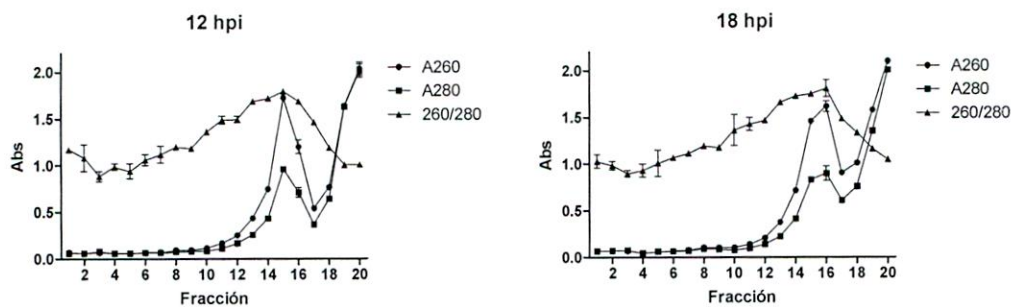
Se logra una inhibición de más del 50% con una segunda aplicación, además se observa que GIM 182 es estable disuelto; hasta un año ya que no varía significativamente su actividad.

- Caracterización de polisomas virales y la síntesis *de novo* de proteína blanco VP1 y VP2, vía mRNAs:
  - a) Gradiente de Sacarosa fraccionada
  - b) RT-PCR-tiempo real

La caracterización de los polisomas se realizó de dos maneras; Primero, evaluando en las gradientes de sacarosa a 3 tiempos post infección (6, 12, 18), la absorbancia de cada fracción, el RNA de cada fracción y el número de transcritos de VP2 IPNV de cada fracción. Segundo, se evaluó la misma cinética a los mismos tiempos post infección, pero adicionando 2 $\mu$ M del péptido GIM182, midiendo la expresión de los transcritos de VP1 y VP2 de IPNV.

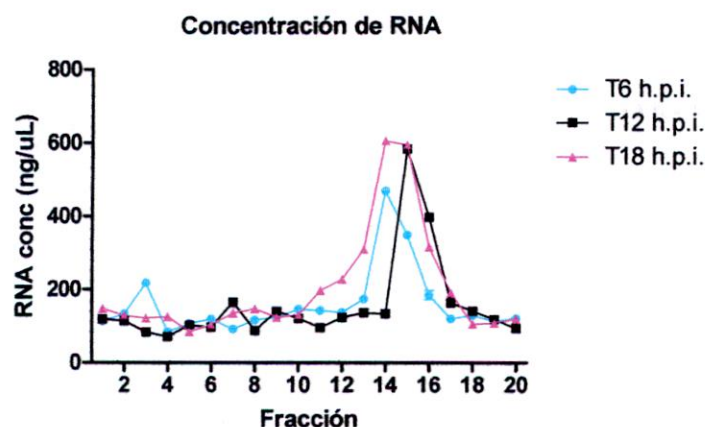
Evaluación n°1:

Medición de Absorbancias de fracciones polisomales en infección *de novo*.



**Figura 22:** Absorbancias, 260, 280 y tasa (260/280) en fracciones polisomales de células CHSE-214 infectadas con IPNV, 12 horas post infección y 18 horas post infección respectivamente.

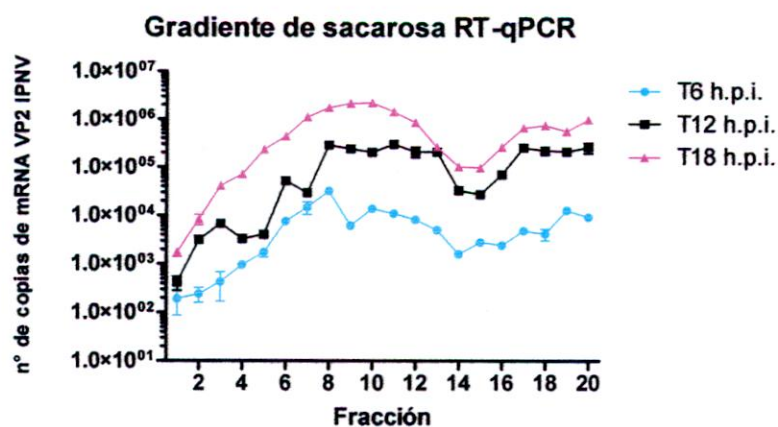
Se obtuvieron perfiles de absorbancias a 260 y 280nm de las fracciones polisomales obtenidas en las gradientes de sacarosa. En las fracciones finales es donde obtenemos los valores más altos de absorbancia, tanto a 260 como 280 nm. Observándose un *peak* entre la fracción 14 y 16 en ambas gradientes. Se discute que el *peak* en ambas gradientes corresponda al monosoma 80S como fue descrito por Warner *et al.* (1962). La última fracción debería corresponder a restos celulares que no lograron bajar por la gradiente de sacarosa y que presentan altos valores de absorbancia. Luego se extrajo el RNA de las fracciones polisomales.



**Figura 23:** Concentración de RNA total de fracciones polisómicas, en gradiente continua de sacarosa, de células infectadas con IPNV a 6, 12 y 18 horas post infección.

A una alícuota de cada fracción se le extrajo el RNA total por el método de trizol, y se graficó como muestra la figura 23, en donde podemos observar que entre la fracción 14-16 se obtuvo concentraciones de hasta 3 veces más que en el resto de las otras fracciones en los tres tiempos ensayados. Esto puede deberse a la alta absorbancia obtenida en estas fracciones, que denotan una alta densidad de moléculas en la fracción. Es importante hacer notar que el peak es mayor mientras más tiempo ha transcurrido desde la infección, es decir, el área bajo la curva es progresivamente mayor en los tres tiempos consecutivos ensayados.

Cuantificación de número de copias de IPNV por RT-QPCR real time. (Usando 1step Stratagene RT-qPCR real time Sybr Green).



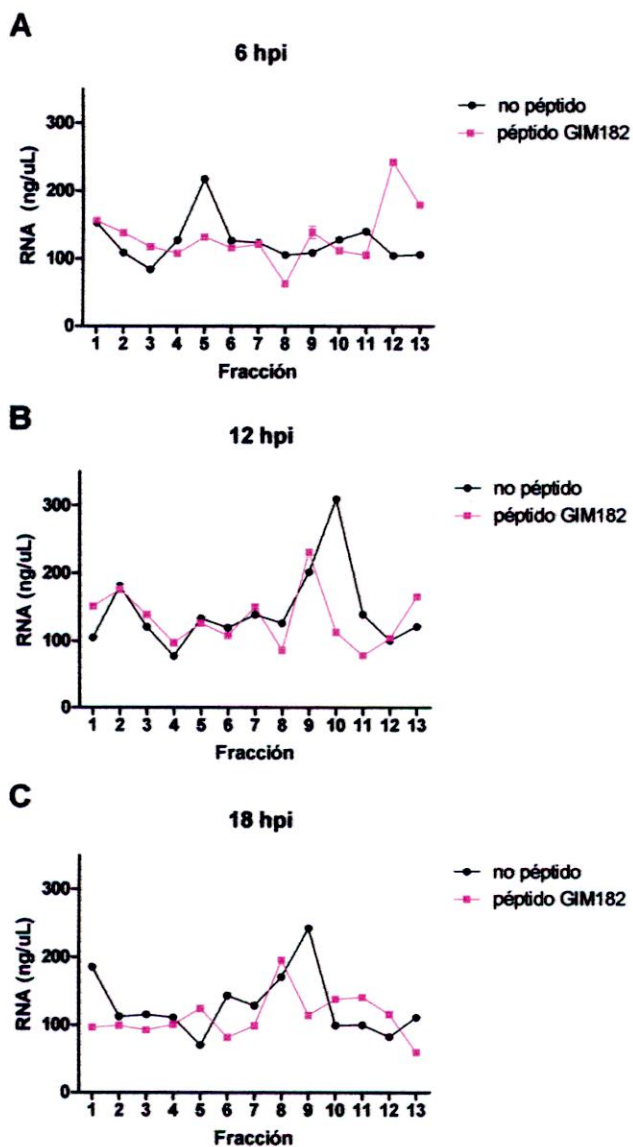
**Figura 24:** Expresión de VP2 IPNV en fracciones polisomales, en gradiente continua de sacarosa, en células CHSE-214 infectadas con IPNV a 6, 12 y 18 horas post infección.

Análisis de varianza ANDEVA de 2 vías (MGL)	F (2,60) = 1905,0	p = 0,00001	95% de confianza
---	-------------------	-------------	------------------

Se observa una distribución de la expresión de IPNV en los dos primeros tercios de la figura 24, en donde el aumento en la expresión de IPNV está dado por el tiempo post infección. Se observan diferencias absolutas de hasta 2 log (10) entre el tiempo 6 horas post infección y 18 horas post infección. Es decir a cada tiempo ensayado (6, 12 y 18 hpi) se observa un progresivo aumento en la síntesis de mensajes de IPNV.

Luego se realizó la caracterización de los polisomas, aplicando el péptido GIM182, y los valores obtenidos se muestran en las figuras 25, 26 y 27.

Cuantificación de RNA. (Extracción de RNA total con Trizol)

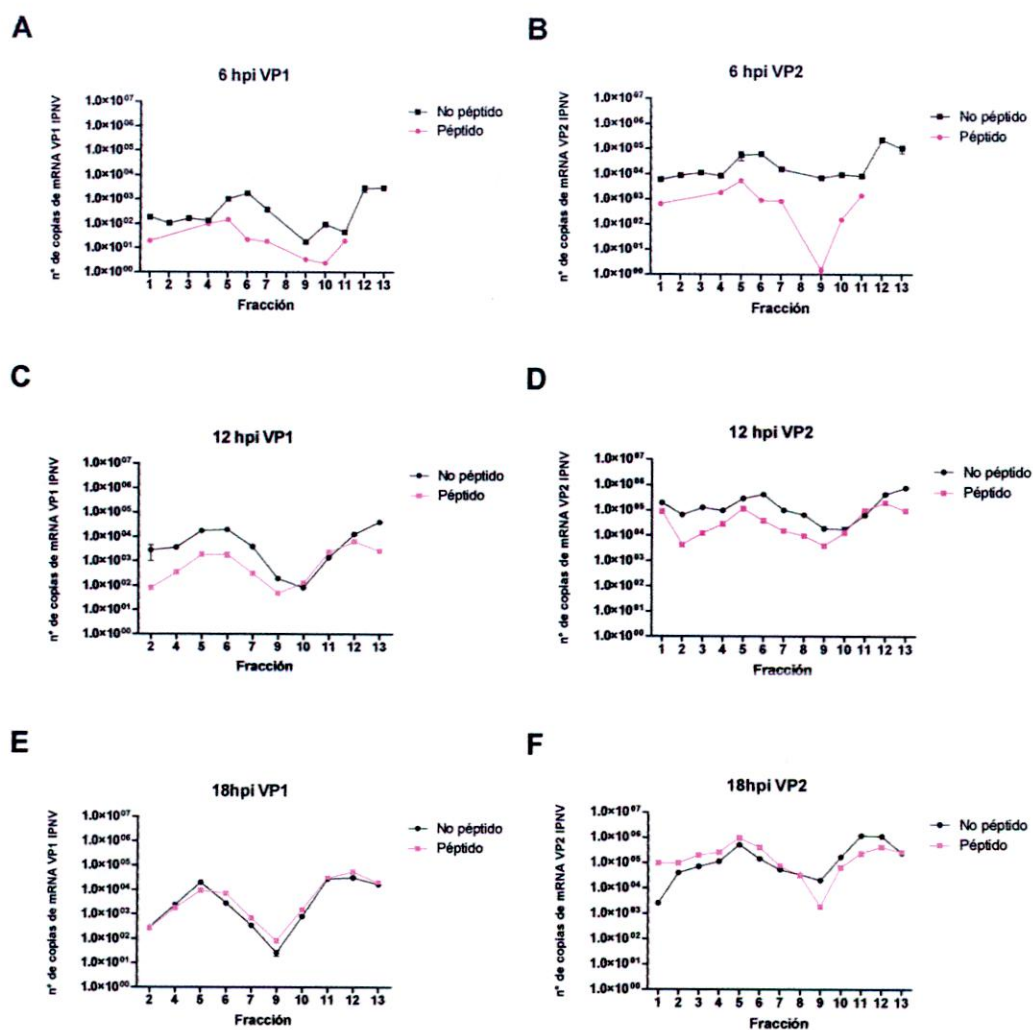


**Figura 25:** Concentración de RNA total de fracciones polisómicas, en gradiente de sacarosa, de células CHSE-214 infectadas con IPNV a 6, 12 y 18 horas post infección, con y sin péptido GIM 182.

El test estadístico, del modelo general lineal arrojó que las concentraciones de RNA a los tres tiempos ensayados no varían significativamente del control sin péptido. Aunque sin significancia estadística, en la figura 25 B se observa que al adicionar GIM 182, el RNA total obtenido es menor.

A continuación, en la figura 26 se graficó cada tiempo post infección evaluando VP1 y VP2.

Cuantificación de número de copias de IPNV por RT-QPCR real time. (Usando 1step Stratagene RT-qPCR real time Sybr Green).



**Figura 26:** Expresión de VP1 y VP2 en gradientes continuos de sacarosa, a 6, 12 y 18 horas post infección con IPNV. RT-PCR tiempo real con péptido GIM 182.

<b>A</b>	ANDEVA de 2 vías (MGL)	F (1,26) = 42,451	p = 0,00001	95% de confianza
<b>B</b>	ANDEVA de 2 vías (MGL)	F (1,26) = 73,815	p = 0,00001	95% de confianza
<b>C</b>	ANDEVA de 2 vías (MGL)	F (1,20) = 370,07	p = 0,00001	95% de confianza
<b>D</b>	ANDEVA de 2 vías (MGL)	F (1,26) = 150,72	p = 0,00001	95% de confianza
<b>E</b>	ANDEVA de 2 vías (MGL)	F (1,20) = 2,9243	p = 0,10272	95% de confianza
<b>F</b>	ANDEVA de 2 vías (MGL)	F (1,26) = 5,0957	p = 0,03261	95% de confianza

La evaluación de los polisomas nos permite evidenciar el estado de síntesis celular del mensaje viral y la síntesis de proteínas asociadas al mensaje. Lo primero a través de cuantificación por RT-qPCR tiempo real y lo segundo, por *western blott*, a las fracciones obtenidas en las gradientes de velocidad de sacarosa.

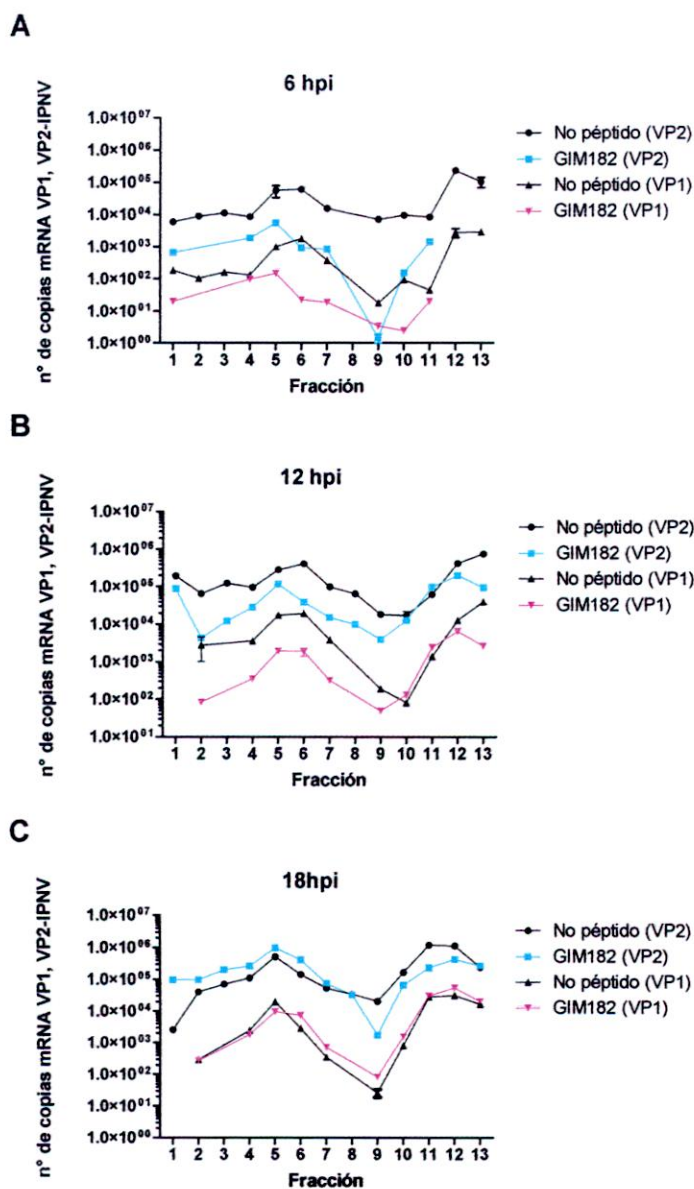
En el período de evaluación que fue tempranamente luego de la infección viral, a las 12 horas es posible apreciar claramente la disminución del número de copias de mRNAs de IPNV en el tratamiento con el péptido. A este tiempo es posible discriminar claramente la acción del péptido, disminuyendo a lo menos 10 veces la expresión de IPNV en las primeras fracciones polisomales.

Al tiempo 18 horas post infección la diferencia entre péptido y control sin péptido pierde significancia, como se observa en la tabla anterior (E, F).

El tiempo al que se obtuvo mayor significancia en las diferencias fue el tiempo 12 horas post infección, como se observa en tabla estadística (C, D).

En todos los tiempos, la expresión de VP1, la polimerasa viral fue siempre más baja que la expresión de la proteína de la cápsida VP2.

A continuación en la figura 27, se agrupan los valores de expresión de VP1 y VP2 en cada tiempo ensayado, en la infección *de novo*:



**Figura 27:** Expresión de VP1 y VP2 IPNV de células CHSE-214 infectadas *de novo* con y sin péptido, en gradientes de sacarosa. RT-PCR tiempo real.

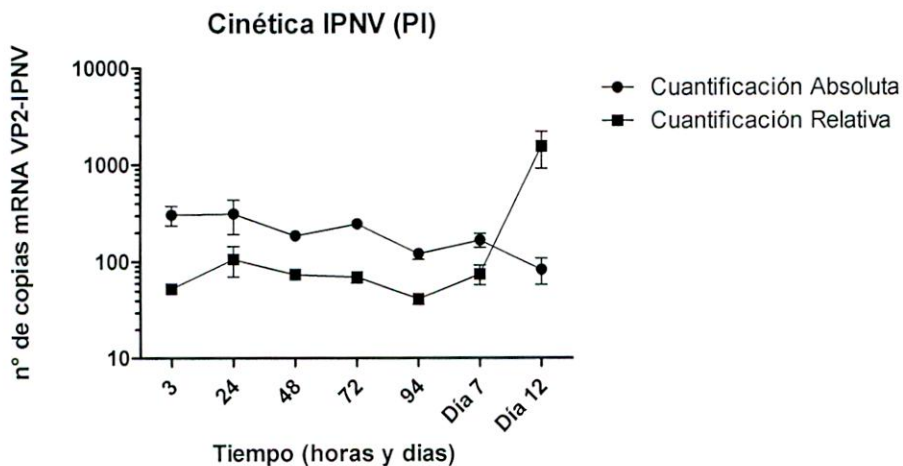
Comparando la expresión de VP1 y VP2 a los tres tiempos post infección, se puede decir que a tiempos tempranos (t6 hpi) la expresión de VP2 disminuye drásticamente, al tiempo intermedio (t12 hpi) aún se mantienen las diferencias significativas entre con y sin GIM 182, sin embargo a 18 horas post infección, los perfiles de expresión son similares.

**7.8. Evaluación del potencial interferente de los péptidos sintéticos sobre la expresión de la proteína VP2 de IPNV en la línea celular persistentemente infectada.**

- Cuantificación de transcritos blanco (VP1 y VP2) de IPNV por RT-PCR tiempo real.

Se propagó la línea celular CHSE-214 persistentemente infectada con IPNV NVI015, línea celular que no presenta efecto citopático y que fue proveída desde el laboratorio del Dr. Oystein Evensen de la Escuela de Medicina Veterinaria de Oslo, Noruega.

Estas células persistentemente infectadas tienen la capacidad de liberar partículas virales infectivas pero en una proporción 3 a 4 veces menor que una infección productiva, obteniéndose títulos virales de entre  $10^3$  y  $10^4$  partículas virales infectivas/ml, lo que desde un punto de vista técnico presenta ventaja versus la infección productiva ya que no es necesario agregar un inóculo de virus, además de no presentar efecto citopático y es posible aislar desde el sobrenadante, el RNA genómico, para cuantificación del número de copias de IPNV.



**Figura 28:** Cinética de infección de IPNV en células CHSE-214 persistentemente infectadas a diferentes tiempos. Evaluación mediante RT-PCR tiempo real. Se muestran la cuantificación absoluta del número de copias de IPNV y una cuantificación relativa normalizada con la expresión celular factor de elongación ELF 1 $\alpha$ .

Análisis de Varianza (ANDEVA) de 2 vías (GLM)	F (6,42) = 4,2601	p = 0,00194	95% de confianza
---	-------------------	-------------	------------------

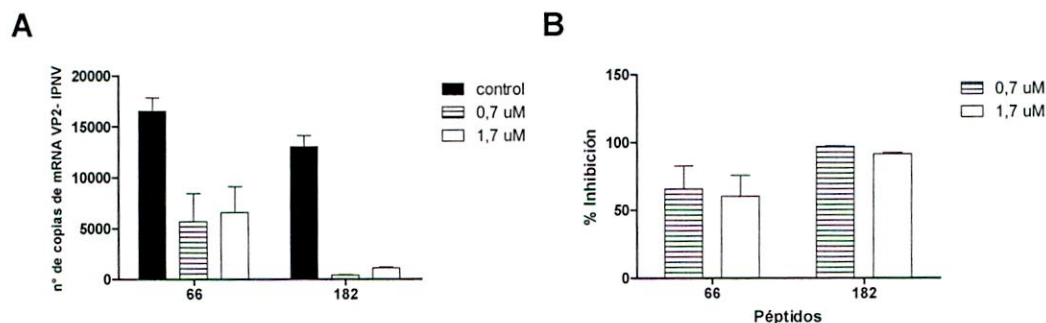
En la figura 28, podemos ver que la expresión de IPNV en la línea celular persistentemente infectada tiene valores relativamente bajos en comparación con la

infección productiva. Además, es posible señalar que si bien la tendencia es la misma, los valores entre cada cuantificación (absoluta y relativa) varían significativamente.

En el modelo de infección permanente con el virus IPN o infección no lítica, la expresión de transcritos de VP2 es significativamente diferente cuando se realiza la cuantificación absoluta en comparación a la cuantificación relativa al factor de elongación proteica EF1 $\alpha$ . Si bien la tendencia se mantiene en el tiempo de evaluación, la cuantificación absoluta es dos veces más que la cuantificación relativa. Se postula que para el trabajo con el modelo de células persistentemente infectadas, la evaluación con un sesgo menor es la que se realiza en relación a un gen de referencia.

Debido a la baja concentración de partículas infectivas liberadas en el medio, se puede establecer como ha quedado empíricamente, que los títulos obtenidos en este modelo de persistencia son bajos, del orden de las 200-40000 partículas /ml, obteniéndose los mayores títulos en células senescentes.

A continuación se evaluó el potencial interferente de los péptidos seleccionados.



**Figura 29:** **A**, Células CHSE-214 persistentemente infectadas con IPNV, inhibición de los péptidos 66 y 182 evaluando expresión de VP2-IPNV por TR-PCR tiempo real. Se les aplicó péptido por 4 horas y luego se lavó con PBS1X y luego se agregó medio de mantención. 96 horas post tratamiento se evaluó el número de copias de VP2 en el mRNA obtenido de IPNV en el sobrenadante, se extrajo RNA viral con Quiagen viral RNAeasy kit. Y se realizó el RT-PCR con el Kit: 1 step Stratagene RT-qPCR. **B**, Inhibición de expresión de VP2 IPNV en sobrenadante y células CHSE-214 persistentemente infectadas.

<b>A</b>	ANDEVA de 2 vías (MGL)	F (3,35) = 19,249	= p = 0,00001	95% de confianza
<b>A*</b>	ANDEVA de 1 vía (MGL)	F (3,43) = 4,6633	= p = 0,00658	95% de confianza
<b>B</b>	ANDEVA de 2 vías (MGL)	F (3,24) = 7,7169	= p = 0,00089	95% de confianza
<b>B**</b>	ANDEVA de 1 vía (MGL)	F (3,28) = 8,7312	= p = 0,0003	95% de confianza

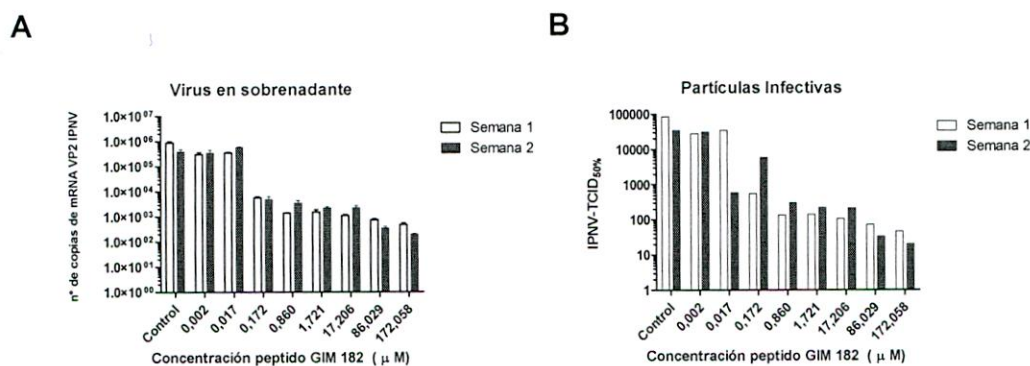
\* Al comparar la expresión de VP2 v/s el péptido

\*\* Al comparar el % de inhibición v/s el péptido

En la figura 29 B se puede observar que el péptido GIM 182 inhibe la expresión de VP2 en el modelo de infección persistente con mayor actividad que el péptido GIM 66, en B se muestran los valores de expresión de IPNV en función del porcentaje de inhibición.

En este modelo de infección persistente se obtuvo inhibiciones mayores a las obtenidas en el modelo de infección productiva, alcanzando hasta el 97% de inhibición en la expresión e infectividad de IPNV. Con el péptido GIM 182 se logró una inhibición mayor en la expresión de transcritos de VP2, que fue 30 veces menor que el control sin virus, demostrando su efectividad. Para corroborar el resultado obtenido también se realizó un ensayo de infectividad obteniéndose valores similares de inhibición.

Luego de obtener los péptidos con mejor actividad inhibitoria se procedió a optimizar la concentración de péptido a usar.



**Figura 30:** A, Expresión de IPNV en una gradiente de concentración con el péptido GIM 182, las nuevas copias de IPNV fueron detectadas (con partidores para VP2) en el sobrenadante y evaluado por RT-PCR tiempo real. B, Evaluación de diferentes concentraciones del péptido GIM 182 en su actividad inhibitoria, evaluado por TCID<sub>50</sub>%.

<b>A</b>	ANDEVA de 2 vías (MGL)	F (1,54) = 0,90279	p = 0,34627	95% de confianza
<b>A*</b>	ANDEVA de 1 vía (MGL)	F (8,63) = 28,234	p = 0,00001	95% de confianza
<b>B**</b>	ANDEVA de 1 vía (MGL)	F (8,9) = 4,1000	p = 0,02504	95% de confianza
<b>C***</b>	ANDEVA de 1 vía (MGL)	F (1,62) = 254,10	p = 0,00001	95% de confianza

\* Al comparar la expresión de VP2 v/s la concentración del péptido.

