

Analisi della sequenza aminoacidica della proteina del capsido in *Betanodavirus*

Analysis of aminoacid sequences of coat protein in Betanodavirus

Sara Ciulli*, Mara Battilani, Alessandra Scagliarini, Santino Proserpi

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, *Alma Mater Studiorum*,
Università di Bologna, Via Tolara di sopra, 50 - 40064, Ozzano Emilia (BO)

RIASSUNTO - L'infezione da *Betanodavirus* è responsabile dell'Encefalo Retinopatia Virale, una patologia a sintomatologia nervosa che colpisce varie specie ittiche d'allevamento e che causa ingenti perdite economiche. La malattia, emersa recentemente e il suo agente causale sono sottoposti a molteplici studi, ma non sono ancora disponibili efficaci mezzi terapeutici o profilattici che permettano di limitare i danni causati dai ricorrenti episodi di mortalità. L'evidenziazione di un'immunità protettiva, in soggetti sopravvissuti, ha acceso l'interesse verso la possibilità d'allestire dei vaccini per la profilassi vaccinale. I Nodavirus sono virus molto semplici costituiti da due segmenti di RNA a singolo filamento e dalla proteina del capsido, responsabile anche della stimolazione del sistema immunitario dell'ospite. Ancora scarse sono le informazioni riguardanti le caratteristiche antigeniche e la variabilità di questa proteina, conoscenze fondamentali per la comprensione dei meccanismi protettivi e un possibile suo uso a scopi vaccinali. Questo lavoro ha lo scopo di analizzare le caratteristiche antigeniche della proteina del capsido di ceppi di *Betanodavirus*, tramite la predizione dei domini antigenici stimolanti l'immunità cellulo-mediata presenti nella proteina del capsido. L'evidenziazione di una diversa espressione dei domini antigenici fa supporre una diversa capacità del virus di interagire con il sistema immunitario dell'ospite; la mancata espressione di questi domini, in particolare, può consentire al virus di eludere il sistema immunitario incrementando la propria virulenza.

SUMMARY – *Betanodavirus infection is responsible of the Viral Encephalo-Retinopathy or Viral Nervous Necrosis that cause nervous symptoms in various farmed fish species and is responsible of severe economic losses. Despite several studies that are undergoing on this disease and on its aetiological agent, any drugs or vaccine to limit the economic damage caused by repeat outbreaks of the disease are not yet available. Evidence of protecting immunity in survived fish makes more interest in vaccine setting up to control the disease. Betanodavirus are little and simple virus made by 2 RNA single stranded molecules and a coat protein antigen that stimulate the immunity in fish. Antigenic characterisation and variant studies are fundamental to understand immunity mechanism and for the use of the protein to set up a vaccine. This work has the aim to characterise antigenically the Betanodavirus coat protein through the prediction of antigenic domains. Evidence of a different expression pattern of antigenic sites makes us suppose a different ability of the virus to interact with the immune system of fish. Particularly the loss of some antigenic domains could make the virus able to elude the host immunity, make itself more virulent.*

Key words: *Betanodavirus*; Viral Encephalo-Retinopathy; *Dicentrarchus labrax*; Sequence; Antigenic prediction

* Corresponding Author: c/o Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, *Alma Mater Studiorum*, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 Ozzano Emilia (BO). Tel. 051-2097084; Fax 051-2097039; E-mail: sciulli@vet.unibo.it

INTRODUZIONE

L'Encefalo Retinopatia Virale del branzino costituisce una patologia emergente, responsabile di gravi danni economici in varie specie ittiche d'allevamento. Questa patologia è causata da un virus della famiglia *Nodaviridae*, genere *Betanodavirus* (Van Regenmortel *et al.*, 2000) e si manifesta con sintomatologia nervosa e mortalità. La malattia, emersa recentemente e il suo agente causale sono sottoposti a molteplici studi, ma non sono ancora disponibili efficaci mezzi terapeutici o profilattici che permettano di limitare i danni causati dai ricorrenti episodi di mortalità.