\*\* Al comparar TCID<sub>50%</sub> v/s la concentración del péptido.

\*\*\* Al comparar RT-PCR v/s TCID<sub>50%</sub>

En ambos gráficos de la figura 30, se optimizó la concentración a la cual el péptido inhibe mayormente, se definió la concentración de 500ng-1µg por pocillo en placas de 24 pocillos y se observa que la concentración adecuada corresponde a 1,7 µM.

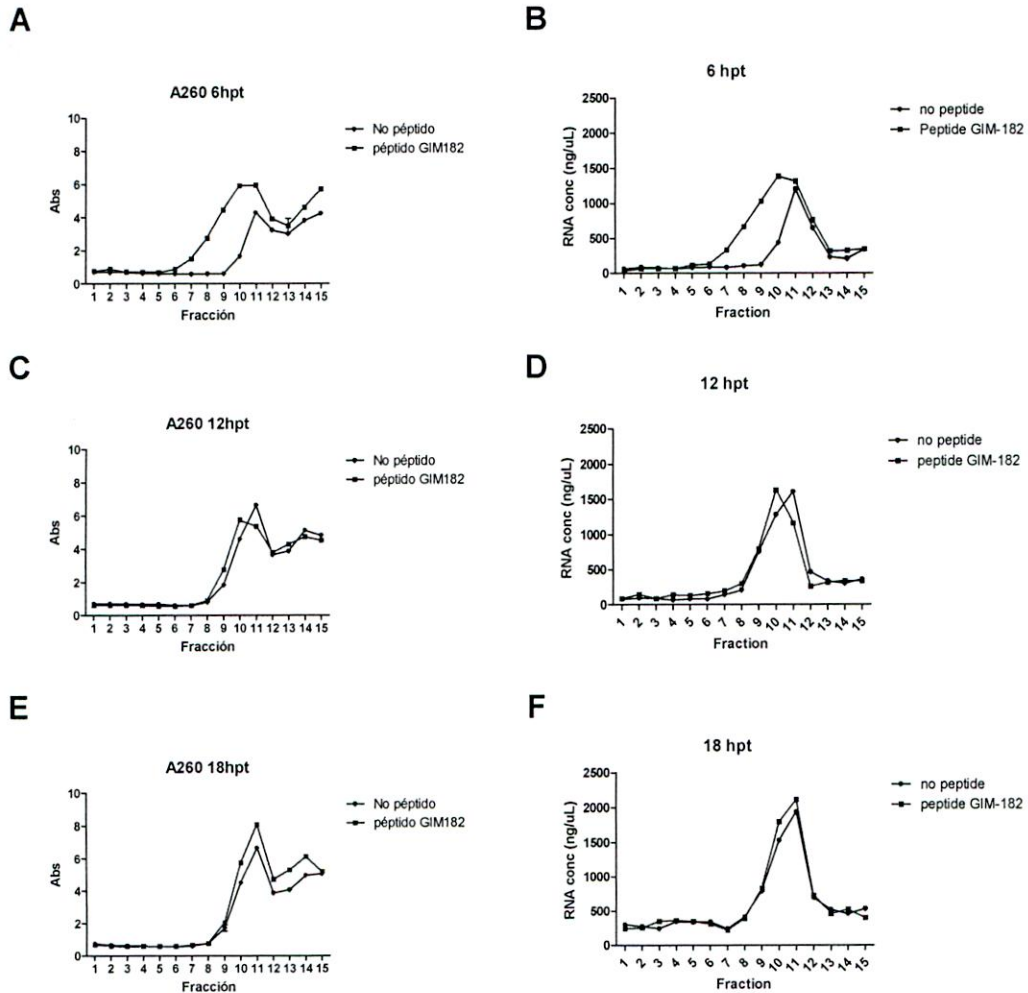
Se determinó también la concentración mínima a la cual se obtiene grado de inhibición, encontrándose que la concentración mínima es, 0,2µM; sin embargo cuando se realizó el mismo ensayo mediante TCID<sub>50%</sub> se determinó que el rango de acción óptima es de entre 0,2-2 µM.

Cuando se comparó los valores obtenidos por RT-PCR con los de TCID<sub>50%</sub>, se obtiene correlación entre ambos, demostrando que ambas evaluaciones permiten determinar la concentración óptima para el uso de GIM182 como inhibidor de la expresión de IPNV *in vitro*.

Caracterización de polisomas virales y la síntesis de proteína blanco VP1 y VP2, vía mRNAs:

a) Gradiente de Sacarosa fraccionada

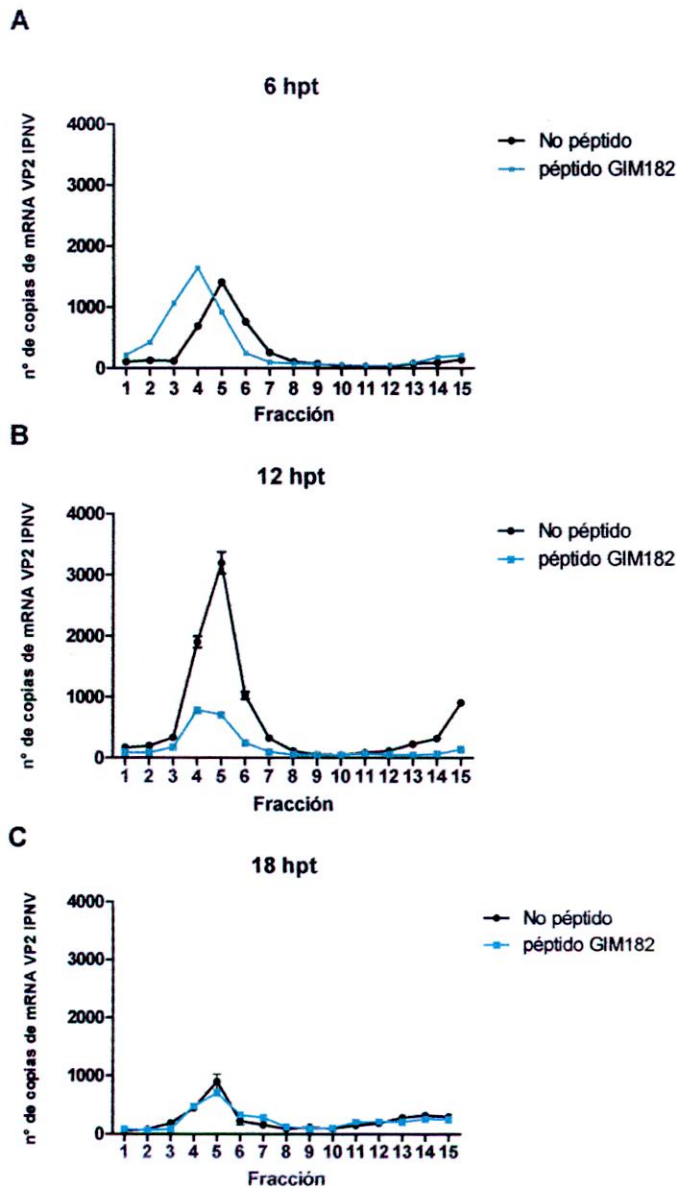
b) RT-PCR-tiempo real



**Figura 31:** Absorbancias 260nm y concentración de RNA total (ng/uL) en fracciones polisomales, en gradiente de sacarosa, de células infectadas con IPNV a 6, 12 y 18 horas post tratamiento, sin péptido y con péptido GIM 182 en el modelo de infección persistente.

<b>D</b>	ANDEVA de 2 vías (MGL)	F(1, 30)=265,23	p = 0,00001	95% de confianza
<b>E</b>	ANDEVA de 2 vías (MGL)	F(1, 30)=783,60,	p = 0,0001	95% de confianza
<b>F</b>	ANDEVA de 2 vías (MGL)	F(1, 30)=,00608,	p = 0,93835	95% de confianza

Así como se obtuvo en las gradientes del modelo de infección productiva, se obtiene un *peak* de absorbancia y de concentración de RNA total, en este caso, la infección persistente, el *peak* de absorbancia se encuentra entre las fracciones 10 -12.



**Figura 32:** Expresión de mensajes de VP2 de IPNV de fracciones polisómicas, en gradiente de sacarosa, de células CHSE-214 persistentemente infectadas con IPNV a 6, 12 y 18 horas post tratamiento, con y sin péptido GIM 182

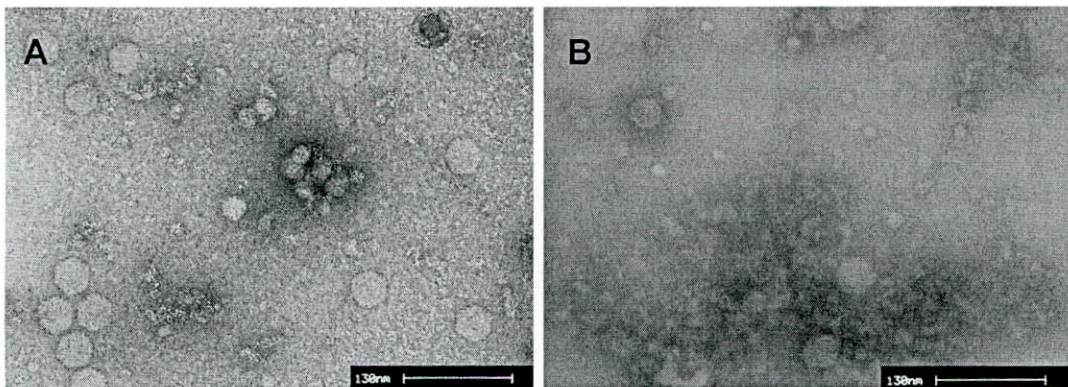
Con respecto a las gradientes de sacarosa donde se evaluó la expresión de VP2, a las 12 horas post tratamiento con el péptido la expresión con el péptido GIM 182 es significativamente menor que sin el péptido (800 copias de VP2 para GIM 182 v/s 3000 copias para el control sin péptido), demostrando su actividad. Sin embargo para poder

aseverar que la inhibición es a nivel del ensamblaje de la partícula viral, es necesario evaluar por microscopía electrónica, la concentración y estructura de la partícula (Imajoh *et al.*, 2007).

De todos los ensayos para obtener el perfil de expresión de la proteína VP2 mediante *western blott* en las fracciones polisómicas obtenidas tanto en el modelo de infección permanente como el modelo de infección productiva, se pudo evidenciar complejos proteicos de masa variable, pero no fueron concluyentes (datos no mostrados).

### 7.9. Microscopía electrónica de transmisión

Se fotografió muestras obtenidas de una infección celular con IPNV tratada con el péptido GIM182 y sin el péptido observándose diferencias en ambos casos. La siguiente figura muestra en A a las partículas virales en una concentración mayor que en B, donde es aplicado 10 $\mu$ M de péptido GIM182. En B también es posible apreciar artefactos simétricos de menor tamaño, atribuidos a ensamblajes de otras proteínas del virus que no están conformando viriones. Si bien la abundancia relativa de viriones en cada muestra es diferente, no se realizó una cuantificación exhaustiva del contenido de cada muestra, que permita aseverar una diferencia significativa entre los dos diferentes tratamientos.



**Figura 33:** Micrografía electrónica de transmisión de sobrenadantes de células CHSE-214 infectadas con IPNV, tratadas y no tratadas con el péptido GIM 182, 36 horas post infección. Mediante tinción negativa con acetato de uranilo 1%. Aumento 120.000 veces.

Al igual que lo observado en los trabajos de Romero *et al.* (2004), Imaho *et al.* (2007), Pan *et al.* (2007), Oña *et al.* (2003), Maraver *et al.* (2003) y Martínez-Torrecuadra *et al.*

(2000), entre otros que han demostrado que hacer mutantes de las diferentes proteínas de la poliproteína, alteran el ensamblaje normal de las partículas virales produciendo estructuras similares a las obtenidas en este trabajo. Se cree que estas estructuras más pequeñas con estructura pseudoicosahédrica pudieran ser agregaciones de pVP2 o VP2 a medio ensamblar. Las partículas virales tienen un tamaño estimado de entre 55 y 62nm. Los artefactos simétricos observados en B tienen diámetro aproximado de 18nm.

#### 7.10. Selección del o los mejores péptidos interferentes.

- Selección de los péptidos con mayor actividad inhibitoria

Luego del diseño y síntesis química de los péptidos, se probó una batería compuesta por más de treinta y dos péptidos derivados de IPNV, los que fueron evaluados por RT-qPCR tiempo real, de los cuales sólo cuatro lograron inhibir en algún grado la expresión de IPNV. De los cuatro péptidos seleccionados 2 y se hicieron los diferentes ensayos y pruebas (péptidos GIM 66 y GIM 182).

Se seleccionó el péptido **GIM 182** como el que logró una inhibición mayor en la expresión del virus IPN *in vitro* inhibiendo en mayor medida la síntesis de mensajes en el modelo de infección persistente; por el contrario, el péptido **GIM 66** que si bien disminuyó de manera categorica los títulos obtenidos en modelo de infección *de novo*, el largo de su secuencia hace inviable su candidatura como herramienta biotecnológica principalmente por el costo asociado a su síntesis.

## 8. DISCUSIÓN

El ensamblaje de viriones de la familia Birnaviridae, especialmente para sus representantes IBDV en aves e IPNV en peces, requiere de la formación de una tríada de monómeros de la proteína VP2, la componente estructural más relevante del virión tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, para gatillar un proceso sinérgico aparentemente irreversible que permitirá asociarse al RNA genómico y la formación de una partícula infectiva madura dentro de la célula infectada. Esta, concomitantemente podrá ser yemada, o simplemente liberada al medio externo como producto de la lisis celular, máxima expresión del efecto citopático viral. Este proceso, evidenciado por el análisis cristalográfico del virus IBDV, presenta homologías indiscutibles con IPNV, que a diferencia de su par en aves, se manifiesta, patológicamente, como un estado de persistencia en peces salmonídeos, situación que en cultivo confinado con fines comerciales representa una verdadera “bomba de tiempo”, pues al estar activo pero controlado en el estado de persistencia, puede, en cualquier momento manifestarse en plenitud, muy especialmente ante situaciones de estrés, reconocidos en los estados tardíos en jaulas de peces en pre-cosecha, con la serie de impactos que ello involucra.

En este marco referencial, esta tesis tuvo su génesis frente a la innovadora estrategia discutida en la literatura del uso de péptidos como una alternativa viable para controlar la persistencia en virus de RNA, especialmente eficientes al día de hoy para la familia de los Ortomixovirus, donde destaca el virus de la influenza humana (Ghanem *et al.*, 2007).

Asociamos entonces, el conocimiento del proceso de ensamblaje del virus y el acabado detalle de la estructura del virus IBDV con especial énfasis de su proteína VP2, con el de su hermano en familia IPNV (Coulibaly *et al.*, 2010), para diseñar una batería de péptidos que pudiesen interferir con el proceso de ensamblaje de éste último, desde estados muy tempranos en la célula infectada. Estos péptidos, todos ellos componentes de dominios de la proteína VP2 y/o de sus precursores, debían cumplir con una serie de criterios estrictos, donde destacaban los siguientes: no tener homología con secuencias pares celulares, no ser tóxicos para las células hospederas, ser de un tamaño discreto para favorecer su síntesis, tener una estructura y composición que permita un ingreso pasivo a las células, ser estables dentro de ellas y

demostrar una alta actividad específica para que su aplicación pase casi desapercibida en el entorno celular en que se aplicaría.

A pesar de que ninguno de los péptidos analizados logra inhibir en su totalidad la síntesis de RNA viral, el modelo representa un avance sustancial en el uso de terapias biocompatibles, de amplio espectro en administración y de efecto específico contra este patógeno, sobretodo en su estado de persistencia. Hemos demostrado en este trabajo que de 32 péptidos sintetizados y evaluados inicialmente, dos de ellos cumplían a cabalidad con los requisitos impuestos, siendo ellos los péptidos GIM 182, el mejor, de 11 residuos, y el GIM 66, de 20 amino ácidos de largo. El primero, altamente eficiente tanto *in vitro* (esta tesis) como *in vivo* (laboratorio hospedante) que se encuentra en proceso de protección intelectual. El segundo, también de alta eficiencia *in vitro* presenta además, por su carácter anfipático y estructura flexible, una interesante actividad antimicrobiana que ha permitido tener dos publicaciones ISI aceptadas, la primera en prensa y la segunda en revisión (Anexo ).

En resumen, ambos péptidos son capaces de interferir en forma significativa a la expresión del virus *in vitro* en los dos modelos de evaluación presentados: el primero, de infección *de novo*, donde es un esquema semi-sincronizado de parte de un estado no infectado a la expresión máxima del virus al generar la destrucción de la célula y la liberación de un número significativo de partículas infectivas, permitiendo un amplio rango de oportunidades de evaluar el efecto de los péptidos. El segundo, de un sistema persistentemente infectado, donde la actividad viral es constante, aparentemente no sincronizada, donde todos los niveles de expresión viral están representados, pero en una condición cuantitativa muy basal y controlada, condición que permite detectar a un nivel estricto el eventual efecto interferente de los péptidos.

Consideramos que esta tesis es un aporte a la búsqueda de antivirales, especialmente para casos de persistencia viral donde la única posibilidad de interferir es “desde dentro” de las células aparentemente sanas. De ser así, la otra característica distintiva que a nuestro juicio presentan los péptidos que tienen como blanco específico el ensamblaje, es que dependen de las innumerables variantes, principalmente patogénicas, asociadas a los virus de RNA, del que IPNV no constituye excepción: el proceso inhibitorio sería sobre una actividad independiente de la patogénesis y común para cualquier virus de la familia, es decir, su ensamblaje específico. Proponemos entonces que estos pequeños péptidos compiten con los epítopes funcionales de las proteínas de los cuales fueron obtenidos contienen en sus grupos activos que

formando oligómeros que impiden la concreción de un proceso gatillado sinérgicamente y con una relación estequiométrica precisa que de no estar, anula el proceso. Recientemente, este enfoque fue reportado para la polimerasa del virus de la influenza humana (Ghanem *et al.*, 2007).

Estudios con GIM 182. Primero, realizamos una cinética de infección para definir los mejores tiempos para aplicar y evaluar los péptidos. En todos los casos se usó como referencia un gen celular reportero, en nuestro caso el validado en nuestro laboratorio para éste propósito, el correspondiente al factor de elongación 2 de la biosíntesis proteica. Estimamos que la concentración adecuada de péptido fue del rango 1.0 – 2.0  $\mu\text{M}$  1000 veces inferior a la que presenta un 50% de toxicidad celular. El tiempo de exposición al péptido fue, en los experimentos que fue removido, de 4 horas, tiempo en el cual el péptido está íntegro dentro de la célula.

A continuación se presenta una tabla resumen de los ensayos más relevantes con los péptidos GIM 66 y GIM 182, que permiten visualizar el panorama general de actividad de los péptidos propuestos.

Porcentaje de Inhibición frente al control de los péptidos analizados.

**Tabla 8.1.** Tabla resumen general de resultados

	<b>Modelo de novo (%)</b>	<b>Modelo PI(%)</b>
<b>RT-qPCR</b>		
GIM 66	29,8	76,0
GIM 182	36,2	<b>97,0</b>
<b>Títulos (partículas infectivas/ml)</b>		
GIM 66	<b>99,9</b>	3,3
GIM 182	34,3	38,8

En el modelo de infección persistente, ambos péptidos inhiben significativamente y se hace notoria debido a la relación estequiometrica que presenta entre el número de moléculas peptídicas entregadas y a la carga viral aparente dentro de este modelo de infección. En el modelo de infección productiva se observa inhibición, sin embargo, la alta tasa sintética de moléculas virales, hace menos evidente la actividad de los péptidos. El hecho que GIM 66 no inhiba la expresión de partículas virales infectiva en el modelo persistente, es un resultado no esperado, sin embargo, su acción se ve claramente reflejada cuando es aplicado en el modelo de infección productiva donde la inhibición lograda hace interesante desde un punto de vista profiláctico. Con los

antecedentes presentados en la tabla anterior podemos aseverar que ambos péptidos tienen actividad frente a diferentes blancos virales, en concordancia al diseño inicial.

La evaluación de los perfiles polisomales nos indica el comportamiento de la transcripción involucrada en la síntesis proteica viral. Al adicionar el péptido GIM 182, el perfil normal de polisomas se ve desplazado hacia la zona más liviana de la gradiente, lo que se traduce en mensajes de menor tamaño y una síntesis proteica menor.

Otro antecedente que nos permite aseverar la actividad del péptido GIM 182 es la imagen obtenida de tinción negativa por microscopía electrónica de transmisión donde podemos observar que en la infección tratada con el péptido, se producen estructuras pseudo icosaédricas de menor tamaño y una concentración de partículas virales menor que a la infección sin el péptido, es decir se produce una interferencia en el ensamblaje viral. Al realizar la tinción de estructuras celulares, se pudo observar que el ensamblaje viral realizado en vacuolas en el citoplasma celular está fuertemente desregulado, alterando las formas y tamaños clásicos de una infección con IPNV.

### **8.1. Péptidos: Diseño, efecto, incorporación.**

Como ha quedado explícito en el trabajo, los péptidos sintetizados a partir de secuencias de IPNV tienen la capacidad de traspasar la membrana celular de la línea celular CHSE-214. Una evidencia de la movilidad de los componentes peptídicos a través de las células fue descrito por Carpintero *et al.* (2007), quienes pudieron observar el paso de diferentes péptidos a través de las membranas celulares.

Se discute el efecto de los péptidos respecto a su conformación estructural y carga neta, ya que la mayoría de los péptidos que presentan anfipaticidad, estructura helicoidal y carácter catiónico, interactúan con las membranas celulares, sin embargo, los péptidos con una carga neutra pasan a través de las membranas celulares (Alonso C, 2007 com. pers.).

En cuanto al péptido GIM 66, que es un análogo del péptido p46 (20 aminoácidos del extremo amino-terminal de p46) descrito por Galloux *et al.* (2007), quien demostró que aquel péptido es el actor central en el mecanismo de entrada de los Birnavirus, además demostró que el diámetro promedio del poro formado por la desestabilización

de la membrana lipídica es de 5-8 nm de diámetro, y que corresponde a un péptido protector osmótico, es decir, protege a los eritrocitos de la hemólisis.

Es importante notar además que el extremo amino-terminal del péptido p46, es decir p22 de Galloux, comprende el dominio perforante del péptido p46 y produce poros con diámetro entre 4-6 nm. Estos resultados relevantes en el mecanismo de entrada fueron obtenidos mediante análisis de Calorimetría Diferencial de barrido (DSC), Resonancia de Onda guiada de Plasmones (PWR) y espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) con los cuales se pudo obtener la posición particular del péptido sobre la membrana lipídica. También demostraron (Galloux *et al.*, 2007) que p22, el análogo de GIM66, posee una estructura  $\alpha$ -hélice, al igual que el extremo amino-terminal del p46 y que los primeros 15 aminoácidos se penetran en la micela.

Galloux *et al.* (2010), siguiendo el estudio anterior determinó que la zona contenida entre los residuos 14-22 del p46 (en nuestro análogo GIM 66: aminoácidos 14, 15, 17 y 18) corresponde a un dominio fuertemente hidrofóbico: aquellos residuos se ven fuertemente afectados cuando son tratados con ácido 5'-o 16'-dioxil esteárico, como por ejemplo Ala-14, Val-15, Val-17, Val-18 y Phe-22. Aquellos residuos hidrofóbicos están ubicados en la misma disposición de p46 (14-22) y constituyen la plataforma hidrofóbica del péptido.

Los resultados obtenidos por Galloux implican que, la interrupción de la hélice provocada por el residuo Pro-16 es probablemente crucial para la actividad de permeabilización de p46. La ocurrencia de hélice interrumpida también fue reportada y está presente en el péptido- $\gamma$  del *Flock House Virus* (nodavirus) (Maia *et al.*, 2006) y en otros péptidos antimicrobianos como la Gaegurina (Park *et al.*, 2002), Maculatina (Chia *et al.*, 2000), Buforina II (Park *et al.*, 2000), y Melittina (Terwilliger *et al.*, 1982).

Con respecto al diseño de péptidos es necesario conocer de antemano los costos de cada aminoácido y el largo de la secuencia a sintetizar, debido a que el tamaño es un aspecto relevante y a la vez un punto crítico en la síntesis de péptidos para uso en terapias. Por ejemplo, lisina y arginina, que poseen grupos reactivos protegidos, tienen un precio muy por encima de los otros aminoácidos disponibles, además, el largo del péptido constituye un rasgo importante: mientras menos residuos aminoácidos contenga el péptido menos costoso es sintetizarlo. Es destacable la relevancia e implicancia de esta consideración, debido a que cuando se obtiene un péptido con la actividad deseada, es menester comenzar el proceso de optimización de la secuencia, de manera de determinar los aminoácidos importantes en ella (la secuencia) y la posibilidad de reemplazarlos por otros menos costosos (Scan-Alanina).

## 8.2. Mecanismos de acción de los péptidos antivirales

Existen diferentes procesos por los cuales péptidos pueden inactivar virus. Un ejemplo de péptidos naturales con actividad antiviral son las defensinas, una familia de péptidos que se encuentran en leucocitos de vertebrados y también de invertebrados. Estos péptidos fueron probados contra virus envueltos como: Virus del herpes simple (HSV) tipo 1 y 2, Citomegalovirus (CMV), Virus de la estomatitis vesicular (Rav) e Influenzavirus A y virus no envueltos como: Echovirus tipo 11 y Reovirus tipo 3 (Reo-3). Sorprendentemente al incubar el péptido con cada aislado viral, sólo se inactivaron los primeros y los virus no envueltos no pudieron ser inactivados, demostrando que la defensina HNP-1 solamente actúa en la envoltura lipoproteica del virus (Daher *et al.*, 1986).

Otro péptido antiviral, S1S5, perteneciente a la familia de las dermaseptinas fue evaluado como agente antimicrobiano contra el Virus del herpes simple (HSV1) encontrándose inhibición sólo al incubar la dermaseptina antes de la infección con el virus. Este hecho revela que existe una inhibición de la capacidad de infectar por parte del péptido (Belaid *et al.*, 2002) sin embargo, no previene la infección si es expuesto al péptido durante la infección.

Un medio de actividad antiviral novedoso es el que actúa en el escape del virus posterior a su entrada al endosoma, Horne *et al.* (2005) describe que un péptido cíclico tiene la capacidad de entrar con el adenovirus a la célula hospedera inhibiendo la capacidad de acidificar el endosoma y posterior entrada al citoplasma celular.

Según los estudios realizados por Galloux (2007 y 2010) el péptido p22 derivado de p46 (extremo carboxi-terminal de la proteína pVP2) parece situarse en la superficie de la membrana al igual que algunos péptidos pro-apoptóticos como Bax (García-Saéz *et al.*, 2007), el Péptido Cazador-asesino (Plesniak *et al.*, 2004), así como también péptidos antimicrobianos, como Gramicidina (Prenner *et al.*, 2001), Magainina (Matsuzaki *et al.*, 1991; Bechinger *et al.*, 1993), PGLa (Latal *et al.*, 1997), Piscidina (Campagna *et al.*, 2007) y LL-37 (Henzler-Wildman *et al.*, 2004).

Además Galloux (2010) propone que p46 y su análogo p22 (GIM66), se agregan y su multimerización produciría un efecto en la desestabilización de la membrana, bajo ciertas condiciones (Hristova *et al.*, 2001; Takei *et al.*, 1998).

Coulibaly *et al.* (2005) muestra en el modelo terrestre de Birnavirus (IBDV) que la liberación de las 780 copias de p46 presentes en la partícula viral, dentro del endosoma, son probablemente suficientes para inducir la agregación y la formación de poros, favoreciendo la entrada del virus.

Se puede prever que el extremo amino-terminal de pep46 (pep22), dependiendo de su concentración, se comporta como péptido antimicrobiano, lo que fue descrito por Jofré *et al.* (2011) para el extremo amino-terminal de p46 (GIM66), con la formación de poros toroidales. Como ya se ha informado en el caso de reovirus (Ivanovic *et al.*, 2008), los poros formados son de tamaño insuficiente (alrededor de 10nm) para el paso de una partícula de virus. En efecto, los poros formados por pep46 son 10 veces más pequeño que la partícula de IBDV (700Å de diámetro) (Coulibaly *et al.*, 2005)

La mayoría de los péptidos naturales antimicrobianos descritos que han sido probados en su capacidad antiviral, actúan antes de que éstos penetren la membrana celular del hospedero. Es muy novedoso que un péptido obtenido de la secuencia del mismo virus tenga una actividad antiviral que actúe desde dentro de la célula.

Un número creciente de nuevos péptidos antimicrobianos (AMPs) de diferentes organismos son regularmente reseñados con sus características e implicaciones biológicas (Rege *et al.*, 2007; Izadpanah y Gallo, 2005). Sin embargo, entre los cientos de AMP identificados, sólo unos pocos presentan funciones antimicrobianas y son considerados como candidatos potenciales contra los patógenos.

Otros péptidos antimicrobianos aislados, son las hepcidinas de Tilapia (THs), TH1-5, TH2-2 y TH2-3 que han sido evaluadas en su carácter antimicrobiano (Pan *et al.*, 2007; Rajanbabu *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2007) al igual que el péptido GIM66 de IPNV (Jofre *et al.*, 2011). Importante es el reporte de Rajanbabu *et al.* (2011) quien probó el efecto de un péptido antimicrobiano en la infección con IPNV en el mismo modelo celular que el usado en la presente investigación.

### **8.3. Péptidos y funciones antivirales**

En estudios de evaluación de la respuesta antiviral por parte del hospedero, generalmente se utiliza el ácido poliinosínico-policitídílico (poly(I:C)) como control positivo de respuesta. Poly (I:C) es un análogo sintético del RNA de doble hebra (dsRNA), que produce un patrón de respuesta antiviral, asociado al receptor tipo Toll

(TLR-3), demostrándose en estudios con Poly (I:C), la actividad antiviral del péptido TH1-5 (Huang *et al.*, 2007).

La transfección de células CHSE-214 con Poly (I:C) induce un estado antiviral contra IPNV, a través de la inducción de proteínas antivirales, según lo informado por Jensen *et al.* (2002). Además se ha reportado que Interferón alfa/beta (IFN $\alpha/\beta$ ) produce un estado antiviral contra IPNV, tanto *in vitro* como *in vivo* (Larsen *et al.*, 2004).

Por otro lado, hubiese sido importante también evaluar la respuesta inmune de las células hospedera en la administración de nuestra terapia a base de péptidos. Para el caso del péptido TH1-5 (Rajanbabu *et al.*, 2011), se estudió la expresión de diferentes genes asociados a la infección patogénica, para poder determinar el mecanismo molecular de acción, los genes que se evaluaron fueron annexina (Chiu *et al.*, 2010), interleukina (IL) (Chiu *et al.*, 2010), Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- $\alpha$  (Johansen *et al.*, 2004), Meta (Kling y Olsson, 2000), Metb (Kling y Olsson, 2000), MHCI (Jørgensen *et al.*, 2006), MHCII (Kim *et al.*, 2000) y VISP (Cho *et al.*, 2002).

Varios péptidos antimicrobianos han sido reportados con función antiviral (Kovalchuk *et al.*, 2007; Wachinger *et al.*, 1998; VanCompernelle *et al.*, 2005). Rajanbabu *et al.* (2011) evidenció que aplicando el péptido TH1-5 hasta concentraciones de 125 mg/ml, no causa inhibición de la proliferación celular en la línea CHSE-214, durante un máximo de 48 horas. Además, el co-tratamiento de TH1-5 con IPNV en una MOI de 0,1, controla la infección con IPNV y el nivel de control de la infección se ve aumentado junto con un aumento de la concentración del péptido.

Se destaca que la concentración que se empleó en ésta investigación está muy por debajo de la concentración utilizada en el trabajo de Rajanbabu, ya que ellos utilizaron una concentración de entre 25-100mg/ml y en el presente trabajo se usaron entre 0,01 y 0,1mg/ml. Es importante hacer notar también que el péptido GIM66 en el ensayo de placa (inmunofluorescencia) pre incubado justo antes de la infección con IPNV, muestra una actividad antiviral, disminuyendo la carga viral en al menos 4 logaritmos de concentración, a una concentración de 0,1mg/ml, que es significativamente mejor a lo expuesto por Rajanbabu, que obtuvo una actividad antiviral por parte del péptido TH1-5 cuando era expuesto a la infección con IPNV en la línea celular CHSE-214, a concentraciones varias veces mayores, utilizando una metodología similar de identificación de las partículas virales que son liberadas post infección.

#### 8.4. Virus IPN v/s otros virus

Se postula que el virus IPN presenta el péptido 22 (Galloux *et al.*, 2007) o el análogo del péptido GIM 66 sintetizado en esta investigación, cuando se presenta en la superficie celular, donde se fusiona la partícula viral a la célula, es adsorbida por la membrana celular (Espinoza *et al.*, 2000). Es posible inferir lo propuesto anteriormente principalmente debido a los reportes de Jhan y Südhof (1999), donde Influenzavirus A y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) presentan péptidos anfipáticos, al igual que el nuestro, que son insertados en las membranas celulares, reorientándolas e induciendo una desestabilización de la capa lipídica celular.

Es un hecho que los virus constituyen maquinarias transcripcionalmente competentes que pueden traspasar membranas para actuar en el citoplasma celular del hospedero. Sin embargo la capacidad de infección y el tipo de hospedero está definida en el genoma particular de cada virus. Siendo relevante que: la estructura de la cápsida, la característica de envueltos o no por una cubierta lipoproteica, y la singularidad del genoma de cada virus, es una estrategia particular para cada familia de virus. Por esta razón es que para poder entender el mecanismo de propagación de IPNV en células susceptibles a su infección, es necesario entender primero de qué manera actúan todos los Birnavirus, sus características principales y luego cómo actúan otros miembros de los virus no envueltos, como lo son los adenovirus, feline calicivirus y echovirus, entre otros.

Según lo expuesto por Galloux *et al.* (2010) la entrada de los birnavirus se produce luego de la interacción entre la partícula viral y la célula hospedera, produciéndose una invaginación de la membrana plasmática que contiene la partícula (endosoma) donde posteriormente se produce una liberación, desde la partícula, de múltiples copias del péptido p46 (780 copias aproximadamente por partícula) el que se agregaría y produciría la disrupción de la membrana del endosoma y una posterior liberación de la partícula viral al citoplasma celular del hospedero.

## 8.5. Ensamblaje

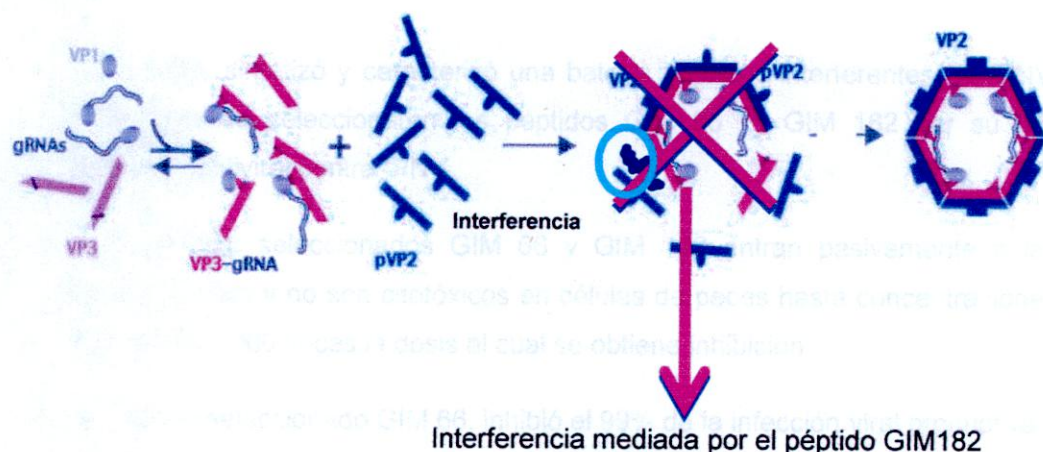
El proceso de ensamblaje del virus IPN ha tratado de ser dilucidado por varios autores; sin embargo los trabajos más concluyentes son los de Chevalier *et al.* (2002) y Villanueva *et al.* (2004) que destacan el procesamiento de la poliproteína por parte de la proteasa viral VP4, que hace madurar la poliproteína clivando las proteínas de la cápsida para que posteriormente se ensamblen y además indican que el proceso final de maduración de la partícula radica en una disminución de tamaño, principalmente debido al clivaje final de pVP2 en VP2, lo que hace que se ensamble la partícula en un virión. Imaho *et al.* (2007), Pan *et al.* (2007), Oña *et al.* (2003) Maraver *et al.* (2003) y Martínez-Torrecedra *et al.* (2000) entre otros, han demostrado que hacer mutantes de las diferentes proteínas de la poliproteína, alteran el ensamblaje normal de las partículas virales generando estructuras similares en forma pero de diferente tamaño y crean túbulos que finalmente no son transformados en partículas virales funcionales. Destacan además la interdependencia de todas las proteínas del virus en el correcto ensamble de los viriones, haciendo hincapié en la relación que tiene VP2 con VP3, la interacción que tiene VP3 con VP1 y el material genómico, y la especificidad del sustrato por parte de la proteasa viral VP4. Todos estos factores hacen que sea posible un correcto empaque de la partícula viral.

## 8.6. Interferencia de péptido en el ensamblaje de IPNV

Según los datos obtenidos en los experimentos realizados en la obtención de los polisomas virales en células CHSE-214 infectadas con IPNV, se infiere que la actividad antiviral del péptido 182 estaría inhibiendo la expresión de VP2 y por consiguiente imposibilitando el ensamblaje normal de la partícula viral competente. Sin embargo no es capaz de inhibir totalmente la expresión y generación de nuevas partículas virales.

Otro antecedente que permite aseverar la actividad del péptido 182 es la imagen obtenida por microscopía electrónica de transmisión donde es posible observar que en la infección tratada con el péptido, se producen estructuras pseudo-icosaédricas de menor tamaño y una concentración de partículas virales menor que en la infección sin la administración de péptido.

Se propone el siguiente esquema, como modo de acción de nuestro péptido.



**Figura 34:** Esquema de Inhibición del ensamblaje de IPNV mediado por el péptido GIM182.

En consecuencia, el péptido 182 estaría desestabilizando la interacción VP2-VP2 y VP2-VP3, ya que ambas interacciones son claves en el ensamblaje viral de IPNV. Sin embargo, no es posible demostrar el grado de disminución de síntesis de las proteínas virales en los aislados polisomales cuando se aplica el péptido 182, debido principalmente a que la inmunotipificación de los aislados polisomales no pudo ser llevada a cabo con éxito. Hay pocos antecedentes que faculten demostrar la inhibición de la actividad viral utilizando polisomas. Bittencourt *et al.* (1997) demostró que el virus Mayaro (alphavirus) en infección de células de mosquito *Aedes albopictus* es inhibido debido a un choque térmico, disminuyendo la expresión y síntesis de la proteína viral de la cápsida (p34) en aislados polisomales.

En conclusión, faltan antecedentes para poder demostrar la real acción de los péptidos 66 y 182, es decir antecedentes de respuesta inmune, mecanismos de acción molecular, vías metabólicas que se ven afectadas en la infección, etc. Se espera que futuros trabajos puedan identificar más acertadamente, bajo cual mecanismo de acción se desencadena la respuesta antiviral.

## 9. CONCLUSIONES

- Se diseñó, sintetizó y caracterizó una batería péptidos interferentes de IPNV, finalmente se seleccionaron los péptidos GIM 66 y GIM 182 por su alta actividad antiviral contra IPNV.
- Los péptidos seleccionados GIM 66 y GIM 182 entran pasivamente a las células blanco y no son citotóxicos en células de peces hasta concentraciones de 1,5mM, 1000 veces la dosis al cual se obtiene inhibición.
- El péptido seleccionado GIM 66, inhibió el 99% de la infección viral productiva y en la línea celular persistentemente infectada la inhibición alcanzó el 76%.
- El péptido seleccionado GIM 182, inhibió el 36% de la infección viral productiva y en la línea celular persistentemente infectada la inhibición alcanzó el 97%.
- La concentración optima para lograr inhibición es entre 0,2  $\mu\text{M}$  – 2 $\mu\text{M}$  en el modelo *in vitro*, siendo necesario realizar las pruebas de campo, evaluar y optimizar la concentración *in vivo*.
- Los perfiles de expresión de VP2 y VP1 de IPNV en las gradientes de sacarosa, en células tratadas y no tratadas con el péptido GIM 182, mostraron que a tiempos tempranos de infección y con aplicación del péptido se logra la inhibición en la expresión del virus.
- En conclusión, los resultados de los experimentos realizados en esta investigación demuestran la validez de la hipótesis propuesta.

## 10. RECOMENDACIONES

- El uso de la tecnología de síntesis química en fase sólida para la generación de cualquier péptido, permite mucha versatilidad tanto en la secuencia como estructura deseada. Sin embargo, los mecanismos de acción de estas moléculas no son fáciles de descifrar. No existe una metodología estricta para la evaluación, debido a esto es que se propone el desarrollo nuevas metodologías para evaluación de ultraestructura con microscopía electrónica de transmisión, que nos porvee de información visual de la acción de los péptidos.
- El modelo propuesto de evaluación de los péptidos tanto en la línea celular permanentemente infectada como en la infectada *de novo* con el virus IPN, según los análisis estadísticos muestran que los ensayos presentan diferencias significativas entre los tratamientos en la mayoría de los experimentos desarrollados, se recomienda el uso de placas de cultivo celular de 24 pocillos y al menos 4 replicas por tratamiento para obtener resultados reproducibles.
- Como existe una alta variabilidad en las mutaciones que naturalmente sufre IPNV en la línea celular CHSE-214, se propone para nuevas investigaciones la línea celular RTG-2 con la que se ha demostrado una bajísima tasa de mutaciones.
- Al encontrar una molécula péptídica con alto potencial de transformarse en un producto comercial, se recomienda contemplar el largo de su secuencia, el tipo de aminoácidos a utilizar y la concentración a la cual es efectiva, para poder cuantificar y evaluar su uso.
- Se recomienda que para futuros trabajos con IPNV y péptidos, la evaluación de la respuesta inmune que puede dar luces de los mecanismos por los cuales actúan estas moléculas.
- Se sugiere además estudios de colocalización entre la molécula de interés y el patógeno que demuestren directamente su actividad.

## 11. Nomenclatura

AA	Aminoácidos
ADN	Acido desoxirribonucleico
AMB	Antimicrobiano
ANOVA	ANDEVA: análisis de varianza
ARN	Acido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Center
BSA	Albúmina de suero Bovino
C	Capsomeros
CD	Dicroísmo circular
cDNA	ADN complementario
CHSE-214	Células embrionarias de Salmon Chinook
cmp	Conteos por minuto
CP	Crossing Point
DAB	3.3'-diaminobenzidina tetrahidroclorido
DEPC	Dietil pirocarbonato
DI	Partículas Defectivas Interferentes
DNAsa	Desoxirribonucleasa
dNTPs	deoxirribonucleótidos trifosfato
ds RNA	ARN de doble hebra
<i>E</i>	eficiencia de cada partidior
EDT	Etanoditiol
EDTA	Etilendiamina tetracetato
ELF-1 <sup>a</sup>	Factor de elongación proteica
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
F	Proporción entre la variación entre grupos dividida por la varianza dentro de los grupos
FITC	Fluoresceína isothiocyanato
F-moc	9-fluorenilmetoxicarbonil
g	fuerza gravitatoria
G-10	Sephadex G-10 (matriz de dextran y epiclorohidrina)
GFP	Proteína verde fluorescente
GLM	General Linear Model
GMP	Buenas prácticas de manufactura
GMP	Guanosina Monofosfato

hpi	Horas post infección
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
hpt	Horas post tratamiento
IBDV	Infectious Bursal Disease Virus
IPNV	Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa
ISAV	Virus de la Anemia Infecciosa del Salmón
M.W.	Peso molecular
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz – en tiempo de vuelo.
MEM	Modified Eagle's Medium
MMLV	Transcriptasa inversa del virus de la leucemia Murina-Maloney
MOI	Multiplicidad de Infección (partículas virales/ células)
mRNA	ARN mensajero
MS	Espectrometría de masa
Mx	Proteína inmune Mx
n	Número de réplicas
nt	nucleótidos
OID	Domínio de oligomerización
OIE	Oficina Internacional de Epizootías
ORF	Marco de lectura abierta
p	Probabilidad
P.salmonis	<i>Piscirickettsia salmonis</i>
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG-6000	polietilen glicol 6000
qPCR	PCR cuantitativa.
R <sup>2</sup>	coeficiente de determinación
rBv	Báculo virus recombinante
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNA-BD	Dominio de unión al ARN
RNasa	Ribonucleasa
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta presión en fase reversa
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a PCR
RT-qPCR	Transcripción reversa acoplada a PCR cuantitativa en tiempo real.
SBF	Suero Bovino Fetal
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-page	Sodium Dodecyl Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SPPS	Síntesis de péptidos en fase sólida
ssRNA	ARN de hebra simple
t	Tiempo
T	Triangulación
t-Bu	Grupo tert-butilo
TCID <sub>50%</sub>	Dosis que infecta el 50% del tejido o cultivo celular, corresponde a la concentración del agente patógeno, se mide en ml.
TFA	Ácido trifluoroacético
TIS	Triisopropilsilano
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia tipo 1
VP1-BD	Dominio de unión a VP1

### Unidades

°C	grados celsius
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	micromolar
A°	Amstrong
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	centímetros cuadrados
d	Días
h	Horas
kb	Kilobases
kDa	KiloDaltons
M	Molar
mg/L	Miligramos por litro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
ng	nanógramo
nm	nanómetro
nM	nanomolar
pb	Pares de bases

## Códigos de una y tres letras para los aminoácidos

<b>Alanina</b>	Ala, A	<b>Leucina</b>	Leu, L
<b>Arginina</b>	Arg, R	<b>Lisina</b>	Lys, K
<b>Ácido aspártico</b>	Asp, D	<b>Metionina</b>	Met, M
<b>Asparagina</b>	Asn, N	<b>Fenilalanina</b>	Phe, F
<b>Cisteína</b>	Cys, C	<b>Prolina</b>	Pro, P
<b>Ácido Glutámico</b>	Glu, E	<b>Serina</b>	Ser, S
<b>Glicina</b>	Gly, G	<b>Tirosina</b>	Tyr, Y
<b>Glutamina</b>	Gln, Q	<b>Treonina</b>	Thr, T
<b>Histidina</b>	His, H	<b>Triptófano</b>	Trp, W
<b>Isoleucina</b>	Ile, I	<b>Valina</b>	Val, V

## 12. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

- Adzhubei A., and Sternberg M. 1993. Left-handed Polyproline II Helices Commonly Occur in Globular Protein. *J. Mol. Biol.* 229: 472-493.
- Ahne W. 1978. Isolation and characterization of infectious pancreatic necrosis virus from pike (*Esox lucius*). *Arch. Vir.* 58: 65-69.
- Albericio F. 2000. Orthogonal protecting groups for N-amino and C-terminal carboxyl functions in solid-phase synthesis. *Biopolymers Peptide Science* 55:123-139.
- Aley S.B., Zimmerman M., Hetsko M., Selsted M.E., Gillin F.D. 1994. Killing of *Giardia lamblia* by cryptdins and cationic neutrophil peptides. *Infect. Immun* 62:5397-5403.
- Amin A., Zaccardi J., Mullen S., Olland S., Orłowski M., Feld B., Labonte P., Mak P. 2003. Identification of constrained peptides that bind to and preferentially inhibit the activity of the hepatitis C viral RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 313: 158-169.
- Amos K. H. 1985. Procedures for direction and identification of certain fish pathogens, 3rd ed., Fish Health Section, American Fisheries Society, Corvallis, Oregon. 11-13.
- Anhe W.R., Kelly K., Schlotfeldt H.J. 1989. Factors affecting the transmission and outbreak of infectious pancreatic necrosis (IPN). In: Lillelund, K and Rosenthal H. (Eds), *Fish Health Protection Strategies*, pp. 19-67. Specific Publishers German Ministry for Research and Technology, Bonn.
- Aqua, 2006. Situación de IPNV en Chile: Un serio problema en agua dulce. *Revista Aqua. Fundación Chile.* 18 (105): 56-60.
- Azad A. A., Jagadish M. N., Brown M. A., Hudson P. J. 1987. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology* 161: 145-152.
- Babé L. A. and Craik C. S. 1997. Viral proteases: evolution of diverse structural motifs to optimize function. *Cell* 91:427-430.
- Bandara L. R., Girling R., La Thangue N. B. 1997. Apoptosis induced in mammalian cells by small peptides that functionally antagonize the Rb-regulated E2F transcription factor. *Nature Biotechnology* 15: 896-901.
- Belaid A, Aouni M, Khelifa R, Trabelsi A, Jemmali M, Hani K. 2002. In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1. *J Med Virol.* 66(2): 229-34.
- Bechinger B., Zasloff M., Opella S. J. 1993. Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci.* 2, 2077-2084.

- Bell C. E., Frescura P., Hochschild A., Lewis, M. 2000. Crystal structure of the lambda repressor C-terminal domain provides a model for cooperative operator binding. *Cell* 101(7), 801-811.
- Birghan C., Mundt E. Gorbalenya A. E. 2000. A non-canonical lon proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *Embo J* 19(1), 114-123.
- Bittencourt S L, Herculano S, Da Costa M. 1997. Distribution of Mayaro virus RNA in polysomes during heat shock. *Virus Research* 48 133-141.
- Blake S., Schill W., McAllister P., Lee M., Singer J., Nicholson B. 1995. Detection and identification of Birnaviruses by PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (4): 835-839.
- Bols N.C. 1991. Biotechnology and aquaculture: the role of cell cultures. *Biotechnology Advances* 9: 31-49.
- Botos I., Melnikov E. E., Cherry S., Kozlov S., Makhovskaya O. V., Tropea J. E., Gustchina A., Rotanova T. V., Wlodawer A. 2005. Atomic-resolution crystal structure of the proteolytic domain of *Archaeoglobus fulgidus* Lon reveals the conformational variability in the active sites of Lon proteases. *J Mol Biol* 351(1), 144-157.
- Botos, I., Melnikov, E. E., Cherry, S., Tropea, J. E., Khalatova, A. G., Rasulova, F., Dauter, Z., Maurizi, M. R., Rotanova, T. V., Wlodawer, A. y Gustchina, A. 2004. The catalytic domain of *Escherichia coli* Lon protease has a unique fold and a Ser-Lys dyad in the active site. *J Biol Chem* 279(9), 8140-8148.
- Bottcher B., N. A. Kiselev, V. Y. Stel'mashchuk, N. A. Perevozchikova, A. V. Borisov, y R. A. Crowther. 1997. Three-Dimensional Structure of Infectious Bursal Disease Virus determined by Electron Cryomicroscopy. *Journal of Virology* 71(1): 325–330.
- Brahms, S. and Brahms, J. 1980. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J. Mol. Biol.* 138, 149-178.
- Brown E. G. and Nuss J. M. 1997. Alkylation of Rink's amide linker on polystyrene resin: A reductive amination approach to modified amine-linkers for the solid phase synthesis of N-substituted amide derivatives. *Tetrahedron Lett.* 38: 8457-8460.
- Brown F. 1986. The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the international committee on taxonomy of viruses in Sendai, September 1984, *Intervirology* 25: 141-143.
- Bootland LM, Dobos P, Stevenson RM. 1986. Experimental induction of the carrier state in yearling brook trout: a model challenge protocol for IPNV immunization. *Vet Immunol Immunopathol* 12: 365-372.

- Campagna S., Saint N., Molle G., Aumelas A. 2007. Structure and mechanism of action of the antimicrobial peptide piscidin. *Biochemistry* 46, 1771–1778.
- Carpino L.A. and Han G.A. 1972. The 9-fluorenylmethyloxycarbonyl aminoprotecting group. *J. Org. Chem.* 37: 3404-3409.
- Carpintero R., Alonso C., Piñeiro M., Iturralde M., Andrés M., Madec F., Álava M. A., Piñeiro A., Lampreave F. 2007. Pig-Major Acute-Phase Protein and apolipoprotein A-I response correlated with the severity of experimentally induced African Swine Fever and Aujeszky's disease. *Veterinary Research* 38: 741-753.
- Caspar D. L. D. 1965. En: *Viral and Rickettsial Infections of Man*, 4th Ed. (F. L. Horsfall, Jr y I. Tamm eds.), Lippincott, Philadelphia, pp. 51-93.
- Caspar D. L. D. and Klug, A. 1962. Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol.* 27: 1-24.
- Caswell-Reno P., Reno P. W., Nicholson, B. L. 1986. Monoclonal antibodies to infectious pancreatic necrosis virus: analysis of viral epitopes and comparison of different isolates. *Journal of General Virology* 67: 2193–2205.
- Caston J. R., Trus B. L., Booy F. P., Wickner R. B., Wall J. S., Steven, A. C. 1997. Structure of L-A virus: a specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA. *J Cell Biol* 138: 975–985.
- Chan W.C. and White P.D. 2000. Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach. Oxford; Oxford University Press, 341 p. ISBN: 0-19-963724-5.
- Chen Y, Guarnieri MT, Vasil AI, Vasil ML, Mant CT, Hodges RS. 2007. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 1398–406.
- Chevalier C., Lepault J., Erk I., Da Costa B., Delmas, B. 2002. The Maturation Process of pVP2 Requires Assembly of Infectious Bursal Disease Virus Capsids. *Journal of Virology* 76 (5): 2384–2392.
- Chevalier C., Galloux M., Pous J., Henry C., Denis J., Da Costa B., Navaza J., Lepault J., Delmas B. 2005. Structural peptides of a nonenveloped virus are involved in assembly and membrane translocation. *J Virol* 79(19), 12253-12263.
- Chia B. C., Carver J. A., Mulhern T. D., Bowie, J. H. 2000. Maculatin 1.1, an antimicrobial peptide from the Australian tree frog, *Litoria genimaculata*: solution structure and biological activity. *Eur. J. Biochem.* 267, 1894–1908.
- Chiu CL, Wu JL, Her GM, Chou YL, Hong JR. 2010. Aquatic birnavirus capsid protein, VP3, induces apoptosis via the Bad-mediated mitochondria pathway in fish and mouse cells. *Apoptosis* ;15(6):653-68.

- Cho WJ, Yoon WJ, Moon CH, Cha SJ, Song H, Cho HR, Jang SJ, Chung DK, Jeong CS, Park JW. 2002. Molecular cloning of a novel chaperone-like protein induced by rhabdovirus infection with sequence similarity to the bacterial extracellular solute-binding protein family 5. *J Biol Chem*; 277(44):41489-96.
- Christie, K. E. and Ness, S. 1990. Infectious pancreatic necrosis virus in Norway: partial serotyping by monoclonal antibodies. *Journal of Fish Diseases* 13: 323–327.
- Chung H. K., Kordyban S., Cameron L., Dobos, P. 1996. Sequence analysis of the bicistronic drosophila X virus genome segment A and its encoded polypeptides. *Virology* 225: 359–368.
- Couve E., Kiss J., Kuznar J. 1992. Infectious pancreatic necrosis virus internalization and endocytic organelles in CHSE-214 cells. *Cell Biol. Int. Rep.* 16 (9): 899-906.
- Coulibaly F., Chevalier C., Gutsche I., Pous J., Navaza J., Bressanelli S., Delmas B., Rey F. 2005. The Birnavirus Crystal Structure Reveals Structural Relationships among Icosahedral Viruses. *Cell*, 120, 761–772.
- Coulibaly F., Chevalier C, Delmas B. Rey F.A. 2010. Crystal Structure of an Aquabirnavirus Particle: Insights into Antigenic Diversity and Virulence Determinism. *J of Vir.* 84 (4): 1792–1799.
- Crane M.S.T.J., Hardy-Smith P., Williams L.M., Hyatt A.D., Eaton L.M., Gould A., Handlinger J., Kattenbelt J., Gudkoys N. 2000. First isolation of an aquatic birnavirus from farmed and wild fish species in Australia. *Dis. Aquat. Org.* 43: 1-4.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14 (6):1188-90
- Da Costa, M. and Herculano, S. 1997. Distribution of Mayaro virus RNA in polysomes during heat shock. *Virus Research.* 48: 133-141.
- Da Costa B., Chevalier C., Henry C., Huet J.-C., Petit S., Lepault J., Boot H. Delmas B. 2002. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J Virol* 76: 2393–2402.
- Da Costa B., Soignier S., Chevalier C., Henry C., Thory C., Huet J.-C., Delmas B. 2003. Blotched snakehead virus is a new aquatic birnavirus that is slightly more related to avibirnavirus than to aquabirnavirus. *J Virol* 77: 719–725.
- Daher K.A., Selsted M.E., Lehrer, R.I. 1986. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol.* 60(3): 1068-74.
- De Kinkelin P., Michel Ch., Chittino P. 1985. Tratado de las enfermedades de los peces. Ed Acribia.. 58-66.
- Derossi D., Calvet S., Trembleau A., Brunissen A., Chassaing G., Prochiantz A. 1996. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptorin dependent. *J. Biol. Chem.*, 271:18188–18193.

- Dimmock N.J. 1982. Initial stage in infectious with animal viruses. *J. Gen. Virol.* 59, 1-22.
- Divita G., Restle T., Goody R. S., Chermann J-C., Baillon, J.G. 1994. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Dimerization Using Synthetic Peptides Derived from the Connection Domain. *Journal of Biol. Chem.* 269.(18):13080-13083.
- Dobos P. and Rowe D. 1977. Peptide map comparison of infectious pancreatic necrosis virus specific polypeptides. *J. Virol.* 24: 805-820.
- Dobos P., Hill B. J., Hallett R., Kells D. T., Becht H., Teninges D. 1979. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J. Virol.* 32: 593–605.
- Dobos P. 1995. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annu. Rev. Fish Dis.* 5: 25–54.
- Duncan R. and Dobos 1986. The nucleotide sequence of infectious pancreatic virus (IPNV) dsRNA segment A reveals one large ORF encoding a precursor polyprotein. *Nucleic Acids Research* 14 (14): 5934.
- Duranti MA, Franzoni L, Sartor G, Benedetti A, Iwai LK, Gruber A, Zingales B, Guzman F, Kalil J, Spisni A, Cunha-Neto E. 1999. Trypanosoma cruzi: conformational preferences of antigenic peptides bearing the immunodominant epitope of the B13 antigen. *Exp Parasitol.* 93(1): 38-44
- Espinoza E., Farias G., Soler M., Kuznar J. 1985. Identity between infectious pancreatic necrosis virus VR-299 and a chilean isolate. *Intervirolog.* 24: 58-60.
- Espinoza J.C., Hjalmeresson A., Everitt E., Kuznar J. 2000. Temporal and subcellular localization of infectious pancreatic necrosis virus structural proteins. *Arch. Virol.* 145: 739-748.
- Espinoza J.C., Cortés-Gutierrez M., Kuznar J. 2005. Necrosis of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) infected cells rarely is preceded by apoptosis. *Virus Res.* 109(2): 133-8.
- Espinoza JC, Kuznar J. 2002. Rapid simultaneous detection and quantitation of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *J Virol Methods.* 105(1): 81-5.
- Essbauer S. and Ahne W. 2001. Viruses of Lower Vertebrates. *J. Vet. Med. B.* 48: 403-475.
- Feldman A.R., Lee J., Delmas B., Paetzel M. 2006. Crystal Structure of a Novel Viral Protease with a Serine/Lysine Catalytic Dyad Mechanism. *J. Mol. Biol.* 358: 1378–1389.
- Frank R. 2002. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J. Immunol. Methods* 67(1):13-26.
- Frankel A.D. and Pabo C.O. 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell,* 55:1189–1193.

- Frost P., Håvarstein L. S., Lygen B., Stahl S., Endresen C., Christie K. E. 1995. Mapping of neutralisation epitopes on infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Journal of General Virology* 76: 1165–1172.
- Frost P. and Ness A., 1997. Vaccination of Atlantic salmon with recombinant VP2 of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), added to a multivalent vaccine, suppresses viral replication following IPNV challenge. *Fish shellfish Immunol.* 7: 609-619.
- Frost P., Borsheim K., Endresen C. 1998. Analysis of the antibody response in Atlantic salmon against recombinant VP2 of infectious pancreatic necrosis virus. *Fish Shellfish immunol.* 8: 447-456.
- Fryer J.L., Yusha A., Pilcher K.S. 1965. The in vitro cultivation of tissue and cells of Pacific salmon and steelhead trout. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 126: 566-586.
- Futaki S., Suzuki T., Ohashi W., Yagami T., Tanaka S., Ueda K., Sugiura Y. 2001. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* 276:5836–5840
- Futaki S. 2002. Arginine-rich peptides: potential for intracellular delivery of macromolecules and the mystery of the translocation mechanisms. *Int. J. Pharm.* 245:1–7.
- Gallagher T. M. and Rueckert, R. R. 1988. Assembly-dependent maturation cleavage in provirions of a small icosahedral insect ribovirus. *J. Virol.* 62(9), 3399-3406.
- Gallo R.L., Ono M., Povsic T., Page C., Eriksson E., Klagsbrun M. 1994. Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91:11035–11039.
- Galloux M, Chevalier C, Henry C, Huet J-C, Da Costa B, Delmas B. 2004. Peptides resulting from the pVP2 C-terminal processing are present in infectious pancreatic necrosis virus particles. *Journal of General Virology* 85: 2231–2236.
- Galloux M., Libersou S., Morellet N., Bouaziz S., Da Costa B., Ouldali M. Lepault J., Delmas, B. 2007. Infectious Bursal Disease Virus, a Non-enveloped Virus, Possesses a Capsid-associated Peptide That Deforms and Perforates Biological Membranes. *The journal of biological chemistry* 282 (28): 20774–20784.
- Galloux M, Libersou S, Alves ID, Marquant R, Salgado GF, Rezaei H, Lepault J, Delmas B, Bouaziz S, Morellet N. 2010. NMR structure of a viral peptide inserted in artificial membranes: a view on the early steps of the birnavirus entry process. *J Biol Chem.* 285(25):19409-21.
- García-Saéz A. J., Chiantia S., Salgado J., Schwille P. 2007. Pore Formation by a Bax-Derived Peptide: Effect on the Line Tension of the Membrane Probed by AFM. *Biophys. J.* 93, 103–112.

- Geourjon C. and Deleage G 1994. SOPM: a self-optimized method for protein secondary structure prediction. *Protein Eng*; 7(2):157-164.
- Geourjon C. and Deleage G. 1995. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci* 11(6): 681-684.
- Ghanem A., Mayer D., Chase G., Tegge W., Frank R., Kochs G., García-Sastre A., Schwemmler M. 2007. Peptide-Mediated Interference with Influenza A Virus Polymerase. *Journal of Virology* 81(14): 7801–7804.
- González D., Rodríguez J.F., Abaitua F. 2005. Intracellular Interference of Infectious Bursal Disease Virus. *Journal of Vir.* 79 (22): 14437–14441.
- Goldberg M. 1937. A class of multi-symmetric polyhedra. *Tohoku Math J.* 43: 104-108.
- Guzman F., Jaramillo K., Salazar L.M., Rivera A., Patarroyo M.E. 2002. H-NMR structures of the Plasmodium falciparum 1758 Erythrocyte binding peptide analogues and protection against malaria. *Life Sciences* 71(23):2773- 2785.
- Guzman F., Barberis S., Illanes A. 2007. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electron. J. Biotechnol.*, 10(2):279-314.
- Hancock R.E.W. and Lehrer R. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* 16:82–88.
- Harvarstein L.S., Kalland K.H., Christie K.E., Endresen C. 1990. Sequence of the large double-stranded RNA segment of the N1 strain of infectious pancreatic necrosis virus, a comparison with other Birnaviridae. *J. Gen. Virol.* 73: 2863-2870.
- Hay S. and Kannourakis G., 2002. A time to kill: viral manipulation of the cell program. *J. Gen. Virol.* 83 (7): 1547–1564.
- Hedrick R.P., Eaton W.D., Fryer J.L., Hah Y.C., Park J.W., Hong S.W. 1985. Biochemical and serological properties of birnaviruses isolated from fish in Korea. *Fish Pathology* 20 (4): 463-468.
- Hedrick RP, Leong J-A, Fryer JL. 1978. Persistent infection in salmonid fish cells with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *J Fish Dis.* 1: 297-308.
- Henzler-Wildman K. A., Martinez G. V., Brown M. F., Ramamoorthy A. 2004. Perturbation of the Hydrophobic Core of Lipid Bilayers by the Human Antimicrobial Peptide LL-37. *Biochemistry* 43, 8459–8469.
- Heppell J., Tarrab E., Berthiaume L., Lecomte J., Arella M. 1995a. Characterization of the small open reading frame on genome A of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* 76: 2091-2096.
- Heppell J., Tarrab E., Lecomte J., Berthiaume L., Arella M. 1995b. Strain variability and localization of important epitopes on the major structural protein (VP2) of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 214: 40-49.

- Herce H.D. and Garcia A.E. 2007. Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 20805–20810.
- Hill B.J. 1982. Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. In: Roberts R. J. (Ed). *Microbial Diseases of Fish*, pp. 91-114. Academic Press, New York, NY.
- Hill B.J., and Way K. 1995. Serological classification of IPNV and other aquatic birnaviruses. *Annu. Rev. Fish Dis.* 5: 55-77.
- Hong J.R., Hsu Y.L., Wu J.L. 1999a. Infectious pancreatic necrosis virus induces apoptosis due to down-regulation of survival factor Mcl-1 protein. *Virus Res.* 63: 75-83.
- Hong J.R., Lin T.L., Hsu Y.L., Wu J.L. 1998. Apoptosis precedes necrosis of fish cell line with infectious pancreatic necrosis virus infection. *Virology* 250: 76-84.
- Hong J.R., Lin T.T., Yang J.Y., Hsu Y.L., Wu J.L. 1999b. Dynamics of nontypical apoptotic morphological changes visualized by green fluorescent protein in living cells with infectious pancreatic necrosis virus infection. *J. Virol.* 73: 5056-5063.
- Hong J.R. and Wu J.L., 2002. Induction of apoptotic death in cells via Bad gene expression by infectious pancreatic necrosis virus infection. *Cell Death Differ.* 9: 113–124.
- Hong J.R., Gong H.Y., Wu, J.L. 2002. IPNV VP5, a novel anti-apoptosis gene of the Bcl-2 family, regulates Mcl-1 and viral protein expression. *Virology* 295: 217–229.
- Hong-Tao Xu, Wei-Duo Si, Dobos P. 2004. Mapping the site of guanylation on VP1, the protein primer for infectious pancreatic necrosis virus RNA synthesis. *Virology* 322: 199–210.
- Horne WS, Wiethoff CM, Cui C, Wilcoxon KM, Amarin M, Ghadiri MR, Nemerow GR. 2005. Antiviral cyclic D,L-alpha-peptides: targeting a general biochemical pathway in virus infections. *Bioorg Med Chem.* 13(17): 5145-53.
- Houghten R.A. 1985. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(15):5131-5135.
- Houghten R.A., Wilson D.B., Pinilla C. 2000. Drug discovery and vaccine development using mixture-based synthetic combinatorial libraries. *Drug Discovery Today*, 5:276-285.
- Hristova K., Dempsey C. E., White S. H. 2001. Structure, location, and lipid perturbations of melittin at the membrane interface. *Biophys. J.* 80, 801–811.
- Hsu Y.L., Cheng C.C., Wu J.L. 1995. Molecular relationships in infectious pancreatic necrosis virus. *Virus Res.* 37: 239-252.

- Huang M., Manning D.S., Warner M., Stephens E. B., Leong J.C. 1986. A physical map of the viral genome for infectious pancreatic necrosis virus Sp: analysis of cell-free translation products derived from viral cDNA clones. *Journal of Virology* 60(3): 1002-1011.
- Huang PH, Chen JY, Kuo CM. 2007. Three different hepcidin from tilapia, *Oreochromis mossambicus*: analysis of their expression and biological functions. *Mol Immunol*; 44:1922-44.
- Inderjit I.S., Thu B. J., Evensen Ø. 2010. Differentially expressed genes following persistent infection with infectious pancreatic necrosis virus in vitro and in vivo. *Fish Shellfish Immunol.* 28(5-6):845-53.
- Imajoh M, Goto T, Oshima S. 2007. Characterization of cleavage sites and protease activity in the polyprotein precursor of Japanese marine aquabirnavirus and expression analysis of generated proteins by a VP4 protease activity in four distinct cell lines. *Arch Virol.* 152(6): 1103-14.
- Ingerslev H.-C, Rønneseth A., Pettersen E. F., Wergeland H. I. 2009. Differential Expression of Immune Genes in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Challenged Intraperitoneally or by Cohabitation with IPNV. *Basic Immunology Scandinavian Journal of Immunology* 69: 90–98.
- Ivanovic T., Agosto M. A., Zhang L., Chandran K., Harrison S. C., Nibert M. L. 2008. Peptides released from reovirus outer capsid form membrane pores that recruit virus particles. *EMBO J.* 27, 1289–1298.
- Izadpanah A. and Gallo RL. 2005. Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol*; 52:381-90.
- Jahn R. and Südhof TC. 1999. Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem.* 68: 863-911.
- Jarver P. and Langel U. 2006. Cell-penetrating peptides: a brief introduction. *Biochim. Biophys. Acta*, 1758:260–263.
- Jensen I, Larsen R, Robertsen B. 2002. An antiviral state induced in chinook salmon embryo cells (CHSE-214) by transfection with the double-stranded RNA poly I: C. *Fish Shellfish Immunol* 13:367-78.
- Jofré C, Guzman F, Cárdenas C, Albericio F, Marshall SH. 2011. A natural peptide and its variants derived from the processing of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) displaying enhanced antimicrobial activity: A novel alternative for the control of bacterial diseases. *Peptides* 32:852-858.
- Johansen A, Collet B, Sandaker E, Secombes CJ, Jørgensen JB. 2004. Quantification of Atlantic salmon type-I interferon using an Mx1 promoter reporter gene assay. *Fish Shellfish Immunol* 16(2):173-84.
- John K. R. and Richards R. H. 1999. Characteristics of a new birnavirus associated with a warm-water fish cell line. *J. Gen. Virol.* 80: 2061–2065.

- Johnstone S.A., Gelmon K., Mayer L.D., Hancock R.E.W., Bally M.B. 2000. In vitro characterization of the anticancer activity of membrane-active cationic peptides. Peptide-mediated cytotoxicity and peptide-enhanced cytotoxic activity of doxorubicin against wild-type and p-glycoprotein over-expressing tumor cell lines. *Anticancer Drug Des.* 15: 151–160.
- Jørgensen SM, Syvertsen BL, Lukacs M, Grimholt U, Gjøen T. 2006. Expression of MHC class I pathway genes in response to infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) cells. *Fish Shellfish Immunol.* 21 (5):548-60.
- Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I. 1970. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* 34: 595-598.
- Kennedy JC. and Macdonald RD. 1982. Persistent infection with infectious pancreatic necrosis virus mediated by defective-interfering (DI) virus particles in a cell line showing strong interference but little DI replication. *J Gen Virol* 58: 361-371.
- Kim CH, Johnson MC, Drennan JD, Simon BE, Thomann E, Leong JA. 2000. DNA vaccines encoding viral glycoproteins induce nonspecific immunity and Mx protein synthesis in fish. *J Virol* 74(15):7048-54.
- Kling PG. and Olsson P. 2000. Involvement of differential metallothionein expression in free radical sensitivity of RTG-2 and CHSE-214 cells. *Free Radic Biol Med* 28(11):1628-37.
- Kochan G., González D., Rodríguez J. F. 2003. Characterization of the RNA-binding activity of VP3, a major structural protein of Infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 148: 723–744.
- Kovalchuk LV, Gankovskaya LV, Gankovskaya OA, Lavrov VF. 2007. Herpes simplex virus: treatment with antimicrobial peptides. *Adv Exp Med Biol* 601: 369-76.
- Kusuda R., Nishi Y., Ozono N., Suzuki S. 1993. Serological comparison of birnaviruses isolated from several species of marine fish in south west Japan. *Gyobyō Kenkyū* 28 (2): 91-92.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Labus M. B., Breeman S. A., Ellis E., Smail D. A., Kervick M., Melvin W. T. 2001. Antigenic comparison of a truncated form of VP2 of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus expressed in four different cell types. *Fish & Shellfish Immunology* 11: 203–216.
- Larsen R, Røkenes T P, Robertsen B. 2004. Inhibition of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Replication by Atlantic Salmon Mx1 Protein. *J Virol.* 78(15): 7938–7944.

- Latal A., Degovics G., Epand R. F., Epand R. M., Lohner K. 1997. Structural aspects of the interaction of peptidyl-glycylleucine-carboxamide, a highly potent antimicrobial peptide from frog skin, with lipids. *Eur. J. Biochem.* 248, 938–946.
- Lee M.K., Blake S.L., Singer J.T., Nicholson B.L. 1996. Genomic variation of aquatic Birnaviruses analyzed with restriction fragment length polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2513-2520.
- Lee J, Feldman A R., Delmas B., Paetzel M. 2006. Expression, purification and crystallization of a birnavirus-encoded protease, VP4, from blotched snakehead virus (BSNV). *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 62: 353–356.
- Lee J., Feldman A. R., Delmas B., Paetzel M. 2007. Crystal structure of the VP4 protease from infectious pancreatic necrosis virus reveals the acyl-enzyme complex for an intermolecular self-cleavage reaction. *J Biol Chem.*282(34), 24928-24937.
- Lejal N., Da Costa B., Huet J.C., Delmas B. 2000. Role of the ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *J. Gen. Virol.* 81: 983-992.
- Liao L. and Dobos P. 1995. Mapping of a serotype specific epitope of the major capsid protein VP2 of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 209: 684–687.
- Livak KJ. and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)). *Methods* 25: 402–8.
- Lombardo E., Maraver A., Castón J. R., Rivera J., Fernández-Arias A., Serrano A., Carrascosa J. L., Rodríguez J. F. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J. Virol.* 73: 6973–6983.
- Lombardo E., Maraver A., Espinosa I., Fernández-Arias A., Rodríguez J. F. 2000. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology* 277(2), 345-357.
- Liu M. and Vakharia V. N. (2006). Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. *J Virol* 80(7), 3369-3377.
- Luo Y., Pfuetzner R. A., Mosimann S., Paetzel M., Frey E. A., Cherney, M., Kim B., Little J. W., and Strynadka N. C. (2001). Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage. *Cell* 106(5), 585-594.
- Luria S., Darnell J., Baltimore D., Campbell A. 1978. Titration of viruses. In *General Virology* 3<sup>rd</sup>. Edition, New York, John Wiley and Sons, 21-32.

- Macdonald RD, and Kennedy JC. 1979. Infectious pancreatic necrosis virus persistently infects Chinook salmon embryo cells independent of interferon. *Virology* 95: 260-4.
- Maia L. F., Soares M. R., Valente A. P., Almeida F. C., Oliveira A. C., Gomes A. M., Freitas M. S., Schneemann A., Johnson J. E., Silva, J. L. 2006. Structure of a Membrane-binding Domain from a Non-enveloped Animal Virus. *J. Biol. Chem.* 281, 29278–29286.
- Magyar G. and Dobos P. 1994. Evidence for detection of the infectious pancreatic virus polyprotein and the 17-kDa polypeptide in infected cells and of the NS protease in purified virus. *Virology* 204: 580-589.
- Magyar G., Chung H.K., and Dobos P. 1998. Conversion of VP1 to VPg in cells infected by infectious pancreatitis necrosis virus. *Virology* 245: 142-150.
- Mallipeddi S.K., Samal S.K. and Mohanty S.B. 1990. Analysis of polypeptides synthesis in bovine respiratory syncytial virus-infected cells. *Arch. Virol.* 115: 23-36.
- Manning D.S. and Leong J.C. 1990. Expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 179: 16-25.
- Manning D. S., C. L. Mason, Leong J. C. 1990. Cell-free translational analysis of the processing of infectious pancreatic necrosis virus polyprotein. *Virology* 179: 9–15.
- Maraver A., Clemente R., Rodríguez J. F., and Lombardo E. 2003a. Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. *J. Virol.* 77(4), 2459-2468.
- Maraver A., Oña A., Abaitua F., González D., Clemente R., Ruiz-Díaz J. A., Castón J. R., Pazos F., Rodríguez J. F. 2003b. The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J. Virol.* 77(11), 6438-6449.
- Marsh M., and Helenius A. 1989. Virus entry into animal cells. *Adv Virus Res.* 36: 107-151.
- Martínez-Torrecedrada J. L., Castón J. R., Castro M., Carrascosa J. L., Rodríguez J. F., and Casal J. I. 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278: 322–331.
- Masuda M., Nakashima H., Ueda T., Naba H., Ikoma R., Otaka A. 1992. A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr<sup>5,12</sup>,Lys<sup>7</sup>]-polyphemusin II). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189:845–850.
- Matsuzaki K., Harada M., Funakoshi S., Fujii N., Miyajima K. 1991. Physicochemical determinants for the interactions of magainins 1 and 2 with acidic lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1063, 162–170.

- Mattern C. F. T. 1969. En: The Biochemistry of Viruses (H. B. Levy ed.), Dekker, New York, pp. 55-100.
- McAllister P.E. and Owens W.J. 1992. Recovery of infectious pancreatic necrosis virus from the faeces of wild piscivorous birds. *Aquaculture*. 106: 227-232.
- McAllister P.E. and Reyes X. 1984. Infectious pancreatic necrosis virus: Isolation from Rainbow Trout, *Salmo Gairdneri* Richardson imported into Chile. *J. Fish Dis.* 7: 319-322.
- McBeath AJA, Snow M, Secombes CJ, Ellis AE, Collet B. 2007. Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus. *Fish Shellfish Immunol* 22: 230–41.
- Merrifield R.B. 1963. Solid-phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2154.
- Mohammad F.V., Noorwala M., Ahmad V.U., Sener B. 1995. Bidesmosidic triterpenoidal saponins from the roots of *Symphytum officinale*. *Planta Med.* 61:94.
- Morgan M. M., Macreadie I. G., Harley V. R., Hudson P. J., Azad A. A. 1988. Sequence of the small double-stranded RNA genomic segment of infectious bursal disease virus and its deduced 90-kDa product. *Virology* 163(1), 240-242.
- Muller H., Scholtissek C., Becht H. 1979. The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *J Virol* 31(3), 584-589.
- Muller H. and Nitschke R. 1987. Molecular weight determination of the two segments of double-stranded RNA of infectious bursal disease virus, a member of the Birnavirus group. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 176(2), 113-121.
- Mundt E., Beyer J., and Müller H. 1995. Identification of a novel viral protein in Infectious bursal disease virus-infected cells. *Journal of General Virology* 76: 437-443.
- Mundt E., Kollner B. and Kretzschmar D. 1997. VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *J Virol* 71(7), 5647-5651.
- Murakami T., Niwa M., Tokunaga F., Miyata T., Iwanaga S. 1991. Direct virus inactivation of tachyplesin I and its isopeptides from horseshoe crab hemocytes. *Chemotherapy*, 37:327–334.
- Nicholson B. 1993. Use of monoclonal antibodies in identification and characterization of fish viruses. *Annual Rev. of Fish Diseases*. 3: 241-257.
- Nilsson B.L., Soellner M.B., Raines R.T. 2005. Chemical synthesis of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34:91-118.

- Novoa B., Rivas C., Toranzo A., Figueras A. 1995. Pathogenicity of birnavirus isolated from turbot (*Scophthalmus maximus*): comparison with references serotypes of IPNV. *Aquaculture* 130: 7-14.
- Nunnari J., Fox T. D., Walter P. 1993. A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. *Science* 262: 1997–2004.
- Nygaard R., Husgard S., Sommer A.I., Leong J.A.C., Robertson B. 2000. Induction of Mx protein by interferon and double-stranded RNA in salmonid cells. *Fish Shellfish immunol.* 10: 435-450.
- O.I.E. 1995. Diagnostic manual for aquatic animal diseases; Diseases of Fish. Chapter 9: Infectious pancreatic Necrosis. 92-99.
- Olesen N.J., Bloch B., Mellergaard S. 1988. Isolation of an IPN-like virus belonging to the serogroup of the aquatic birnaviruses from dab, *Limanda limanda*. *Journal of Fish Disease* 11: 449-451.
- Oña A., Luque D., Abaitua F., Maraver A., Castón J. R., Rodríguez J. F. 2003. The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus. *Virology* 322: 135–142.
- Ortín J. and Parra F. 2006. Structure and Function of RNA Replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 60: 305–26.
- Osorio M., Espinoza J. C., Kuznar J. 2005. Visualization of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) particles labeled with fluorescent probes. *Journal of Virological Methods* 130: 140–144.
- Paetzel M., Dalbey R. E., Strynadka N. C. J. 1998. Crystal structure of a bacterial signal peptidase in complex with a  $\beta$ -lactam inhibitor. *Nature* 396: 186–190.
- Pan CY, Chen JY, Cheng YS, Chen CY, Ni IH, Sheen JF, Pan YL, Kuo CM. 2007. Gene expression and localization of epinecidin 1 antimicrobial peptide in the grouper (*Epinephelus coioides*), and its role in protecting fish against pathogenic infection. *DNA Cell Biol*; 26:403-13.
- Pan J., Vakharia V.N., Tao Y.J. 2007. The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. *PNAS.* 104(18). 7385-7390.
- Park C. B., Yi K. S., Matsuzaki K., Kim M. S., Kim S. C. 2000. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8245–8250.
- Park S. H., Kim H. E., Kim C. M., Yun H. J., Choi E. C., Lee B. J. 2002. Role of proline, cysteine and a disulphide bridge in the structure and activity of the antimicrobial peptide gaegurin 5. *Biochem. J.* 368, 171–182.

- Patarroyo ME, Amador R, Clavijo P, Moreno A, Guzmán F, Romero P, Tascon R, Franco A, Murillo LA, Ponton G. 1988. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 332 (6160): 158-61.
- Patarroyo JH, Portela RW, De Castro RO, Couto Pimentela J, Guzmán F, Patarroyo ME, Vargas MI, Prates AA, Mendes MA. 2002. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Veterinary Immunol. Immunopathol.* 88(3-4):163-172.
- Peat T. S., Frank E. G., McDonald J. P., Levine A. S., Woodgate R., Hendrickson W. A. 1996. Structure of the UmuD' protein and its regulation in response to DNA damage. *Nature* 380(6576), 727-730.
- Peña A., Jofré C. y Marshall S. H. 2008, LI Reunión anual de la Sociedad de Biología de Chile. Pucón, Chile. Response of the rainbow trout monocyte/macrophage cell line RTS11 to infection with IPNV. 26 - 29 November
- Pennington M.W. and Dunn B.M. 1994. Acid Cleavage/Deprotection in Fmoc/tBu Solid -Phase Peptide Synthesis. *Methods in Molecular Biology* 35: 63 -71
- Petit S., Lejal N., Huet J.C., Delmas B. 2000. Active residues and viral substrate cleavage sites of the protease of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* 74: 2057-2066.
- Pettersen E.F. 1997. Infectious pancreatic necrosis (IPNV) and the development of a viral vaccine. *Norsk. Veterinaer.* 109: 499-505.
- Plesniak L. A., Parducho J. I., Ziebart A., Geierstanger B. H., Whiles J. A., Melacini G., Jennings P. A. 2004. Orientation and helical conformation of a tissue-specific hunter-killer peptide in micelles. *Protein Sci.* 13, 1988–1996.
- Pous J., Chevalier C., Ouldali M., Navaza J., Delmas B., Lepault J. 2005. Structure of birnavirus-like particles determined by combined electron cryomicroscopy and X-ray crystallography. *Journal of General Virology*, 86: 2339–2346.
- Prasad B. V. V., Rothnagel R., Zeng C. Q. Y., Jakana J., Lawton J. A., Chiu W., Estes M. K. 1996. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature* 382, 471-473.
- Prenner EJ, Lewis RNAH, Kondejewski LH, Hodges RS, McElhaney RN. 2001. Diffraction scanning calorimetry study of the effect of the antimicrobial peptide gramicidin S on the thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta.* 147:211–223.
- Prasad D. 1977. The molecular biology of animal viruses. Volume 1, Chapter 1 pp 1-40.

- Rajanbabu V, Pan CY, Lee SC, Lin WJ, Lin CC, Li CL, Chen JY. 2010. The tilapia hepcidin 2-3 peptide modulates lipopolysaccharide (LPS)-induced cytokines and inhibits tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  through cyclooxygenase (COX)-2 and phosphodiesterase (PDE)-4D. *J Biol Chem*; 285(40):30577-86.
- Rajanbabu V., Chen JY. 2011. Antiviral function of tilapia hepcidin 1-5 and its modulation of immune-related gene expressions against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in Chinook salmon embryo (CHSE)-214 cells. *Fish & Shellfish Immunology* 30 39-44.
- Reed L. J., and Muench H. 1936. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal Epidemiol.* 27: 493-497.
- Rege K, Patel SJ, Maged Z, Yamush ML. 2007. Amphiphathic peptide based fusion peptides and immunoconjugates for the targeted ablation of prostate cancer cells. *Cancer Res*; 67:6368-75.
- Roberts R.J. and Shepherd C.J. 1986. Handbook of Trout and Salmon Diseases. 82-157.
- Rojas V., Galanti N., Bols N.C. y Marshall S.H. 2009. Productive Infection of *Piscirickettsia salmonis* in Macrophages and Monocyte-Like Cells From Rainbow Trout, a Possible Survival Strategy. *Journal of Cellular Biochemistry* 108:631–637.
- Romero-Brey I., Batts W.N., Bandín I., Winton J.R., Dopazo, C.P. 2004. Molecular characterization of birnaviruses isolated from wild marine fishes at the Flemish Cap (Newfoundland). *Dis Aquat Org.* 61: 1–10.
- Romero-Brey I., Band I., Cutr J. M., Vakharia V N., Dopazo C P. 2009. Genetic analysis of aquabirnaviruses isolated from wild fish reveals occurrence of natural reassortment of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Fish Diseases* 32: 585–595
- Roulston A., Marcellus C.R., Branton P.E. 1999. Viruses and apoptosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 577–628.
- Santi N., Song H., Vakharia V.N., Evensen Ø. 2005. Infectious Pancreatic Necrosis Virus VP5 Is Dispensable for Virulence and Persistence. *Journal of Virology* 79 (14): 9206–9216.
- Schneemann A., Reddy V., Johnson J. E. 1998. The structure and function of nodavirus particles: a paradigm for understanding chemical biology. *Adv. Virus Res.* 50, 381-446.
- Sewald N. and Jukubke H.D. 2002. Peptides: Chemistry and Biology. Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co.
- Shankar K.M., Roy K.L., Yamamoto T. 1994. Differentiation of infectious pancreatic necrosis virus isolates by polymerase chain reaction. *Indian J. Exp. Biol.* 32 (8): 571-576.

- Shivappa RB, Song H, Yao K, Aas-Eng A, Evensen O, Vakharia VN. 2004. Molecular characterization of Sp serotype strains of infectious pancreatic necrosis virus exhibiting differences in virulence. *Dis Aquat Organ*. 61(1-2): 23-32.
- Snow M., McKay P., McBeath A.J.A., Black J., Doig F., Kerr R., Cunningham C.O., Nylund A., Devold M. 2006. Development, Application and Validation of a Taqman® Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Infectious Salmon Anaemia Virus (ISAV) in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Dev Biol (Basel)* 126: 133-45.
- Spies U., Muller H., Becht H. 1987. Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Res* 8(2), 127-140.
- Strynadka N. C. J., Adachi H., Jensen S. E., Johns K., Sielecki A., Betzel C., Sutoh K., James M. N. G. 1992. Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in b-lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution. *Nature* 359: 700–705.
- Tacken M. G. J., Peeters B. P. H., Thomas A. A. M., Rottier P. J. M., Boot H. J. 2002. Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *J. Virol*. 76: 11301–11311.
- Takei J., Reményi A., Clarke A. R., Dempsey C. E. 1998. Self-association of disulfide-dimerized melittin analogues. *Biochemistry* 37, 5699–5708.
- Tao Y.J., Farsetta D.L., Nibert M.L., Harrison S.C. 2002. RNA Synthesis in a Cage -- Structural Studies on Reovirus Polymerase lambda-3. *Cell* 111: 733-745.
- Tao Y.J., Pan J., Vakharia V.N. 2007. The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 7385-90.
- Tarab E., Berthiaume L., Heppell J., Arella M., Lecomte J. 1993. Antigenic characterization of serogroup A of infectious pancreatic necrosis virus with three panels of monoclonal antibodies. *Journal of General Virology* 74: 2025-2030.
- Tarab E., Berthiaume L., Grothe S., O'Conner-McCort M., Heppell J., Lecomte J. 1995. Evidence of a major neutralizable conformational epitope region of VP2 of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of General Virology* 76: 551–558.
- Terwilliger T. C., Weissman L., Eisenberg D. 1982. The structure of melittin in the form I crystals and its implication for melittin's lytic and surface activities. *Biophys. J.* 37, 353–361.
- Thomas G. P. and Mathews M. B. 1984. Alterations of transcription and translation in HeLa cells exposed to amino acid analogs. *Mol Cell Biol* 4, 1063-1072.

- Tommasi R A., Nantermet P G., Shapiro M J., Chin J, Brill W K. D., Ang K. 1998. Novel method for the loading of nucleophiles on multipin crowns. *Tetrahedron Lett.* 39: 5477-5480.
- Tréhin R., Krauss U., Beck-Sickinger A.G. Merkle H.P., and Nielsen H.M. 2004. Cellular uptake but low permeation of Human Calcitonin-Derived Cell Penetrating peptides and Tat (47-57) Through Well-Differentiated Epithelial Models. *Pharma. Res.* 21(7): 1248-1256.
- Tschantz W. R., Sung M., Delgado-Partin V. M., Dalbey R. E. 1993. A serine and a lysine residue implicated in the catalytic mechanism of the Escherichia coli leader peptidase. *J. Biol. Chem.* 268: 27349–27354.
- VanCompernelle SE, Taylor RJ, Oswald-Richter K, Jiang J, Youree BE, Bowie JH. 2005. Antimicrobial peptides from amphibian skin potently inhibit human immunodeficiency virus infection and transfer of virus from dendritic cells to T cells. *J Virol* 79:11598-606.
- Van Dijl J. M., de Jong A., Venema G., Bron S. 1995. Identification of the potential active site of signal peptidase SipS of Bacillus subtilis. *J. Biol. Chem.* 270: 3611–3618.
- Van Regenmortel M. H. V., Fauquet C. M., Bishop D. H. L., Carstens E. B., Estes M. K., Lemon S. M., Maniloff J., Mayo M. A., McGeoch D. J., Pringle C. R., Wickner R. B. 2000. Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, New York, NY.
- Villanueva R A., Galáz J L., Valdés J A., Jashés M M., Sandino A M. 2004. Genome Assembly and Particle Maturation of the Birnavirus Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Journal of Virology* 78(24): 13829–13838.
- Vives E., Brodin P., Lebleu B. 1997. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.*, 272:16010–16017.
- Von Einem U. I., Gorbalenya A. E., Schirrmeier H., Behrens S. E., Letzel T., Mundt E. 2004. VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol* 85(Pt 8), 2221-2229.
- Wachinger M, Kleinschmidt A, Winder D, Pechmann NV, Ludvigsen A, Neumann M. 1998. Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *J Gen Virol* 79:731-40.
- Warner J. R., Rich A., Hall C. E. 1962. *Science*, 138: 1399.
- Wolf K. 1988. Fish Viruses and Fish Viral Diseases. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Wolf K., Snieszko S.F., and Dunbar E. 1956. Infectious pancreatic necrosis, a virus-caused disease of fish. *Excerpta. Med.* 13: 228.
- Wolf K. And Mann J.A. 1980 Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fishes. *In vitro.* 16 (2): 168-179.

- Xu H. T., Si W. D., Dobos P. 2004. Mapping the site of guanylylation on VP1, the protein primer for infectious pancreatic necrosis virus RNA synthesis. *Virology* 322(1), 199-210.
- Yao K. and Vakharia V.N. 1998. Generation of infectious pancreatic necrosis virus from cloned cDNA. *J. Virol.* 72: 8913-8920.
- Zlotnick A., Reddy V. S., Dasgupta R., Schneemann A., Ray W. J., Rueckert R. R., Johnson J. E. 1994. Capsid assembly in a family of animal viruses primes an autoproteolytic maturation that depends on a single aspartic acid residue. *J. Biol. Chem.* 269(18), 13680-13684.
- Zar J. H. 1996. *Biostatistical Analysis*. Er. Ed. Prentice-Hal I, Inc. Upper Saddle River. New Jersey. 662 pp.

- **13. Anexos**

- 13.1. Presentaciones a congresos**

**Jofré C.**, Olivares J., Nilo L., Guzman F., Marshall S.H. 17 – 19 July **2009**, Second International Symposium on antimicrobial peptides: Food, Veterinary, Medical and Novel Applications, Saint Maló, France. Novel Approach to control viral infections: Chemically-Synthesized Antiviral Peptides avoid viral spread on tissue culture cells persistently as well as de Novo-Infected with infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) as a model system.

Peña A., **Jofré C.**, Marshall S. H. 26 - 29 November **2008**, LI Reunión anual de la Sociedad de Biología de Chile. Pucón, Chile. Response of the rainbow trout monocyte/macrophage cell line RTS11 to infection with IPNV.

### **Publicaciones**

**Jofré C.**, Guzman F., Cárdenas C., Albericio, Sergio Marshall. 2011. A natural peptide and its variants derived from the processing of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) displaying enhanced antimicrobial activity: A novel alternative for the control of bacterial diseases. *Peptides*. 32 (5) 852-858.

**Jofré C.**, Guzman F., Cárdenas C., Albericio, Sergio Marshall. 2011. P20, a peptide derived from IPNV (Infectious Pancreatic Necrosis Virus) pVP2 protein processing is a putative regulator in viral infection. *Virology*, en corrección.







Q990M6	VR299	APDDFYQAVVEVFAENGGGPDQDQMQLRDLARQMRRRPRPAETRRQTK	950
P05844	G1 Ja	APDDFYQAVVEVFAENGGGPDQDQMQLRDLARQMRRRPRPAETRRQTK	950
Q990P9	G2 Ab	APEEFYDAVAAVFADNDGRGPDQDQMQLRELARMMKRRPRTAEP RRTR	950
Q703G9	G3 Sp	APEEFYDAVAAVFAQNGGGRGPDQDQMQLRELARQMRRRPRNADAPRRTR	950
Q990P7	G4 Te	APEEFYDAVAAVFADNDGRGPDQDQMQLRELARMMKRRRPRNADTPRKTR	950
Q990P5	G5 C2	APEPFYEAVAAVFAENGGGPDQDQMQLRELARMMKRRHPKNAATPRKTR	950
Q990P8	G6 He	APEEFYNAVAAVFSENGGGRGPDQDQMQLDLRDLARSMKRRPRTAATPRRAR	950

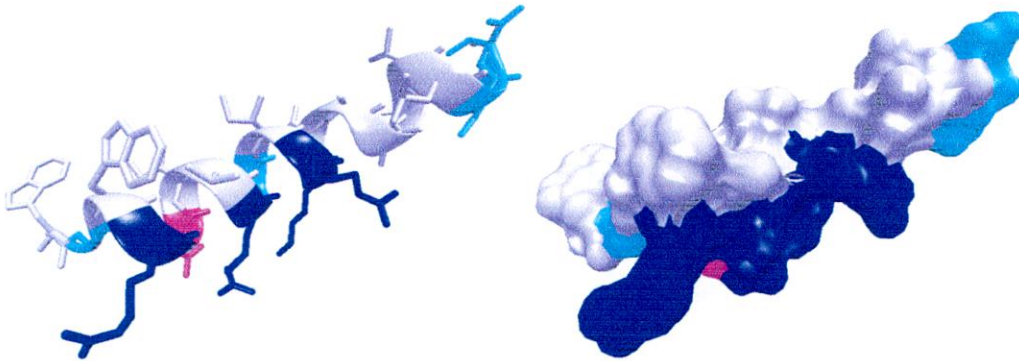
\*\*\*: \*\*:\*\*. \*\*:\*.\*\*\*\*\* \*\*\*:\*\*\* \*\* \* : \* : \*::

Q990M6	VR299	TPPRAATSSGSRFTPSGD----	968
P05844	G1 Ja	TPPRAATSSGSRFTPSGDDGEV	972
Q990P9	G2 Ab	APAEPAPQRSSRFTPRGE----	968
Q703G9	G3 Sp	APAEPAPPGRSRFTPSGDNAEV	972
Q990P7	G4 Te	APTEPAPQRSSRFTPRGE----	968
Q990P5	G5 C2	PPAEKAPSSGSRYIPPGL----	968
Q990P8	G6 He	APAETAPARTSRFTPLGN----	968

.\*. \* . \*\* : \* \*

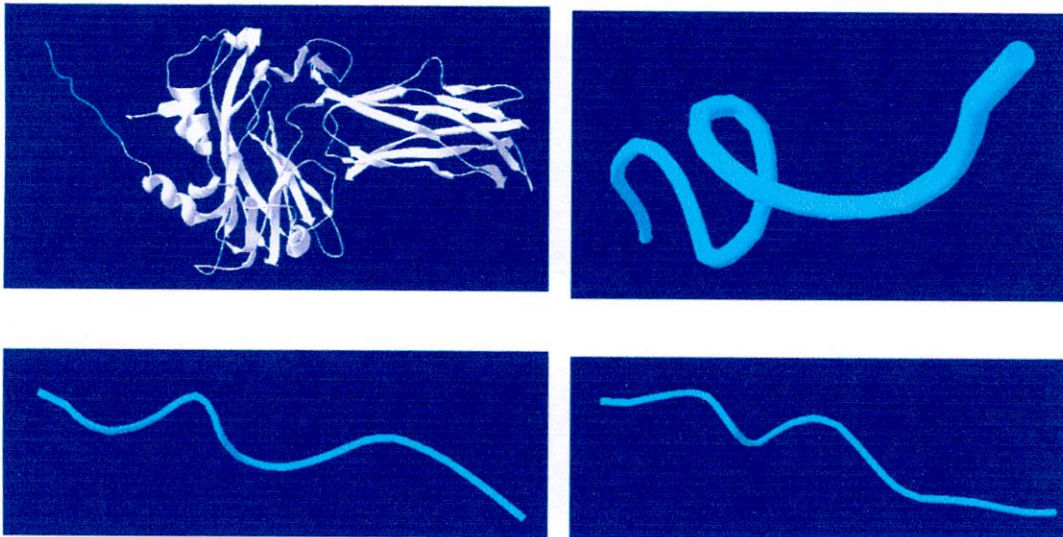
### 13.3. Modelación de péptidos seleccionados

#### GIM 66



**Figura 35.** Representaciones de columna vertebral y de la superficie de la estructura secundaria de péptidos GIM 66. El modelo se construyó sobre la base de la identificación de AP 2IMU. El código de color utilizado: básico azul, blanco, verde y rojo ácido hidrofóbicas, polares, sin carga alguna. Creado con VMD.

#### GIM 182



**Figura 36.** Representación del péptido GIM 182, en verde, generado con SPdb.

**13.4. Resultado de secuenciación de aislado de IPNV, región VP2 de segmento A de IPNV, utilizando el partidor M13.**

Secuencia amplificada de IPNV con partidores SNPF y SNPR de 213pb para el segmento A, ubicado en la zona de la proteína VP2, clonados en TOPOTA, y secuenciados, resultados de secuencias identificadas en Genbank.  
pTOPO\_IPNV\_213pb.

[gb|AY354521.1|](#) Infectious pancreatic necrosis virus isolate Sp122 12-kDa nonstructural protein, 108-kDa polyprotein, and 25-kDa nonstructural protein genes, complete cds  
Length=3097

Score = 363 bits (196), Expect = 2e-97  
Identities = 200/202 (99%), Gaps = 0/202 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 7 CAACAGGGTTCGACAAACCATACGTCGGCCTAGAGGATGAGACACCCCAGGGTCTCCAGT 66
      |||
Sbjct 618 CAACAGGGTTCGACAAACCATACGTCGGCCTAGAGGACGAGACACCCCAGGGTCTCCAGT 677

Query 67 CAATGAACGGGGCCAAGATGAGGTGCACAGCTGCAACCGCACCCGGGAGGTACGAGATCG 126
      |||
Sbjct 678 CAATGAACGGGGCCAAGATGAGGTGCACAGCTGCAACTGCACCCGGGAGGTACGAGATCG 737

Query 127 ACCTCCCATCCCAACGCCTACCCCGTTACTGCGACAGGAACCCCTCACCCTCTCTACG 186
      |||
Sbjct 738 ACCTCCCATCCCAACGCCTACCCCGTTACTGCGACAGGAACCCCTCACCCTCTCTACG 797

Query 187 AGGGAAACGCCGACATCGTCAA 208
      |||
Sbjct 798 AGGGAAACGCCGACATCGTCAA 819
  
```

**214 pb (VR-299 carril 16)**

GCCCTTCAACAGGGTTCGACAAACCATACGTCGGCCTAGAGGACGAGACACCCCAGGGTCTCCAGTCAATGAACGGGG  
CCAAGATGAGGTGCACAGCTGCAACCGCACCCGGGAGGTACGAGATCGACCTCCCATCCCAACGCCCTACCCCGTTA  
CTGCGACAGGAACCCCTCACCCTCTCTACGAGGAAACGCCGACATCGTCAAAGGGC

5'3' Frame 3

PSTGFDKPYVRLEDETPQGLQSMNGAKMRCTAATAPRRYEIDLPSQRLPVPVATGTLTTLTYEGNADIVKG

```

gi|9630637|ref|NP_047196.1| KVNQLVTKGITVLNLTPTGFDKPYVRLEDETPQGPQSMNGARMRCTAAIA 200
5'3' -----PSTGFDKPYVRLEDETPQGLQSMNGAKMRCTAATA 35
      .*****:***** *
  
```

```

gi|9630637|ref|NP_047196.1| PRRYEIDLPSERLPTVAATGTPTTIYEGNADIVNSTAVTGDITFQLEAEP 250
5'3' PRRYEIDLPSQRLPVPVATGTLTTLTYEGNADIVKG----- 70
      *****:***.*:*** **:*****:
  
```

**213 pb (VR-299 carril 14)**

GCCCTTTGACGATGTCGGCGTTTCCCTCGTAGAGAGTGGTGGGGTTCCTGTGCGAGTAACGGGGGTAGGCGTTGGG  
ATGGGAGGTGCGATCTCGTACCTCCGCGGTGCAATTGCAGCTGTGCACCTCATCTTGGCCCGTTTCATTGACTGGAGAC  
CCTGGGGTGTCTCGTCTCTAGGCGGACGTATGGTTTGTGCAACCCCTGTGAAGGGC

3'5' Frame 3

PSTGFDKPYVRLDETPQGLQSMNGAKMRCTAAIAPRRYEIDLPSQRLPPVTATGTLTTLTYEGNADIVKG

gi|9630637|ref|NP\_047196.1| KVNNQLVTKGITVLNLPSTGFDKPYVRLDETPQGPQSMNGARMRCTAAIA 200  
3'5' -----PSTGFDKPYVRLDETPQGLQSMNGAKMRCTAAIA 35  
\*\*\*\*\*

gi|9630637|ref|NP\_047196.1| PRRYEIDLPSERLPTVAATGTPPTIYEGNADIVNSTAVTG DITFQLEAEP 250  
3'5' PRRYEIDLPSQRLPPVTATGTLTTLTYEGNADIVKG----- 70  
\*\*\*\*\*:\*\*\*.\*\*:\*\*\*\* \*\*:\*\*\*\*\*:.

**214pb (NVI015 carril 21)**

CCCCTTCAACAGGGTTCGACAAACCATACGTCCGCC TAGAGGACGAGACACCCAGGGTCTCCAGTCAATGAACGGGG  
CCAAGATGAGGTGCACAGCTGCAATTGCACCGGAGGTACGAGATCGACCTCCCATCCCAACGCCTACCCCCGTCA  
CTGCGACAGGAACCTCACCCTCTCTACGAGGAAACGCCGACATCGTCAAAGGGC

5'3' Frame 3

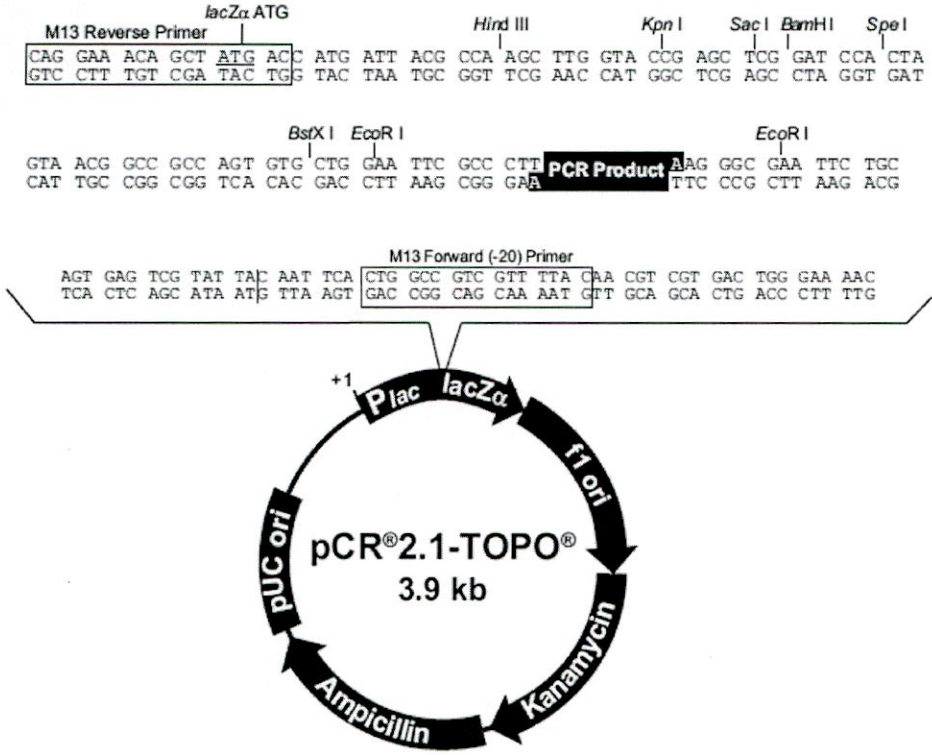
PSTGFDKPYVRLDETPQGLQSMNGAKMRCTAAIAPRRYEIDLPSQRLPPVTATGTLTTLTYEGNADIVKR

gi|9630637|ref|NP\_047196.1| KVNNQLVTKGITVLNLPSTGFDKPYVRLDETPQGPQSMNGARMRCTAAIA 200  
5'3' -----PSTGFDKPYVRLDETPQGLQSMNGAKMRCTAAIA 35  
\*\*\*\*\*

gi|9630637|ref|NP\_047196.1| PRRYEIDLPSERLPTVAATGTPPTIYEGNADIVNSTAVTG DITFQLEAEP 250  
5'3' PRRYEIDLPSQRLPPVTATGTLTTLTYEGNADIVKR----- 70  
\*\*\*\*\*:\*\*\*.\*\*:\*\*\*\* \*\*:\*\*\*\*\*:.

<b>Aislado IPNV en CHSE-214</b>	<b>Resultado del Blast (NCBI, genbank)</b>
<b>VR-299 carril 16</b>	<b>isolate Sp122</b>
<b>VR-299 carril 14</b>	<b>isolate NVI-020</b>
<b>NVI015 carril 21</b>	<b>isolate NVI-013</b>

Esquema Plasmido TOPO TA IPNV.  
 Los sitios de restricción están marcados



Producto PCR IPNV 213 p.b.

5'-3'

GCCCTTCAACAGGGTTCGACAAACCATACTCCGCTAGAGGACGAGACACCCAGGGTCTCCAGTCAATGAACGGGG  
 CCAAGATGAGGTGCACAGCTGCAATTGCACCGGAGGTACGAGATCGACCTCCCATCCCAACGCCTACCCCGTCA  
 CTGCGACAGGAACCTCACCCTCTCTACGAGGAAACGCCGACATCGTCAAAGGGC

### 13.5. Reacción de clonación Topo (para *E. coli* químicamente competentes)

PCR producto	3 $\mu$ L (0,5-4 $\mu$ L)
Solución Salina	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	agregar a un volumen total de 5 $\mu$ L
<u>Topo vector</u>	<u>0,7 <math>\mu</math>L</u>
Volumen Final	6 $\mu$ L

- Incubar por 12 minutos a temperatura ambiente y luego poner en hielo.
- Agregar topo + PCR a 50  $\mu$ L de bacteria e incubar 30 minutos en hielo (mezclar suavemente)
- Shock térmico a 42° C por 45 segundos
- Poner 2 minutos en hielo
- Crecer la bacteria 1 hora a 37°C con agitación horizontal, agregando 250  $\mu$ L de medio LB.
- Plaquear en agar LB + Km (50  $\mu$ g/ml)
- Incubar toda la noche a 37°C.

#### Colony PCR

- Picar al menos 20 diferentes colonias y hacer reacciones independientes de PCR para cada una, verificación del inserto por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con gel red o bromuro de etidio.

Primers: SNPF-R: VP2

#### Purificación de plásmido por Qiaprep Spin Miniprep Kit y microcentrífuga

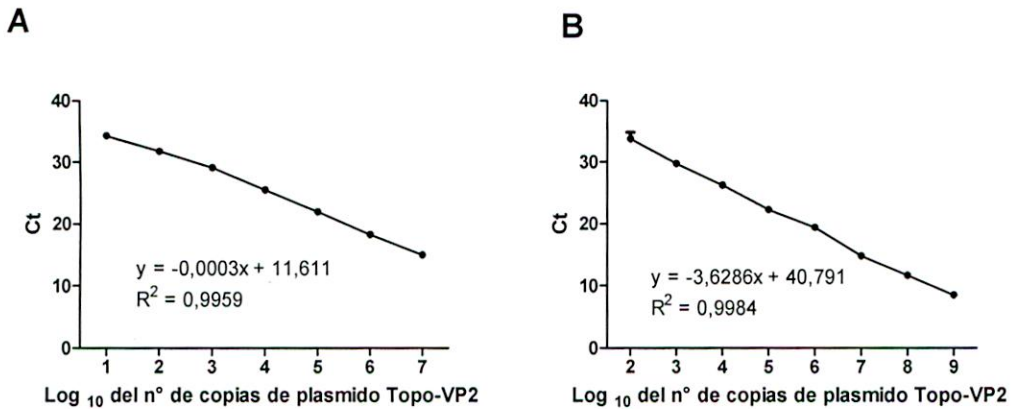
- Cosechar bacterias centrifugando a 4000rpm por 10 minutos a 4°C.
- Remover todo sobrenadante
- Resuspender pellet de bacterias en 250  $\mu$ L de Buffer P1 (+RNAasa A) y transferir Ecup. (usar vortex o pipetear up and down)
- Adicionar 250  $\mu$ L de Buffer P2 y mezclar cuidadosamente invirtiendo los tubos 4-6 veces (no vortex)
- Adicionar 350  $\mu$ L de Buffer N3 y mezclar inmediatamente y con cuidado invirtiendo los tubos 4-6 veces
- Centrifugar por 10 minutos a 13000rpm ( $\approx$  17900 g)
- Dejar fluir el sobrenadante del paso anterior por una columna QIAprep spin columna por decantación o pipeteo
- Centrifugar por 30-60 segundos descartar fluido

Obs: Lavar la columna QIAprep spin adicionando 0,5ml Buffer PB y centrifugando por 30-60 seg. Descartando el fluido.

- Lavar la columna QIAprep spin adicionando 0,75ml de Buffer PE y centrif 30-60 seg
- Descartar el líquido y centrifugar por 1 minuto para remover el buffer residual
- Traspasar la columna QIAprep a un Ependorff limpio de 1,5ml. Para eluir el DNA, adicionar 50  $\mu$ L de Buffer EB (10mM Tris-HCl, pH 8,5) o agua en el centro de la columna QIAprep, dejar actuar 1 minuto y centrifugar por 1 minuto.

### 13.6. Curvas de calibración de RT-qPCR

A continuación se presentan las curvas de calibración, para la cuantificación absoluta de VP2 de IPNV.



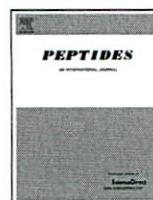
**Figura 37.** Curvas de calibración para interpolación de datos en cuantificación absoluta para RT-qPCR.

En la gráfica A, lo más remarcable son los puntos 1 al 4 de la recta, que corresponden a las concentraciones de plásmido-VP2, de  $10^0$  hasta  $10^4$ , que son además, los límites esperados para obtener información acerca de la Infección persistente y tiene un  $R^2$  muy cercano a 1, lo que hace muy confiable la evaluación. Por el contrario, en la gráfica B, lo destacable son los puntos del 6 al 9, que corresponden a valores de  $10^6$  a  $10^9$ , que son los valores esperables en el modelo de infección *de novo*, y también presentan una distribución lineal con un  $R^2$  muy cercano a 1.



Contents lists available at ScienceDirect

# Peptides

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/peptides](http://www.elsevier.com/locate/peptides)

## natural peptide and its variants derived from the processing of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) displaying enhanced antimicrobial activity: a novel alternative for the control of bacterial diseases

Claudio Jofré<sup>a,\*</sup>, Fanny Guzmán<sup>b</sup>, Constanza Cárdenas<sup>b</sup>, Fernando Albericio<sup>c,d</sup>, Sergio H. Marshall<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Campus Curauma, Av. Parque

<sup>b</sup>BC Núcleo Biotecnología Curauma, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Campus Curauma, Av. Universidad, 330 Valparaíso, Chile

<sup>c</sup>Institute for Research in Biomedicine and CIBER-BBN, Networking Centre on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, Barcelona Science Park, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

<sup>d</sup>Department of Organic Chemistry, University of Barcelona, Martí i Franqués 1-11, 08028 Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 December 2010

Received in revised form 20 January 2011

Accepted 20 January 2011

Available online 2 February 2011

#### Keywords:

antibacterial peptide  
 viral derived antibacterial peptide  
 virus processing  
 peptide synthesis  
 peptide modeling

### ABSTRACT

The larger segment of the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) codifies most of the structural and non-structural proteins of the virus in two overlapping open reading frames (ORFs). The longer of the two ORF is expressed as a polyprotein which generates a number of variable length peptides of unknown function during processing. Since an appealing hypothesis would be that these peptides are generated by the virus to act as antimicrobial agents that favor viral infectivity in their fish host, we decided to test this possibility by selecting a master peptide and using it to generate substitution variants that may enhance their antimicrobial potential. A 20-residue master peptide (p20) was selected from the well-described maturation process of the structural viral protein VP2; several variants were then designed and chemically synthesized, ranging in size from 16 to 20 residues. The synthesized peptides were tested for *in vitro* activity against several prototype bacterial pathogens using standardized laboratory procedures. Chemically synthesized p20 and all its variants displayed broad activity against the tested bacteria and none of them were toxic to eukaryotic cells at least 10<sup>x</sup> the concentration used against the bacteria. Interestingly, when p20 was tested against the very aggressive bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*, a common co-infectant of IPNV in salmonid fish, the specific activity of the novel peptide was significantly higher than that displayed for bactericidal fish farm antibiotics such as oxolinic acid, flumequine and florfenicol, which are commonly used to control *Piscirickettsiosis* in the field. It is potentially significant that the approach presented in this report provides a novel alternative for generating new and ideally more efficient and friendly safeguards for bacterial prophylaxis.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Mortality due to disease, decreased growth rates and decreased feed efficiency due to infections are major factors of economic loss in aquaculture. Aquaculture production levels have grown at an impressive annual rate of approximately 11% since 1980 and one of the significant challenges to the expansion of aquaculture production is that of disease outbreaks. The potential economic losses from disease outbreaks have become so significant that they may threaten the survival of the industry. This was the case when Chilean

the ISA virus in 2007 which left a shaky industry determined to look for novel alternatives for disease control while trying to slowly recover [8].

As part of this search, antimicrobial peptides have arisen as an interesting alternative; as such work has been carried out to improve them using drug development processes [34]. Antimicrobial peptides (AMPs) are short amino acid sequences (<100 residues) that are important in the innate immunity of invertebrates and vertebrates; they have also been described in bacteria, fungi and plants [26,40,55]. AMPs are a defense mechanism that can remain over long evolutionary time spans and can act rapidly to neutralize a broad range of microorganisms, such as bacteria, fungi, and viruses [38,52].

The most common mechanism of action against bacteria is the so-called “carpet” mechanism, in which the peptide accumulates

\*Corresponding author. Tel.: +56 32 2274836; fax: +56 32 2274835.

E-mail addresses: [claudio\\_jofre@yahoo.es](mailto:claudio_jofre@yahoo.es) (C. Jofré), [fanny.guzman@ucv.cl](mailto:fanny.guzman@ucv.cl) (F. Guzmán), [constanza.cardenas@ucv.cl](mailto:constanza.cardenas@ucv.cl) (C. Cárdenas), [albericio@irbbarcelona.org](mailto:albericio@irbbarcelona.org) (F. Albericio), [smarshal@ucv.cl](mailto:smarshal@ucv.cl) (S.H. Marshall).

Aquaculture was almost devastated by an aggressive outbreak of

09781/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.peptides.2011.01.026

Table 1  
p20 homologue peptides from APD database [50].

Peptide	Source	% Homology	% Hydrophobic residues	Net charge
p20	IPNV synthetic peptide	—	50	3
AP00015	Aurein 2.2; Southern Australian bell frog	40.9	56	1
AP00352	Citropin 1.2 Australian blue mountains tree frog	40.0	56	1
AP00696	Dahlein 1.1 Litoria dahlia Australian aquatic frog	38.1	53	0
AP00353	Citropin 1.3 Australian blue mountains tree frog	38.1	56	1
AP00351	Citropin 1.1 Australian blue mountains tree frog	38.1	56	1

on the bacterial membrane up to a threshold concentration [49], causing permeabilization/disintegration [33]. However the specific interaction may vary, with peptides having different ways to produce the membrane permeabilization, including channel aggregates, toroidal pores or channels [48].

The activity of a peptide is therefore determined by several factors, the negatively charged bacterial membrane, the net positive charge of the peptide, its hydrophobicity, its oligomeric state in solution and in the membrane, and the stability of its secondary structure. AMPs have been classified into five structural groups: (1) linear peptides with  $\alpha$ -helical conformation [7,54]; (2) peptides rich in cysteine residues [41]; (3) peptides that form  $\beta$ -sheet structures [6]; (4) peptides rich in particular amino acid residues, such as proline, with a variable structure [5,7,39,41]; (5) peptides composed of rare and modified amino acids [41].

The Antimicrobial Peptide Database [50] has over 1600 fully characterized AMPs from very diverse organisms. Many of them have common features that are fundamental to their activity: small size, amphipathicity and a positive net charge. Although similarities have been documented between antimicrobial peptides and viral fusion peptides [27], which possess inherent flexibility and structural adaptability and are known to be responsible for different modes of interaction with double-layer membranes, AMPs from viruses have not as yet been reported.

IPNV is an aquabirnavirus belonging to the Birnaviridae family whose members have a genome composed of two segments of double-stranded RNA (dsRNA), called segments A and B, which are encapsulated into a shell-shaped icosahedral particles (T=13) from 60 to 70 nm in diameter [16]. One distinctive feature of the virus behavior in Chile is that most breeding salmonid fish are persistently infected with the virus and it thus poses the threat of immunosuppression [28].

Segment A codifies all structural and non-structural proteins in two overlapping ORFs. In infected cells, the longer ORF generates a polyprotein of 106-kDa (H-pVP2-VP4-VP3-OH), which is post-translationally self-cleaved by the serine–lysine viral protease VP4, releasing pVP2 and VP3 proteins. The second ORF codifies a 17 kDa protein called VP5 [17,18,45].

Segment B, the shorter coding segment, codifies for the unique viral RNA-dependent-RNA-polymerase (RDRP) [53].

Intriguingly, in IPNV [19], as well as in other birnaviruses such as IBDV and blotched snakehead virus (BSNV) [12,13], pVP2 has been found that releases three well-defined small peptides during processing (four in the case of BSNV) derived from its C-terminal. The role played by these peptides is at present unknown, in IBDV it has been reported that at least one of this peptides (P46) and some subsequences are able to permeate membranes [20,21]; and collateral evidence suggests that some of these peptides may act as antimicrobial agents in vivo as a way to favor viral infectivity in a productive infection.

Another major bacterial pathogen that affects salmon sea farms worldwide and with specific impact in Chile is *Piscirickettsia salmonis*. In Chile, the pathogen behaves with extreme aggressiveness, and farms in the southern part of the country have been devastated over a very short time period [4]. The use of antibiotics both prophylactically and during early fish infection with the bacteria appears

to attenuate the growth of the pathogen but, unfortunately, such treatments have been largely unsuccessful in stopping disease outbreaks [9]. Similarly, commercial vaccines against *P. salmonis* have not proven to be highly efficient [35].

Up to the present the antibiotics most used to combat this and other bacterial diseases on salmon farms are flumequine, oxolinic acid and florfenicol, where last year these three represented 66% of bulk antibiotics used in Chilean aquaculture [44]. Nevertheless, none of these three is able to control *P. salmonis* outbreaks.

In this work we describe for the first time a master peptide (p20), of unknown function, derived from the aquatic virus IPNV and 20 chemically synthesized variants of it, displaying broad and increased antibacterial activity. It is notable though, that p20, the master peptide, is fully active against *P. salmonis*, the major bacterial agent threatening fish farms in Chile where, as mentioned before, most fish are persistently infected by IPNV. Additionally, we have characterized the master peptide determining the key residues involved in its antibacterial activity, as well as the minimum sequence-length required to maintain activity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Identification of the master peptide

Based on the reported sequence of IPNV segment A (sp strain Swiss-Prot ID Q703G9), a ClustalW alignment [31] including sequences from the 6 IPNV main known genogroups [3] and considering the processing pattern of pVP2, we were able to determine a highly conserved region that defined the master peptide p20 (Table 1; Fig. 1).

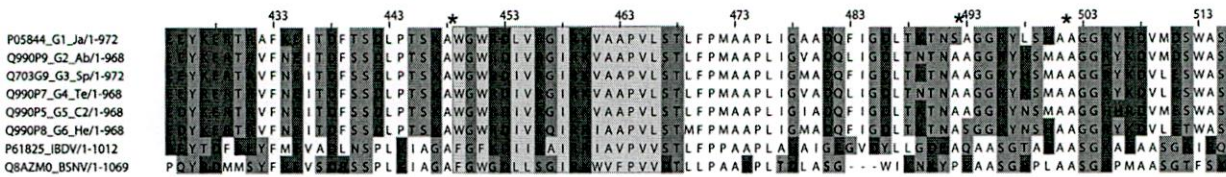
### 2.2. Design of peptide variants

With the p20 sequence as a starting point, several peptides were submitted to alanine scans (scan-Ala), ranging in size between 16 and 22 amino acid residues, in order to determine the theoretical relevance of each residue in putative antibacterial activity. N and C terminal residues were also removed to determine the minimum epitope with in vitro activity against *P. salmonis*.

### 2.3. Chemical synthesis and purification of peptides

Twenty designed variants were selected after scan analysis and their modifications, together with p20, were synthesized via solid phase peptide synthesis (SPS) [36] using the tea-bag procedure reported by Houghten for multiple peptide synthesis [24] in accordance with standard Fmoc chemistry with a 0.64 substituted rink amide resin and Fmoc amino acids [29]. The peptides were cleaved by treatment with trifluoroacetic acid (TFA)/triisopropylsilan (TIS)/ethanedithiol/H<sub>2</sub>O (92.5/2.5/2.5:2.5) for 2 h and then precipitated with cold diethyl ether.

The raw peptides were desalted by gel exclusion chromatography using G-10 columns (Amersham, USA), analyzed by RP-HPLC to obtain >95% purity and lyophilized until use. The molar masses of the peptides were determined by MALDI-TOF MS [42,46].



1. Top: alignment of IPNV genogroups (G1–G6), IBVD and BSNV, in the pVP2 processing region. Asterisks indicate the cleavage site for the three IPNV peptides. The p20 is colored pink. Bottom: logo of the p20 peptide according to alignment between the 6 IPNV genogroups. The propensity of a given residue is related to the size of the corresponding character [10]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Source of antibiotics

The antibiotics used in fish farms, flumequine PESTANAL®, pliconic acid and florfenicol, were purchased from Sigma–Aldrich (Germany) and tested at the same concentrations used in the field [1].

Circular dichroism (CD) spectroscopy and structural model

Circular dichroism (CD) spectra [2] of the p20 peptide and its selected variants were obtained at 25 °C in a 2 mm path length cuvette over 190–260 nm using a CD Spectrometer (J-810 Jasco Corporation, Japan), with signal averaging over 10 s per 0.5 nm interval at a concentration of 0.2 mM each in 30% 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) [43]. Two repeat scans were obtained for each sample and the baseline spectrum was subtracted from the average. Each experiment was repeated three times and averages were taken of the resulting data [11]. The NMR structure of pep46 from IBVD (infectious bursal disease virus), as registered in the PDB database (PDB ID: 2IMU, [21]), was used as a reference to match N-terminal homology with the IBVD master peptide p20. Then we proceeded to model the tridimensional structure of p20 through the SWISS-MODEL server [30] using the Swiss-PDBViewer software [23].

Microbial strains for in vitro testing

The following strains were used for in vitro testing: Gram-positive bacteria: *Micrococcus luteus* (ATCC 4698) and *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 49461); Gram-negative bacteria: *Vibrio ordalii* (natural isolate); *Vibrio anguillarum* (ATCC 3506), *Vibrio alginolyticus* (ATCC 19108), and *Aeromonas hydrophila* (ATCC 23213). All bacteria were grown in Trypticase Yeast Broth (TSB, Difco, Becton Dickinson, MD, USA) except *V. anguillarum* and *V. alginolyticus* which were grown in Peptone NaCl Broth. The strains of *Vibrio* were grown at 26 °C while all the others were grown at 37 °C. *P. salmonis* LF-89 was grown on McI broth at 23 °C at 100 rpm on an orbital shaker for 3 days [22].

Antibacterial activity test

Antibacterial activity was determined using the microplate assay as previously described [37,47], with slight modifications. Ten microliters of serial dilutions of each peptide (12–200 μM) were mixed with 100 μl of an exponential phase bacteria culture (OD 0.3–0.5 with 95% of viable cells). The test was performed at a starting OD of 0.001 at 620 nm for each bacterial strain in the specific

broth. After 24 h of incubation, absorbance values were measured and Minimal Inhibition Concentration (MIC) was evaluated as the lowest concentration to cause 100% decrease in the optical density of the microorganism suspension. Bat2, a deca-polylysine peptide was used as a positive control [1] and K1, a non-toxic peptide from *Trypanosoma cruzi*, as negative control [15]. For *P. salmonis*, the antibacterial test was performed at a starting OD of 0.01 at 620 nm and absorbance values were determined after 72 h of incubation.

2.8. Cytotoxicity assay

The putative toxic effect of the synthetic peptides over eukaryotic cells was measured by exposing established Chinook salmon embryo cells (CHSE-214) to the peptides in accordance with standard laboratory procedures [14,47]. Briefly, cell monolayers at 70% semi confluence were washed with PBS and the peptides added at a range of concentrations (1–100 μM) in triplicate wells and incubated for the maximum viability time (3 h) without culture medium. Samples were then washed three times with excess PBS before adding 0.1% trypsin in the presence of EDTA for 30–60 s to release cells from the monolayer. Individual cell viability was determined using the Trypan Blue exclusion technique [32].

3. Results

The master peptide p20 was chosen after an alignment analysis from the corresponding pVP2 cleavage regions of 6 IPNV genogroups and other birnaviruses, such as BSNV and IBVD (Fig. 1),

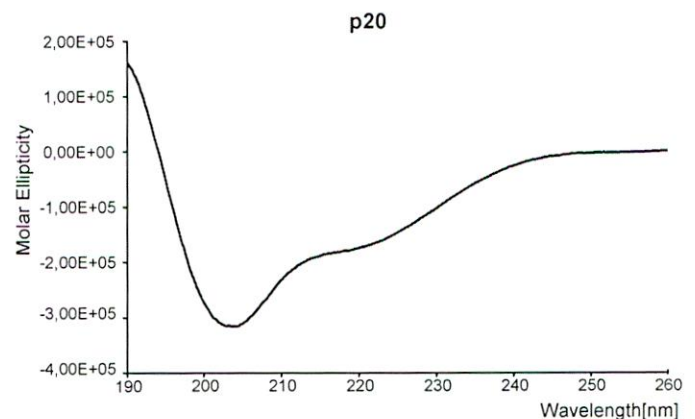


Fig. 2. Circular Dichroism spectra of the p20 peptide.

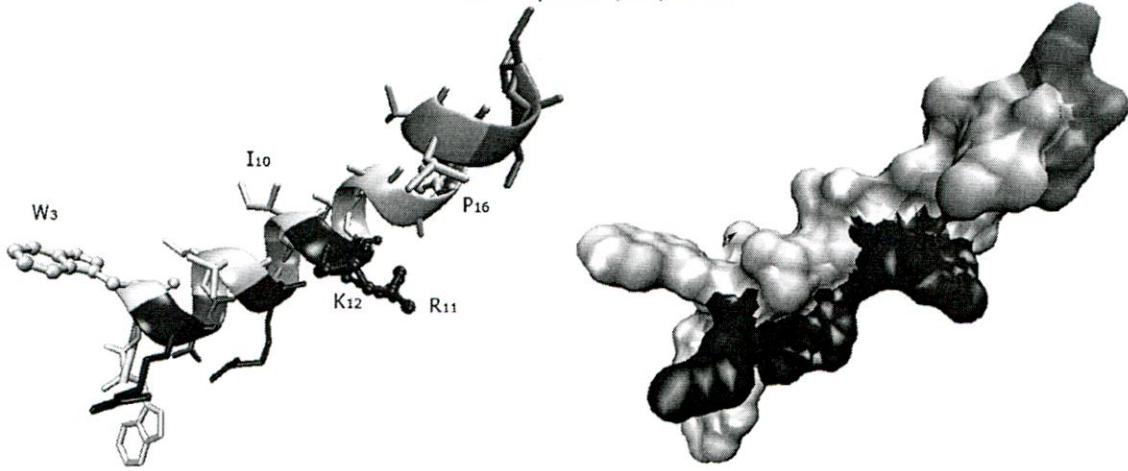


Fig. 3. 3D structural model of p20. Left: backbone representations with the key residues indicated. Right: surface representation. The color code used: basic blue, acidic red, polar without charge green and hydrophobic white. The figure was performed with VMD [25]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

corresponding to the N-terminal moiety of the first peptide processed from pVP2.

The CD spectra of the master peptide show a clear tendency toward an  $\alpha$ -helical structure (Fig. 2), which together with the known RMN structure of the IBDV homologue peptide (PDB ID 2IMU) allowed us to construct the 3D model for p20. This turned out to be a neat amphipathic  $\alpha$ -helix (Fig. 3) and it showed significant matching with homologous peptides from the APD database (Table 1; Fig. 4). Using p20 as a reference template, 21 variants were designed and chemically synthesized via SPS (Table 2).

Afterwards, the master peptide and the 18 scan-Ala variants were submitted to antibacterial tests against selected Gram positive and Gram negative bacteria. The analyses clearly demonstrate the relevance of target residues regarding the maintenance of specific activity. Of all the bacteria, *Vibrio ordalii* was the most susceptible to almost all the peptides tested (Table 3). When the CHSE-214 fish cell line was exposed to 10 times the concentration used for antibacterial testing, cells were unaffected, thus proving that the activity was not due to any intrinsic toxicity of p20.

The relevancy of each residue against *P. salmonis* was also demonstrated. On the other hand, although the bacterium is also sensitive to p20 and the scan-Ala variants, a higher range of concentration is needed to achieve full inhibition (Table 4). Nevertheless, when comparing p20 activity with that displayed by the most commonly used antibiotics against *P. salmonis* in the field, the in vitro analysis clearly shows that p20 appears to be much more efficient (Fig. 5).

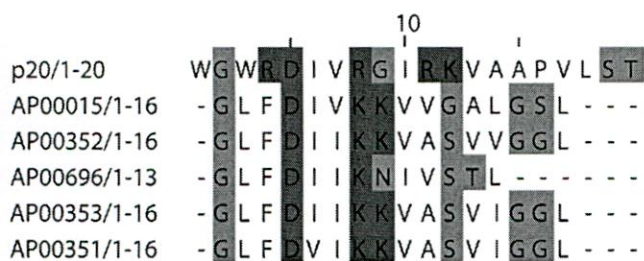


Fig. 4. Alignment of the p20 peptide with antibacterial peptides found in the APD database [50]. The color code used: basic blue, acidic red, polar without charge green and hydrophobic white. The figure was created with Jalview [51]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Table 2  
Sequence of the peptides used in the assays. In the scan alanine (1–18) each amino acid change is in bold.

#	Peptide	Sequence
1	p20	WGWRD <b>I</b> V <b>R</b> G <b>I</b> R <b>K</b> V <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b> S <b>T</b>
2	GIM436	AGWRD <b>I</b> V <b>R</b> G <b>I</b> R <b>K</b> V <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b> S <b>T</b>
3	GIM437	WAWRD <b>I</b> V <b>R</b> G <b>I</b> R <b>K</b> V <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b> S <b>T</b>
4	GIM438	WGARD <b>I</b> V <b>R</b> G <b>I</b> R <b>K</b> V <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b> S <b>T</b>
5	GIM439	WG <b>W</b> AD <b>I</b> V <b>R</b> G <b>I</b> R <b>K</b> V <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b> S <b>T</b>
6	GIM440	WG <b>W</b> RA <b>I</b> V <b>R</b> G <b>I</b> R <b>K</b> V <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b> S <b>T</b>
7	GIM441	WGWRD <b>A</b> V <b>R</b> G <b>I</b> R <b>K</b> V <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b> S <b>T</b>
8	GIM442	WGWRD <b>I</b> A <b>R</b> G <b>I</b> R <b>K</b> V <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b> S <b>T</b>
9	GIM443	WGWRD <b>I</b> V <b>A</b> G <b>I</b> R <b>K</b> V <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b> S <b>T</b>
10	GIM444	WGWRD <b>I</b> V <b>R</b> A <b>I</b> R <b>K</b> V <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b> S <b>T</b>
11	GIM445	WGWRD <b>I</b> V <b>R</b> G <b>A</b> R <b>K</b> V <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b> S <b>T</b>
12	GIM446	WGWRD <b>I</b> V <b>R</b> G <b>I</b> A <b>K</b> V <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b> S <b>T</b>
13	GIM447	WGWRD <b>I</b> V <b>R</b> G <b>I</b> R <b>A</b> V <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b> S <b>T</b>
14	GIM448	WGWRD <b>I</b> V <b>R</b> G <b>I</b> R <b>K</b> A <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b> S <b>T</b>
15	GIM449	WGWRD <b>I</b> V <b>R</b> G <b>I</b> R <b>K</b> V <b>A</b> A <b>A</b> V <b>L</b> S <b>T</b>
16	GIM450	WGWRD <b>I</b> V <b>R</b> G <b>I</b> R <b>K</b> V <b>A</b> A <b>P</b> A <b>L</b> S <b>T</b>
17	GIM451	WGWRD <b>I</b> V <b>R</b> G <b>I</b> R <b>K</b> V <b>A</b> A <b>P</b> V <b>A</b> S <b>T</b>
18	GIM452	WGWRD <b>I</b> V <b>R</b> G <b>I</b> R <b>K</b> V <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b> A <b>T</b>
19	GIM453	WGWRD <b>I</b> V <b>R</b> G <b>I</b> R <b>K</b> V <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b> S <b>A</b>
20	GIM454	GW <b>R</b> D <b>I</b> V <b>R</b> G <b>I</b> R <b>K</b> V <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b> S <b>T</b>
21	GIM455	WRD <b>I</b> V <b>R</b> G <b>I</b> R <b>K</b> V <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b> S <b>T</b>
22	GIM456	WGWRD <b>I</b> V <b>R</b> G <b>I</b> R <b>K</b> V <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b>
23	K-1	TLEEFSAKL
24	Bat-2	KKKKKKKKK

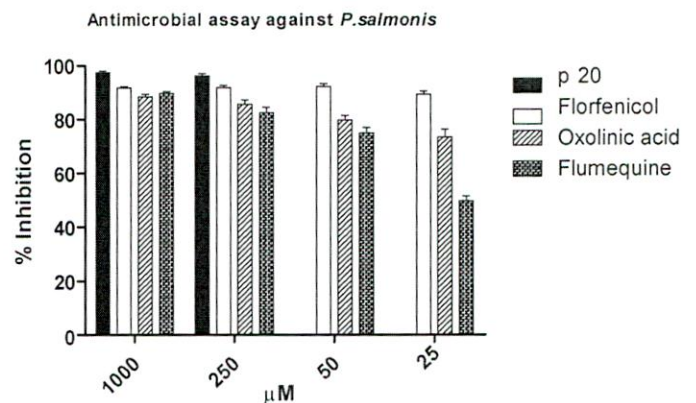


Fig. 5. Comparison of p20 activity versus inhibition of antibiotics used in aquaculture industry.

Table 3  
Antibacterial test against prototype bacteria.

Gram	Bacteria	Peptide																			Controls		
		p20	Scanalanine																		K-1	Bat2	
		GIM 436	GIM 437	GIM 438	GIM 439	GIM 440	GIM 441	GIM 442	GIM 443	GIM 444	GIM 445	GIM 446	GIM 447	GIM 448	GIM 449	GIM 450	GIM 451	GIM 452	GIM 453				
(-)	<i>A. hydrophila</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	<i>E. coli</i>	+++	+	++	-	+	++	+	+	+++	++	-	-	++	+	++	+	++	++	++	-	+	+
	<i>V. anguillarum</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
	<i>V. alginolitycus</i>	++	-	-	-	+	-	+	+	+++	+++	+	-	++	-	++	++	++	++	++	-	-	+
	<i>V. ordalli</i>	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	+++	+	+++	+++	+++	+++	++	-	-	+
(+) M.	<i>luteus</i>	-	++	-	+	-	-	-	-	+	+	-	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
	<i>S. epidermis</i>	+	-	++	-	-	++	-	+	++	++	+	++	++	-	+	-	++	++	-	-	-	+

+ = 100% inhibition at concentration 100 M, ++ = 100% inhibition at concentration 50 M, +++ = 100% inhibition at concentration 25 M, ++++ = 100% inhibition at concentration 12 M, - = no inhibition.

Table 4  
Antibacterial test against *Piscirickettsiasalmonis*.

Bacteria	Peptide																				Controls			
	p20	Scanalanine																		Modifications		k-1	Bat2	
	GIM 436	GIM 437	GIM 438	GIM 439	GIM 440	GIM 441	GIM 442	GIM 443	GIM 444	GIM 445	GIM 446	GIM 447	GIM 448	GIM 449	GIM 450	GIM 451	GIM 452	GIM 453	GIM 454	GIM 455	GIM 456			
<i>Piscirickettsia salmonis</i>	+++	-	-	-	++	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+

++ = 100% inhibition at concentration 200 M, +++ = 100% inhibition at concentration 100 M, + ≥90% inhibition at concentration 100 M, - = no inhibition.

To determine the minimum epitope able to retain activity, terminal amino acids were removed from both, the N and the C-terminal ends of the molecule (Table 2). We conclude that removal of two amino acids from either end completely abolishes the antibacterial activity of p20 against *P. salmonis* (Table 4).

#### 4. Discussion

The pVP2-processing-derived p20 peptide sequence turned out to be highly conserved in all six IPNV genogroups that were analyzed (Fig. 1). Nonetheless, the minor changes observed among genogroups corresponded to amino acids sharing similar physicochemical properties such as  $I_6 \times L$ ,  $R_8 \times K$ , and  $K_{12} \times R$ , with the exception of  $G_9 \times Q$  (Fig. 1). p20 shares a number of features associated with known antimicrobial peptides; among them, hydrophobicity, cationicity, amphipaticity and a secondary  $\alpha$ -helix structure appears to be the most relevant (Table 1; Figs. 4 and 5).

p20, a non toxic peptide on eukaryotic cells, exhibits high antibacterial activity against both prototype Gram+ and Gram- bacteria, as well as against *P. salmonis*, a marine bacteria that

causes high production losses in salmon aquaculture in Chile. Key residues that suppressed antibacterial activity were detected in the scan-Ala analysis (Tables 3 and 4). It appears that replacement of a cationic amino acid residue, either lysine or arginine, reduces the activity, although changing residues located in the central moiety of the  $\alpha$ -helix  $R_{11}$  and  $K_{12}$  (peptides GIM446 and GIM447) practically abolishes it. Also, the N-terminal residues

$W_3$  (peptide GIM438), a putative anchor residue, and  $P_{16}$  (peptide GIM449) might be responsible of conferring mobility to the C-terminal end of the molecule, thus altering interactions with bacterial membranes. It should be noted that residues  $G_9$  and  $I_{10}$  appear to slightly improve the antibacterial activity of p20 (peptides GIM444 and GIM445), while the  $G_9 \times A$  change can confer better stability to the  $\alpha$ -helix, proven by the fact that peptide GIM444 shows a 57%  $\alpha$ -helix structure versus the 48% shown by p20 (Fig. 4 and CD spectra deconvolution with CDSSTR). Furthermore, the  $I_{10} \times A$  change reinforces the idea that the central zone of the molecule appears to be pivotal in determining antimicrobial activity.

The results discussed so far show that changing internal amino acids alters, either positively or negatively, the antimicrobial activity of the molecule. Nonetheless, removal of terminal amino acids to reduce the peptide size fully abolished its activity against *P. salmonis*. We consider this to be consistent evidence that peptides derived from the polyprotein precursor of IPNV VP2 do have functional activity. In this case, we proved that a master peptide and its derivatives display antimicrobial activity, which, because of a number of distinctive features discussed, offers a novel alternative for the control of bacterial diseases for which further development would be worthwhile.

In summary, the p20 peptide, besides its broad antibacterial spectrum against prototype bacteria, is also able to inhibit growth of the very aggressive marine bacteria *P. salmonis* which shares the same host with IPNV: salmonid fish. Additionally, as demonstrated, it is more efficient than the currently used antibiotics in aquaculture salmon farming today. Finally, to the best of our knowledge, this is the first report of a peptide arising from the processing of a virus which exhibits antimicrobial activity.

The comparison of p20 sequence with other birnavirus as IBDV,

show a high degree of identity in this region (55%), the N-terminal moiety of P46. This suggests that the IPNV peptide can have a similar behavior than P46-N terminal in IBDV and are implied in membrane interaction; however the role of the peptides in the virus cycle is not yet determined.

#### Acknowledgments

This work was funded by the Government Grant CORFO-Innova Chile PTI-11, AECID Spain Grant A/023783/09, and CICYT (CTQ2009-07758).

#### References

- Amrouche T, Sutyak Noll K, Wang Y, Huang Q, Chikindas M. Antibacterial activity of subtilisin alone and combined with curcumin, polylysine and zinc lactate against listeria monocytogenes strains. *Probiot Antimicrob Proteins* 2010;2:250–7.
- Arenas G, Guzman F, Cardenas C, Mercado L, Marshall SH. A novel antifungal peptide designed from the primary structure of a natural antimicrobial peptide purified from *Argopecten purpuratus* hemocytes. *Peptides* 2009;30:1405–11.
- Bain N, Gregory A, Raynard RS. Genetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus from Scotland. *J Fish Dis* 2008;31:37–47.
- Branson EJ, Diaz-Munoz DN. Description of a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), in South America. *J Fish Dis* 1991;14:147–56.
- Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Dev Comp Immunol* 1999;23:329–44.
- Bulet P, Stocklin R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept Lett* 2005;12:3–11.
- Bulet P, Stocklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 2004;198:169–84.
- Buschmann AH, Cabello F, Young K, Carvajal J, Varela DA, Henriquez L. Salmon aquaculture and coastal ecosystem health in Chile: analysis of regulations, environmental impacts and bioremediation systems. *Ocean Coast Manage* 2009;52:243–9.
- Cabello FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol* 2006;8:1137–44.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 2004;14:1188–90.
- Chen Y, Guarnieri MT, Vasil AI, Vasil ML, Mant CT, Hodges RS. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1398–406.
- Da Costa B, Chevalier C, Henry C, Huet JC, Petit S, Lepault J, et al. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J Virol* 2002;76:2393–402.
- Da Costa B, Soignier S, Chevalier C, Henry C, Thory C, Huet JC, et al. Blotched snakehead virus is a new aquatic birnavirus that is slightly more related to avibirnavirus than to aquabirnavirus. *J Virol* 2003;77:719–25.
- Diaz M, Arenas G, Marshall SH. Design and expression of a retro doublet of cecropin with enhanced activity. *Electron J Biotechnol* 2008;11:1–9.
- Diez H, Guzman F, Alba MP, Cuellar A, Thomas MC, Lopez MC, et al. Immunological and structural characterization of an epitope from the Trypanosoma cruzi KMP-11 protein. *Peptides* 2007;28:1520–6.
- Dobos P, Roberts TE. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus: a review. *Can J Microbiol* 1983;29:377–84.
- Duncan R, Dobos P. The nucleotide sequence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) dsRNA segment A reveals one large ORF encoding a precursor polyprotein. *Nucleic Acids Res* 1986;14:5934.
- Duncan R, Nagy E, Krell PJ, Dobos P. Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment A coding regions. *J Virol* 1987;61:3655–64.
- Galloux M, Chevalier C, Henry C, Huet JC, Costa BD, Delmas B. Peptides resulting from the pVP2 C-terminal processing are present in infectious pancreatic necrosis virus particles. *J Gen Virol* 2004;85:2231–6.
- Galloux M, Libersou S, Alves ID, Marquant R, Salgado GF, Rezaei H, et al. NMR structure of a viral peptide inserted in artificial membranes: a view on the early steps of the birnavirus entry process. *J Biol Chem*;285:19409–21.
- Galloux M, Libersou S, Morellet N, Bouaziz S, Da Costa B, Ouldali M, et al. Infectious bursal disease virus, a non-enveloped virus, possesses a capsid-associated peptide that deforms and perforates biological membranes. *J Biol Chem* 2007;282:20774–84.
- Gómez F, Henriquez V, Marshall SH. Additional evidence of the facultative intracellular nature of the fish bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Arch Med Vet* 2009;41:261–7.
- Güex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997;18:2714–23.
- Houghten RA. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:5131–5.
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 1996;14:33–8, 27–8.
- Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:491–511.

- [27] Joanne P, Nicolas P, El Amri C. Antimicrobial peptides and viral fusion peptides: how different they are? *Protein Pept Lett* 2009;16:743–50.
- [28] Jofré C, Evensen Ø, Marshall SH. Evaluation of micro RNAs on persistent and productive infection with IPNV an in vitro model system, unpublished results, 2010.
- [29] Kates SA, Albericio F. In: Kates SA, Albericio F, editors. *Solid-phase synthesis. A practical guide*. New York: Marcel Dekker; 2000., ISBN 0-8247-0359-6 p. 826 (Organic Process Research & Development).
- [30] Kiefer F, Arnold K, Kunzli M, Bordoli L, Schwede T. The SWISS-MODEL repository and associated resources. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D387–92.
- [31] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and ClustalX version 2.0. *Bioinformatics* 2007;23:2947–8.
- [32] Lee JH, Ahn SH, Kim SH, Choi YH, Park KJ, Kong IS. Characterization of *Vibrio mimicus* phospholipase A (PhlA) and cytotoxicity on fish cell. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:269–76.
- [33] Lohner K, Blondelle SE. Molecular mechanisms of membrane perturbation by antimicrobial peptides and the use of biophysical studies in the design of novel peptide antibiotics. *Comb Chem High Throughput Screen* 2005;8:241–56.
- [34] Marshall SH, Arenas G. Antimicrobial peptides: a natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electron J Biotechnol* 2003;6:271–84.
- [35] Marshall SH, Conejeros P, Zahr M, Olivares J, Gomez F, Cataldo P, et al. Immunological characterization of a bacterial protein isolated from salmonid fish naturally infected with *Piscirickettsia salmonis*. *Vaccine* 2007;25:2095–102.
- [36] Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of tetrapeptide. *J Am Chem Soc* 1963;85:2149–54.
- [37] Miita G, Vandenbulcke F, Hubert F, Roch P. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J Cell Sci* 1999;112(Pt 23):4233–42.
- [38] Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, Ng W, Sayama K, Hashimoto K, et al. Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* 2007;127:594–604.
- [39] Orvos Jr L. The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1138–50.
- [40] Peschel A, Sahl HG. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:529–36.
- [41] Reddy KV, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: promises and promises. *Int J Antimicrob Agents* 2004;24:536–47.
- [42] Rivera Z, Granados G, Pinto M, Varón D, Carvajal C, Chaves F, et al. Double dimer peptide constructs are immunogenic and protective against *Plasmodium falciparum* in the experimental Aotus monkey model. *J Pept Res* 2002;59:62–70.
- [43] Roccatano D, Colombo G, Fioroni M, Mark AE. Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12179–84.
- [44] San Martín B, Yatabe T, Gallardo A, Medina P. *Manual de Buenas Prácticas en el uso de antibióticos y antiparasitarios en la salmonicultura chilena*. Servicio Nacional de Pesca, Ministerio de Economía, Fomento y Turismo; 2010.
- [45] Santi N, Song H, Vakharia VN, Evensen O. Infectious pancreatic necrosis virus VP5 is dispensable for virulence and persistence. *J Virol* 2005;79:9206–16.
- [46] Santovena A, Oliva A, Guzman F, Patarroyo ME, Llabres M, Farina JB. Chromatographic characterization of synthetic peptides: SPf66 malaria vaccine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;766:3–12.
- [47] Schmitt P, Mercado L, Diaz M, Guzman F, Arenas G, Marshall SH. Characterization and functional recovery of a novel antimicrobial peptide (CECdir-CECret) from inclusion bodies after expression in *Escherichia coli*. *Peptides* 2008;29:512–9.
- [48] Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 2002;66:236–48.
- [49] Shai Y, Oren Z. From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides* 2001;22:1629–41.
- [50] Wang G, Li X, Wang Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D933–7.
- [51] Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2: multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 2009;25:1189–91.
- [52] Welling MM, Lupetti A, Balter HS, Lanzzeri S, Souto B, Rey AM, et al. 99mTc-labeled antimicrobial peptides for detection of bacterial and *Candida albicans* infections. *J Nucl Med* 2001;42:788–94.
- [53] Xu HT, Si WD, Dobos P. Mapping the site of guanylation on VP1, the protein primer for infectious pancreatic necrosis virus RNA synthesis. *Virology* 2004;322:199–210.
- [54] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002;415:389–95.
- [55] Zhang L, Falla TJ. Antimicrobial peptides: therapeutic potential. *Expert Opin Pharmacother* 2006;7:65

## 3. Artículo 2

**p20, a peptide derived from IPNV (Infectious Pancreatic Necrosis Virus) pVP2 protein processing is a putative regulator in viral infection.**

Claudio Jofré<sup>1</sup>, Fanny Guzmán<sup>3</sup>, Constanza Cárdenas<sup>3</sup>,

Fernando Albericio<sup>2</sup> and Sergio H. Marshall<sup>1,3,\*</sup>

Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

Institute for Research in Biomedicine, Barcelona Science Park, University of Barcelona, 08028-Barcelona, Spain.

C Núcleo Biotecnología Curauma – Pontificia Universidad Católica de Valparaíso – Campus Curauma Valparaíso, Chile.

Corresponding author- [smarshal@ucv.cl](mailto:smarshal@ucv.cl)

\*Corresponding author. Mailing address: Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Avenida Parque Sur, Campus Curauma. Valparaíso, Chile. Phone: (56)

32 2273119 Fax: (56) 32 2596703. E-mail: [smarshal@ucv.cl](mailto:smarshal@ucv.cl)

**Key words:** p20 from IPNV putative regulator in viral infection

**Key words:** p20 from IPNV putative regulator in viral infection

**Key words:** p20 from IPNV putative regulator in viral infection

**Key words:** p20 from IPNV putative regulator in viral infection

**Key words:** p20 from IPNV putative regulator in viral infection

Processing of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) pVP2 yields three main small peptides and one of them is further processed given 13 smallest derivatives. Since most of these peptides remain intracellular, we decided to find out if any of them might have regulatory roles in viral expression. In order to test this hypothesis *in vitro*, we chemically synthesized one selected peptide (now p20) and exposed it to IPNV-persistently infected and *de novo* infected cells. Evaluation using RT-qPCR for RNA detection and immune fluorescence for viral-specific protein detection shows that p20 inhibits ( $\geq 84\%$ ) VP2 mRNA in persistently infected cells and reduces ( $\geq 27,5\%$ ) viral production in *de novo* infection. Thus, p20 appears to play a regulatory role in viral RNA synthesis in *in vitro* infected cells.

## roduction

V is a prototype member of the Birnaviridae family comprising two dsRNA sub genomic segments known as “A” and “B”, respectively (Dobos & Roberts, 1983). Segment A, the larger, codifies all structural and non structural proteins in two overlapping ORFs. Early upon infection, segment A is translated into a 106-kDa polyprotein (NH<sub>2</sub>-pVP2|CTD-VP4-VP3-COOH); which is cleaved by the serine-lysine viral protease VP4 (Wu *et al.*, 1998), to yield VP3 as a mature protein and the precursor pVP2|CTD (pVP2 C-terminal domain). This process and the resultant products are outlined in Figure 1. IPNV as well as other important Birnaviruses species such as Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) and Blotched Snakehead virus (BSNV) share the same complex processing for the 71-74 residue peptide-precursor (CTD in figure 1) of the poly protein yielding three peptides in the case of IPNV and four for IBDV and BSNV, respectively (Da Costa *et al.*, 2002; Da Costa *et al.*, 2003). The putative functions for these peptides are unknown. The pVP2|CTD terminus is processed by VP4 (2, 10) to sequentially generate three small peptides: p3, p2 and finally a third peptide p44 plus mature VP2 (Figure 1C) (Da Costa *et al.*, 2002). This latter peptide is further processed now by a prolylpeptidase to yield 13 stable derivatives ranging in size from 19 to 4 amino acids which coexist in infected cells and are not constituents of infective viruses (Galloux *et al.*, 2004). Interestingly, the last peptide produced (referred as p44) is the most stable of all and because of that has been characterized for both IBDV and IPNV (Galloux *et al.*, 2004). In spite of sharing strong sequence homology, they are not identical. While in IBDV is a 46 amino acid-long molecule (thus p46), in IPNV is two amino acid shorter (p44). The complexity of the process involved to generate p44 and its stable derivatives as well as their intracellular location, suggested to us that these peptides might be involved in the biology of infection. Thus, we selected the larger and most stable of all, corresponding to the 20-residues amino terminus of p44. We have named this peptide p20 and constitute the target of our analysis (Figure 1D).

The second ORF of segment A codifies a non structural 17 kDa protein called VP5 (Duncan & Dobos, 1986; Duncan *et al.*, 1987; Xu *et al.*, 2005); while Segment B, the shortest coding sequence, codifies for the unique viral RNA-dependent-RNA-polymerase (RNP) (Xu *et al.*, 2004).

ults

**Entry of p20 into cells.** To test the potential of p20 to enter cells and to remain inside, we exposed them to rhodamine-labeled p20 followed kinetically its entrance and integrity in time. Figure 2 shows that p20, as well as K-1, the negative control peptide for experiments, enter passively the cells and remain intact inside them for at least 4 hours (Figure 2).

**Cytotoxicity.** The peptide showed no cytotoxicity over CHSE-214 cells in concentrations up to 10 times higher than the concentration used in the tests reported here.

**Validation of p44 as a representative precursor of p20 for Birnaviruses.** In order to determine the putative importance of p44-precursor-product in the frame of Birnavirus as a group, we align the corresponding sequences from IPNV, IBVD and BSNV, three species of the viral family most studied at the molecular level. We observed a high degree of identity among the IPNV sequence when p44 was compared with their counterparts: 50% with IBVD and 40% with BSNV. Interestingly, the degree of homology increases if the comparison is made exclusively at the level of the p20 region: 55% with IBVD and 50% with BSNV (Figure 3). In IBVD the p46 peptide has been studied in detail, as well as its derivative p20 (Galloux *et al.*, 2004; Galloux *et al.*; Galloux *et al.*, 2007), the homology with IPNV p20 is high, there are conserved residues as G<sub>2</sub>, D<sub>5</sub>, I<sub>6</sub>, R<sub>8</sub>, A<sub>10</sub>, P<sub>11</sub>, V<sub>12</sub>, S<sub>19</sub> and T<sub>20</sub>; some changes that shares physicochemical properties as W<sub>1</sub>F, W<sub>3</sub>F, K<sub>4</sub>R, V<sub>7</sub>I, K<sub>12</sub>R, V<sub>13</sub>I, L<sub>18</sub>V (Figure 3).

**Inhibitory effect by fluorescent microscopy.** Considering that *de novo* infection viral RNA synthesis begins only a few hours later, we evaluated the putative inhibitory action of p20 over CHSE-214 cells in the presence and absence of the target peptide counting the cells after first production cycle of IPNV, approximately 18 hours post infection (*de novo*)

infection was measured by semi quantitative immune fluorescence using as a probe a commercial kit with antibodies against viral proteins (VP2 and VP3), the two relevant constituents of the viral capsid. Figure 4 shows the result for the both models on infection. In persistent cells there is no significant difference with or without peptide treatment, but *de novo* infection shows a decrease of approximately 27.5% in the amount of infected cells. Indeed, a statistical analysis from 5 independent replicates (Statistica 7.0. software®) using a General Linear Model (GLM) (Figure 4D), displays a variance with 95% of confidence, an  $F(2,14) = 134,26$   $P=0,0001$ . Thus, the test validates the difference between infection in the presence of p20 when compared with infection in the absence of peptides and with infection with the unrelated K-1 peptide. Additionally, when comparing positive and negative controls (infection with no peptide and with K-1, respectively) did not exhibited significant differences.

7 titers was determined after peptide treatments

V titers determined after peptide treatments showed no significant difference in persistent infected cells (Figure 5), but in the case of *de novo* infection there is possible to observe a significant decrease of the intracellular IPNV infective precursors in the presence of p20 . (Figure 5)

**Inhibitory effect by RT-qPCR.** In order to test the putative role of p20 over viral-specific RNA synthesis, we evaluated its effect in the two models of infection. We exposed the cells to p20 for 24 hours and quantified, the number of VP2 mRNA-like molecules in the outside media via RT-qPCR. Figure 5 shows a decrease in the number of copies of IPNV RNA molecules detected in the presence of p20 in both models of infection.

The inhibitory effect by measuring the viral RNA synthesis in the outside media via RT-qPCR in *de novo* infection showed a decrease of 29,8% of inhibition(Figure 6A); while in persistent infected cells up to 84.1% inhibition was attained when compared with the control standard (Figure 6B).

**p20 is an amphipatic peptide with a clear  $\alpha$ -helix tendency.** In order to correlate a putative structural-function relationship of p20 as an interfering molecule, a homology structural model based was constructed based upon the information available for p46 of IBDV (PDB ID 2IMU). Figure 7 clearly shows that the CD profile of the IPNV molecule presents an  $\alpha$ -helix structure and the model shows the amphipatic distribution of the amino acids.

Table 1. Summary of the results according each infection model.

Model / Experiment	Persistent infection % inhibition	<i>de novo</i> infection % inhibition	Related to	Figure
Fluorescence	-	27,7	# infected cells/camp	4
Virus titers	3,3	99,9	Infective particles/ml	5
RT-qPCR mRNA quantification	76,0	29,8	Genomic units/sample	6

ussion

## two models of IPNV infection

In the present study, we have used two available *in vitro* models of IPNV infection to evaluate the potential role of one of the elusive peptides derived from processing the most important structural poly protein generated from translation of Segment A, the larger subgenomic component of the virus. Generally, although less than 10% of the cells in culture survive infection with virulent isolates of IPNV; Hedrick and co-authors showed that IPNV can also establish a persistent infection in cell culture, where viral titers in the culture media for  $10^3$  TCID50/ml can be normally found in the culture media, when compared to  $10^8$  TCID50/ml which is normally obtained in acute infection (Hedrick *et al.*, 1978). It is important to say that the mechanism behind persistent infection is still unknown and our results could shed light into the problem.

Therefore, these two systems are a perfect match to demonstrate the putative effect of p20 or any other peptide on viral expression.

## peptide p20

The peptide selected to initiate this study is the most stable of all derived, corresponding to the amino end of the carboxy terminal of the precursor of the most important viral structural protein VP2. We have called this molecule p20 because of its molecular mass. As its highly homologue peptide from IBDV, presents an  $\alpha$ -helix secondary structure and the structural homology model permits to establish an amphipathic distribution of the amino acids; thus enhances the potential of p20 to participate in the formation of pores in lipid membranes as already report for its IBDV counter part (Galloux *et al.*, 2004; Galloux *et al.*; Galloux *et al.*, 2007).

## Effect of p20 on viral particles secreted to the extracellular milieu.

The semi-quantitative immune detection of IPNV as a measurement of infected cells only shows significant difference in *de novo* infection (Figure 4, Table 1). This result is in agreement with the fact that in persistent infection in which expression occurs continuously below threshold levels, with no cytopathic effect detectable, but with production of extremely controlled infective particles in the incubation media. However the detection of the mRNA synthesis of VP2 by RT-PCR shows a decrease in both models (Figure 6, Table 1), being much more significant in the persistently infected cells, as expected the controlled production of virus in the extracellular milieu with an 84.1% inhibition when compared with a standard.

## Effect of p20 on the detection of *de novo* viral precursors inside the cells.

The viral titers measured in both infection models showed significant decrease only in *de novo* infection. p20 was able to decrease the number of infective viral particles by

**inhibitory effect.**

In conclusion, we provide evidence that an IPNV-processing derived peptide named p20 corresponding to the pVP2 carboxyl-terminal domain interferes with the expression of the virus *in vitro*. Based on these results, a putative function for this peptide as a regulator of viral RNA expression could be envisaged. If confirmed, it might relate p20 (as well as other internally-derived peptides) to the intriguing process of persistency, a distinguishable feature of IPNV. This is an appealing hypothesis in particular for p20, as all other small peptides derived from the poly protein processing of genomic segment A are short-lived.

In addition to the fact that p20 coexists in apparently equimolar ratios with shortened versions ranging in size from 19 to 4 amino acid residues, which could very well represent coordinated steps in the complex process of regulation of maturation of viral RNA species involved in secondary transcription and/or replication. It is an accepted fact that small peptides do interfere with multi-protein complexes that regulate viral expression particularly in RNA-containing viruses. As example, the peptide-mediated interference with Influenza A polymerase, which blocks the enzyme activity and as a consequence, blocks viral spread (Ghanem *et al.*, 2007); the also peptide-mediated oligomerization of Ebola virus transcription factor VP30 which otherwise inhibits full viral transcription (Modrof *et al.*, 2003).

Recently, a number of intracellular small molecules have been shedding light into the mechanisms by which a virus could control the interplay between transcription and replication. To the aforementioned roles of synthetic peptides in Influenza A and Ebola viral transcription, we have to incorporate small RNA molecules as well, consistently represented by the regulatory roles of microRNAs (miRNAs) in Cytomegalovirus (Meyer *et al.*, 2011) as well as the virus-generated small RNAs (svRNAs) in Influenza A virus (Perez *et al.*, 2010).

In summary, a putative sustainable role is proposed for one of the many intriguing peptides generated in IPNV infected cells which has remained elusive in their functional potential and further studies are necessary to gain insight in this appealing possibility which is extendable to other viral systems.

## **Materials and Methods**

### ***Peptide design, synthesis and purification***

The p20 coding sequence, chosen as indicated in Figure 1, was aligned and compared with its homologues from IBDV and BSNV (Figure 2) to establish their homologies. Peptide p20 was chemically synthesized using standard Fmoc chemistry (Kates, 2000), purified by RP-HPLC with a purity >95% and lyophilized until use. The peptides molecular mass was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry (Rivera *et al.*, 2002; Santovena *et al.*, 2002). The innocuous and unrelated peptide K-1 derived from *Leishmania cruzii* (Diez *et al.*, 2007) was used as a negative control, and was also chemically synthesized and characterized as described above.

### ***ular dichroism (CD) spectroscopy and structural model***

determine the secondary structure of the peptide circular dichroism (CD) spectra (Woody, 1995) of peptide p20 was obtained at 190–260 nm using a CD Spectrometer (J-810 Jasco Corporation, Japan), with signal averaging over 10 s. per 0.5 nm interval at a concentration of 0.2 mM each in 30% 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) (Roccatano *et al.*, 2009). A homology model of the peptide was constructed based on p46 IBDV peptide structure (PDB ID: 2IMU) through the Swiss Model server (Arnold *et al.*, 2006; Kiefer *et al.*, 2009).

### ***Fluorescent Labeling of Peptides and Fluorescence Microscopy***

Peptides were labeled with rhodamine-B (0.2 ml of concentration 2.5mg/ml) as recently described (Priyadarsini, 2009) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in the dark until further use. Briefly, Chinook salmon embryo cells (CHSE-214) exponentially growing in MEM were exposed to 100 ng/well concentration of rhodamine-labeled p20 peptide for 3 hours on 24 well plates. For direct detection of labeled peptides, the culture medium was discarded, and the cells were washed once with PBS (pH 7.3), subsequently rinsed three times with PBS-Tween 20 (0.05%) and analyzed under a Nikon Eclipse 400 fluorescence microscope and recorded with a Nikon Coolpix 4500 digital camera.

### ***Cell Culture***

CHSE-214 cells and IPNV-persistently infected cells (Espinoza & Kuznar, 2002; Marjara *et al.*, 2010) were cultured as exponentially growing sub confluent monolayers on 24 well plates in MEM and Leibovitz (L-15) medium respectively, supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) and 2 mM glutamine and maintained as previously described (Marjara *et al.*, 2010).

### ***Virus growth and titration***

Virus growth and titration were evaluated on two models of infection: fresh CHSE-214 cells infected *de novo* and the established CHSE-214 cell line NVI015 persistently infected with IPNV (Marjara *et al.*, 2010). For *de novo* infections, the virus propagated on CHSE-214 cell monolayers were infected at semi confluency at a multiplicity of infection of 0,001 in Leibovitz's medium (L-15, Gibco) at  $18^{\circ}\text{C}$ , supplemented with  $50\mu\text{M}$  gentamicyn, 2mM L-glutamine and 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco). After full cytopathic effect was observed, culture fluids were harvested and tittered, quantifying number of infective particles, using a

modified Reed and Muench protocol (Espinoza & Kuznar, 2002; Reed, 1938). The NVI015 cell line was handled as previously described (17). The maintenance medium (MM) was identical except that the serum concentration was reduced to 2%.

#### ***Inhibitory potential by fluorescent microscopy.***

Putative antiviral activity of p20 was measured in the two models of infection (*de novo* and persistent) followed by indirect immunofluorescence detection, under two conditions of evaluation, Infectivity and viral titres. For *de novo* infection CHSE-214 cells were grown on 24 well cell culture plaques to confluency and infected with IPNV at a multiplicity of infection of one (MOI = 0,1) for 1 hour, washed and the peptide added at 10  $\mu$ M, concentration at which in our hands full inhibition was attained for similar peptides (data not shown) diluted on maintenance media. For the persistent infected cells the peptide at same concentration was added after a period that simulating the infection. 18 hours post infection (p.i.), the cells were fixed. To measure the viral titres, the procedure was the same as above, but samples of supernatant were taken at 24 hours post infection and 24 hours post treatment, for *de novo* and persistent infection respectively, the supernatant was diluted serially 1:10 and used to infect new clean CHSE-214 cells, after 18 hours post infection, culture plates were fixed.

Plaques were fixed with methanol:acetone (3:1) for 30 min at -20°C washed and incubated with a commercial polyclonal anti-IPNV-VP3 (BiosChile, Chile) as the first antibody 1/80 for 1 hour at room temperature, washed and followed by an anti-rabbit FITC-conjugated antibody (Fluorotest, BiosChile). The modified semi quantitative method of Reed and Muench (Espinoza & Kuznar, 2002; Reed, 1938), was used to determine the focal fluorescent units under a fluorescent microscopy. The distribution of the fluorescence was analyzed on a Nikon Eclipse 400 fluorescence microscope equipped with a 100-watt mercury lamp. Color photography was performed with a Nikon Coolpix 4500 digital camera (Figure 4, 5).

#### ***Inhibitory potential by RT-qPCR.***

For *de novo* infection CHSE-214 cells grown until confluency on 24 well culture plaques, during one hour were infected with IPNV (MOI = 0,1), then the viral suspension was removed and the peptide was added at a total concentration of 10  $\mu$ M (Galloux *et al.*, 2007) for four hours, washed and fresh medium added. CHSE-214 cells persistently infected with IPNV-NVI015 were grown same as above and mock infected as described for immunofluorescence detection. After 24 hours of peptide treatment total RNA was extracted by the RNeasy lysis procedure and VP2 mRNAs expression measured by the RT-qPCR real time procedure (Stratagene 1 step RT-qPCR Kit) using SNPF primers 5'-CAA CAG GGT TCG ACA AAC CAT AC-3' and SNPR primer 5'-TTG ACG ATG TCG GCG TTT C-3'. The reaction was carried out in 30  $\mu$ l mixture consisting of Brilliant® II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix Kit, 1-Step RT-PCR (Stratagene, Inc.), primers and template RNA. Samples were amplified and detected using a Chromo 4 system (BioRad). The final cycling profile was 50°C for 55 minutes, 94°C for 10 minutes and 94°C for 30 s, 55°C for 30 s and 72°C for 40 cycles. 800 ng total RNA per experimental sample were used in each triplicate reaction. In order to quantify VP2 mRNA copies of IPNV, a

Standard curve for DNA quantification was established. To have IPNV real-time PCR standards, the VP2 region was amplified using established procedures standardized in our laboratory (Veronica Rojas *et al.*, 2008). The VP2 amplicon was cloned into PCR 2.1 vector (Invitrogen Inc.) and its specificity confirmed by sequencing. Plasmid DNA was isolated using the Qiaprep miniprep kit (Qiagen) according to the manufacturer instructions. The purified plasmid was quantified using a Nanodrop device (Nanodrop ND-1000) and serially diluted in sigma DNase-RNase free water to a final concentration ranging from 10 to  $1 \times 10^{10}$  copies of genome-equivalents/2 $\mu$ L. Two microliters of each dilution were used for real-time PCR in triplicates to create a standard curve to be used to quantify putative IPNV DNA amounts in experimental samples (Figure 6).

### ***toxicity assay***

The putative toxic effect of the synthetic peptide p20 over eukaryotic cells was measured by exposing established CHSE-214 to the peptide according to standard procedures developed in our laboratory (Díaz, 2008; Schmitt *et al.*, 2008). Briefly, cell monolayers at semi confluence were washed with PBS and then the p20, added at a range of concentrations (1–100  $\mu$ M) in triplicate wells incubated for the maximum viability time (3 h) without culture medium. Samples were then washed three times with excess of PBS before adding 0.1% trypsin in the presence of EDTA for 30–60 s to release cells from the monolayer. Individual cell viability was determined using the Trypan Blue exclusion technique (Lee *et al.*, 2002).

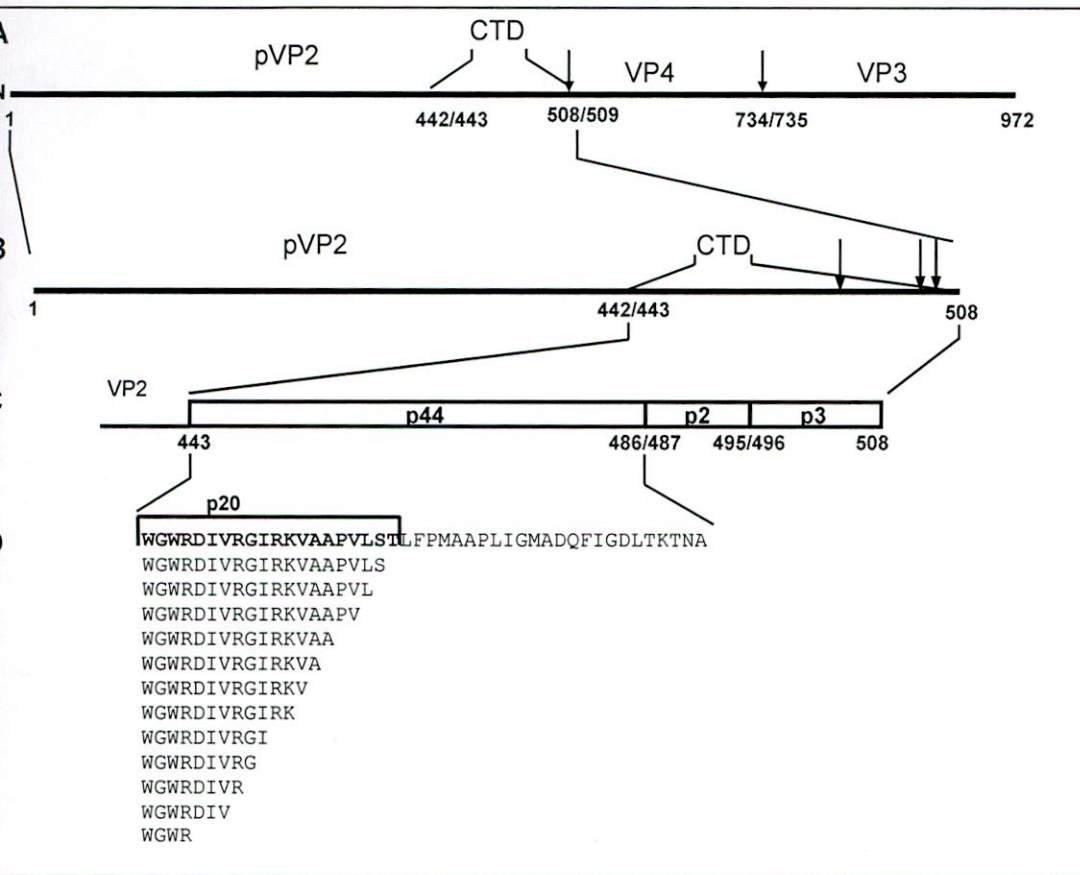
### **acknowledgments**

This work was funded by the Chilean Government Grant CORFO-Innova Chile PTI-11, Spain Grants AECID A/023783/09 and CTQ2009-07758).

This work was partially supported by Mecesus PhD scholarship.

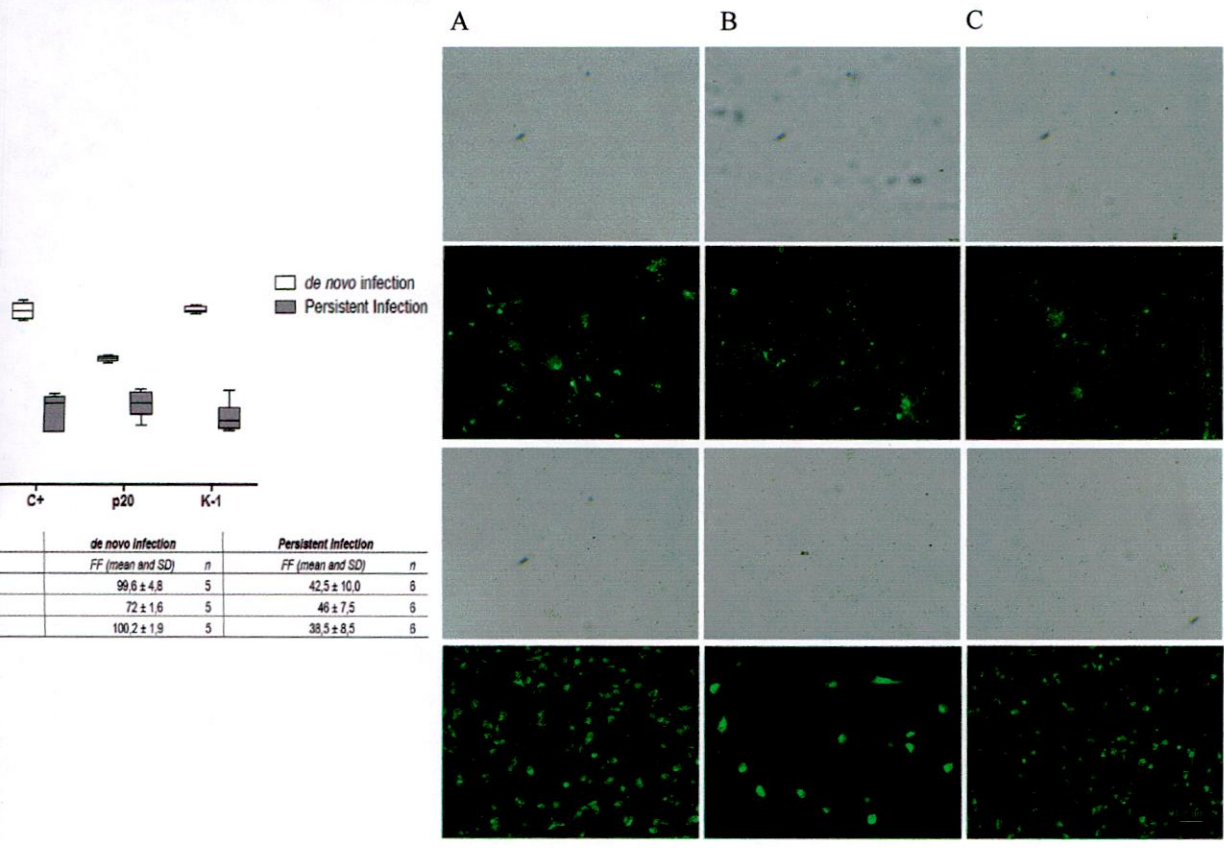
- Das, G., Guzman, F., Cardenas, C., Mercado, L. & Marshall, S. H. (2009). A novel antifungal peptide designed from the primary structure of a natural antimicrobial peptide purified from *Argopecten purpuratus* hemocytes. *Peptides* 30, 1405-1411.
- Dold, K., Bordoli, L., Kopp, J. & Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22, 195-201.
- Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J. C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H. & Delmas, B. (2002). The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J Virol* 76, 2393-2402.
- Costa, B., Soignier, S., Chevalier, C., Henry, C., Thory, C., Huet, J. C. & Delmas, B. (2003). Blotched snakehead virus is a new aquatic birnavirus that is slightly more related to avibirnavirus than to aquabirnavirus. *J Virol* 77, 719-725.
- Albericio, F., Arenas, G., Marshall, S. H. (2008). Design and expression of a retro doublet of cecropin with enhanced activity. *Electron J Biotechnol* 11, 1-9.
- Albericio, F., Guzman, F., Alba, M. P., Cuellar, A., Thomas, M. C., Lopez, M. C., Rosas, F., Velasco, V., Gonzalez, J. M., Patarroyo, M. E. & Puerta, C. J. (2007). Immunological and structural characterization of an epitope from the *Trypanosoma cruzi* KMP-11 protein. *Peptides* 28, 1520-1526.
- Dobos, P. & Roberts, T. E. (1983). The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus: a review. *Can J Microbiol* 29, 377-384.
- Costa, B., R. & Dobos, P. (1986). The nucleotide sequence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) dsRNA segment A reveals one large ORF encoding a precursor polyprotein. *Nucleic Acids Res* 14, 5934.
- Costa, B., Nagy, E., Krell, P. J. & Dobos, P. (1987). Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment A coding regions. *J Virol* 61, 3655-3664.
- Costa, B., Soignier, S., Kuznar, J. (2002). Rapid simultaneous detection and quantitation of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Journal of Virological Methods* 105, 81-85.
- Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J. C., Costa, B. D. & Delmas, B. (2004). Peptides resulting from the pVP2 C-terminal processing are present in infectious pancreatic necrosis virus particles. *J Gen Virol* 85, 2231-2236.
- Costa, B., Libersou, S., Alves, I. D., Marquant, R., Salgado, G. F., Rezaei, H., Lepault, J., Delmas, B., Bouaziz, S. & Morellet, N. NMR structure of a viral peptide inserted in artificial membranes: a view on the early steps of the birnavirus entry process. *J Biol Chem* 285, 19409-19421.
- Costa, B., Libersou, S., Morellet, N., Bouaziz, S., Da Costa, B., Ouldali, M., Lepault, J. & Delmas, B. (2007). Infectious bursal disease virus, a non-enveloped virus, possesses a capsid-associated peptide that deforms and perforates biological membranes. *J Biol Chem* 282, 20774-20784.
- Costa, B., Mayer, D., Chase, G., Tegge, W., Frank, R., Kochs, G., Garcia-Sastre, A. & Schwemmler, M. (2007). Peptide-mediated interference with influenza A virus polymerase. *J Virol* 81, 7801-7804.
- Chick, R. P., Leong, J. C. & Fryer, J. L. (1978). Persistent infections in salmonid fish cells with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)\*. *Journal of Fish Diseases* 1, 297-308.
- Chapman, W., Dalke, A. & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14, 33-38, 27-38.
- Albericio, F., Guzman, F., Cardenas, C., Albericio, F. & Marshall, S. H. A natural peptide and its variants derived from the processing of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) displaying enhanced antimicrobial activity: A novel alternative for the control of bacterial diseases. *Peptides*.
- Albericio, F., S. A., Albericio, F. (2000). *Solid-Phase Synthesis. A Practical Guide* Edited by S. A. Kates and F. Albericio. Marcel Dekker, New York. 2000. 826 pp. ISBN 0-8247-0359-6. *Organic Process Research & Development*.
- Costa, B., Arnold, K., Kunzli, M., Bordoli, L. & Schwede, T. (2009). The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res* 37, D387-392.
- Choi, Y. H., Ahn, S. H., Kim, S. H., Choi, Y. H., Park, K. J. & Kong, I. S. (2002). Characterization of *Vibrio mimicus* phospholipase A (PhLA) and cytotoxicity on fish cell. *Biochem Biophys Res Commun* 298, 269-276.
- Costa, B., I. S., Thu, B. J. & Evensen, O. (2010). Differentially expressed genes following persistent infection with infectious pancreatic necrosis virus in vitro and in vivo. *Fish Shellfish Immunol* 28, 845-853.
- Costa, B., Grey, F., Kreklywich, C. N., Andoh, T. F., Tirabassi, R. S., Orloff, S. L. & Streblow, D. N. (2011). Cytomegalovirus MicroRNA Expression Is Tissue Specific and Is Associated with Persistence. *J Virol* 85, 378-389.
- Costa, B., Becker, S. & Muhlberger, E. (2003). Ebola Virus Transcription Activator VP30 Is a Zinc-Binding Protein. *J Virol* 77, 3334-3338.
- Costa, B., J. T., Varble, A., Sachidanandam, R., Zlatev, I., Manoharan, M., Garcia-Sastre, A. & tenOever, B. R. (2010). Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Costa, B., Vimalanathan, A. B., Tyagi, M. G. (2010). Rhodamine-B labeled peptide hormone evaluation by thin layer chromatography.
- Costa, B., L. J., Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene* 27, 493-497.
- Costa, B., Z., Granados, G., Pinto, M., Varón, D., Carvajal, C., Chaves, F., Calvo, J., Rodríguez, R., Guzmán, F. & Patarroyo, M. E. (2002). Double dimer peptide constructs are immunogenic and protective against *Plasmodium falciparum* in the experimental Aotus monkey model. *The Journal of Peptide Research* 59, 62-70.

- catano, D., Colombo, G., Fioroni, M. & Mark, A. E. (2002). Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12179-12184.
- Li, N., Song, H., Vakharia, V. N. & Evensen, O. (2005). Infectious pancreatic necrosis virus VP5 is dispensable for virulence and persistence. *J Virol* 79, 9206-9216.
- Novena, A., Oliva, A., Guzman, F., Patarroyo, M. E., Llabres, M. & Farina, J. B. (2002). Chromatographic characterization of synthetic peptides: SPf66 malaria vaccine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 766, 3-12.
- Nitt, P., Mercado, L., Diaz, M., Guzman, F., Arenas, G. & Marshall, S. H. (2008). Characterization and functional recovery of a novel antimicrobial peptide (CECdir-CECret) from inclusion bodies after expression in *Escherichia coli*. *Peptides* 29, 512-519.
- Novina Rojas, M., Olivares, P. J., del Rio, R. & Marshall, S. H. (2008). Characterization of a novel and genetically different small infective variant of *Piscirickettsia salmonis*. *Microb Pathog* 44, 370-378.
- Payton, R. W. (1995). Circular dichroism. *Methods Enzymol* 246, 34-71.
- Hong, Chang, Hui, Liao & Hsu (1998). Involvement of serine proteinase in infectious pancreatic necrosis virus capsid protein maturation and NS proteinase cleavage in CHSE-214 cells. *Journal of Fish Diseases* 21, 215-220.
- H. T., Si, W. D. & Dobos, P. (2004). Mapping the site of guanylation on VP1, the protein primer for infectious pancreatic necrosis virus RNA synthesis. *Virology* 322, 199-210.



**Figure 1: Processing pathway of IPNV Segment A polyprotein.** **A.** Self cleavage of polyprotein segment A. **B.** The complex precursor pVP2CTD and the VP4 cleavage signals. **C.** Processing of pVP2 to yield p3, p2 and p44 as precursor peptide p20. **D.** p44 processing yielding stable p20 (in bold) and its 13 derivatives generated by the carboxypeptidase.





**Figure 4: Inhibition of infectivity by p20.** Semi-quantitative immune detection of IPNV in *de novo* infected CHSE-214 shows the inhibitory action of p20. **A.** Positive control. Cells infected in the absence of peptide. **B.** Cells infected in presence of 10 uM of p20. **C.** Negative control. Cells infected in the presence of peptide K-1. **D.** Focal Fluorescence Units on chart and Table (left to right, respectively) shows mean and SD values.

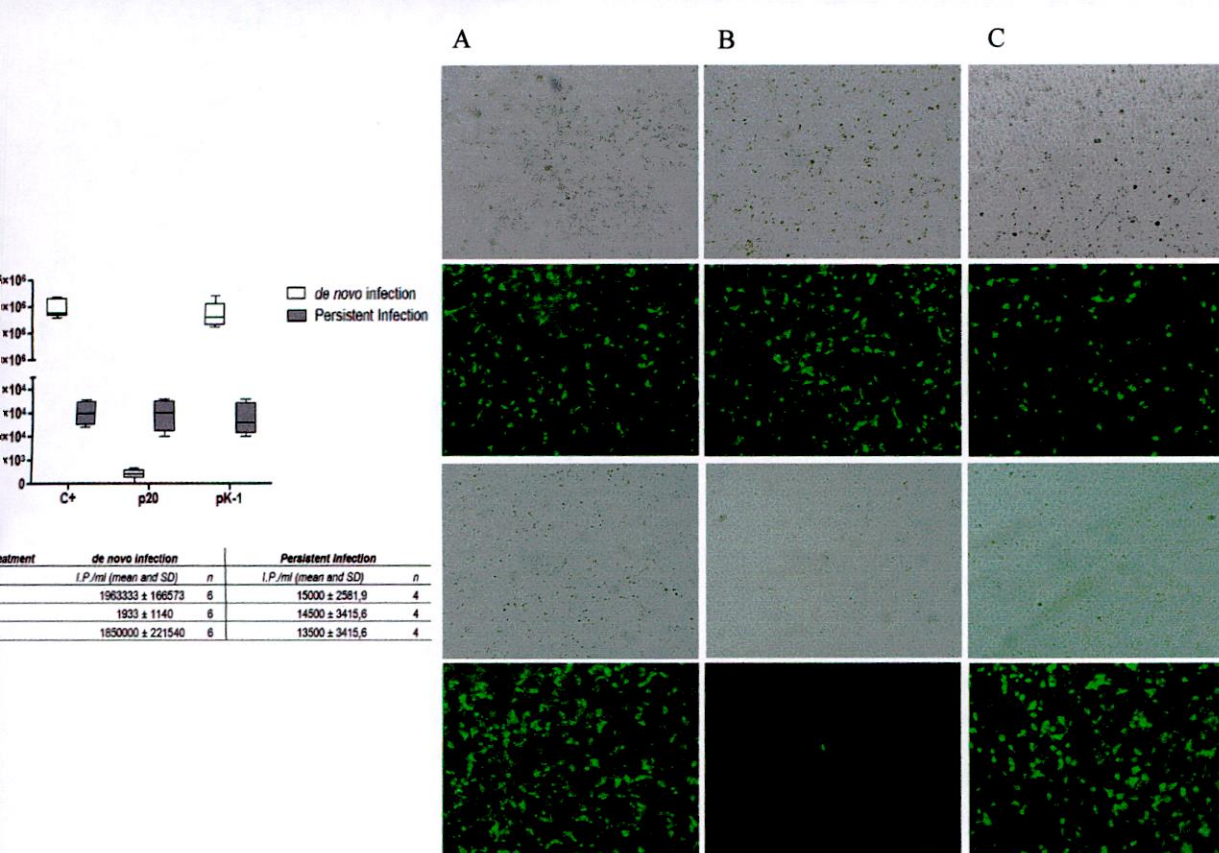
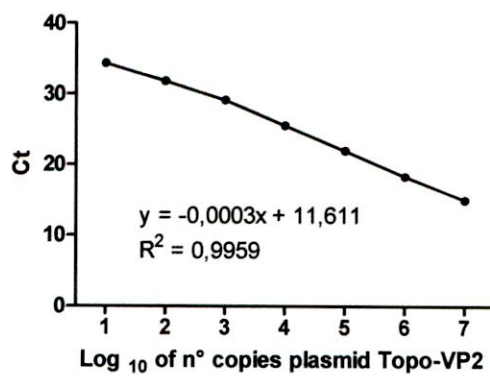
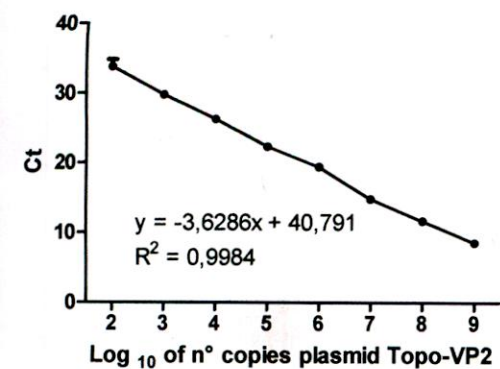
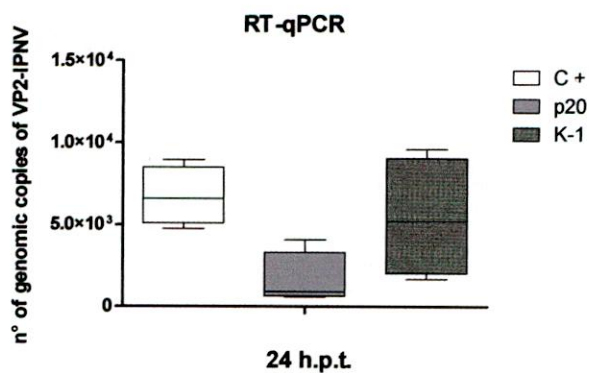
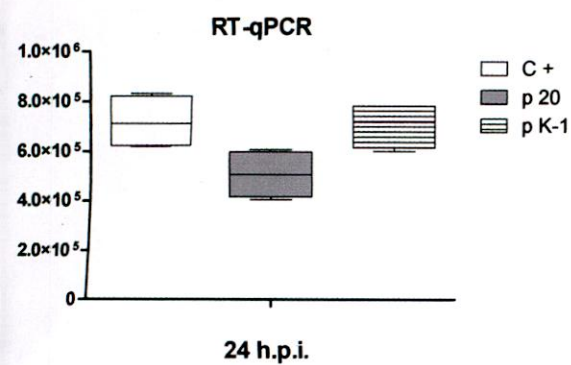
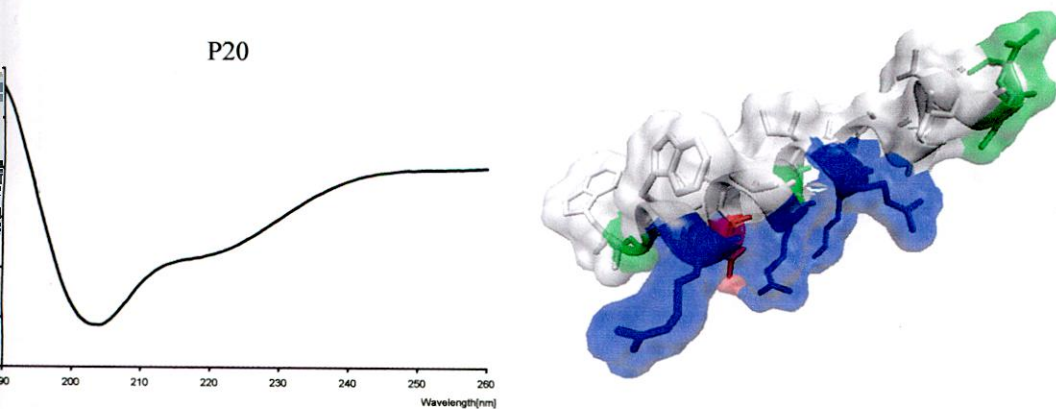


Figure 5: IPNV Titers after peptide treatments. Viral suspensions were tittered after 24 hours post infection. **Top panel:** titers from persistent infection **Bottom panel:** titers from *de novo* infection. Clear fields and Immunofluorescent images: **A:** infection control, C+; **B:** p20; IPNV peptide, C. pK-1; unrelated peptide. All images form each sample (dilution 1:1000). **Positive control, p20 and pK-1 respectively.** The MOI used in first infection was equal to 0,1.

**B**

**Figure 6: Antiviral Activity of peptide p20** **A.** De novo infected cells. **B.** Persistent infected cells. On N: CHSE-214 with IPNV, the number of copies of mRNA from VP2 of IPNV was measured with RT-qPCR from supernatant of **Bottom.** Calibration curve of number of copies of Topo-VP2 IPNV for qPCR.



**Figure 7: Circular Dichroism spectra and 3D structural model of p20.** The color code shows as white: residues, blue: positive charged residues, red: negative charged residues, and green: polar residues at charge. The figure was performed with VMD (Humphrey *et al.*, 1996).