Le tecniche di profilassi diretta sembrano avere dato buoni risultati nelle avannotterie, dove, le condizioni ambientali strettamente controllate, permettono di tenere sotto controllo l'infezione con adeguate misure di disinfezione, il controllo dell'acqua in entrata ed il controllo dei riproduttori. L'allevamento sia estensivo sia intensivo del branzino per il consumo alimentare, invece, non permette l'applicazione di queste rigide misure di controllo essendo in genere formato da bacini naturali o gabbie ad immersione dove il pesce allevato è in stretto contatto con l'ambiente naturale. In questi casi la mancanza di barriere naturali rende impossibile l'applicazione di misure di profilassi diretta per il controllo della patologia.

Studi condotti sia su soggetti infettati sperimentalmente sia su soggetti selvatici, di varie specie ittiche, hanno evidenziato la presenza di anticorpi sierici neutralizzanti (Tanaka *et al.*, 2001; Breuil *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 1998; Mushiaki *et al.*, 1992). In soggetti sopravvissuti all'infezione gli anticorpi sono stati evidenziati fino a due anni dopo l'infezione (Breuil *et al.*, 2000). I soggetti sopravvissuti hanno inoltre dimostrato di essere protetti contro la reinfezione (Tanaka *et al.*, 2001), vari studi sono in itinere al fine di chiarire il ruolo dell'immunità umorale (Tanaka *et al.*, 2001) e di quella cellulo-mediata (Aranguren *et al.*, 2003) nella protezione dei soggetti sopravvissuti. L'immunità cellulo-mediata si è, infatti, rivelata coinvolta in attività antivirali in varie patologie del pesce in analogia con quanto osservato nei mammiferi (Nakanishi *et al.*, 2002). L'evidenziazione di questa immunità proteggente e le difficoltà legate al controllo diretto negli allevamenti estensivi e semintensivo hanno incentivato l'interesse verso lo sviluppo di un'efficace profilassi vaccinale.

I Nodavirus sono fra i più piccoli virus che colpiscono gli animali e la loro struttura è molto semplice; questi virus sono costituiti da due molecole di RNA a singolo filamento e dalla proteina del capsido che costituisce l'unico peptide ad attività immunogena. La proteina del capsido è un polipeptide di 338-340 aminoacidi codificato dall'RNA 2 di 1042-1049 bp. Dall'analisi delle sequenze aminoacidiche della proteina del capsido sono state individuate due regioni caratteristiche: una costante in tutti i virus isolati da pesci e che ha indotto a separare questi virus in un genere diverso da quello che comprende i ceppi isolati da insetti (posizione 83-216 del ceppo SJNNV Genbank accession n° D30814) ed una regione variabile (posizione 235-315 del ceppo SJNNV Genbank accession n° D30814) che permette di dividere i *Betanodavirus* in 4 genotipi virali (Nishizawa *et al.*, 1995). Lo studio della sequenza aminoacidica della proteina del capsido ha evidenziato inoltre una prima regione ad elevato numero di residui basici che, in analogia con la proteina del capsido degli *Alphanodavirus*, sarebbe il sito di interazione con l'RNA; purtroppo, la scarsissima (28,6%) identità di sequenza con il gene della proteina omologa degli *Alphanodavirus* non permette di azzardare ulteriori analogie funzionali o conformazionali fra le proteine dei due generi (Nishizawa *et al.*, 1995).

Ancora poche sono quindi le conoscenze inerenti le caratteristiche antigeniche e la variabilità di questa proteina, conoscenze fondamentali per la comprensione dei meccanismi protettivi e per un futuro uso della proteina stessa a scopo vaccinale.

MATERIALI E METODI

Ai fini dell'analisi delle sequenze aminoacidiche di isolati di *Betanodavirus* sono state utilizzate sequenze ottenute da isolati provenienti da varie specie ittiche e da varie aree geografiche per valutare l'eventuale correlazione fra le caratteristiche molecolari del virus ed il suo comportamento *in vivo*. In questo studio sono state analizzate sequenze aminoacidiche ottenute tramite sequenziamento genico da amplificati della regione della proteina del capsido di ceppi isolati presso il nostro laboratorio e sequenze proteiche selezionate dal database Genbank (Tabella 1).

N° identificativo	Specie di provenienza	Anno di isolamento	Origine geografica
MIPAV 77/00	<i>Dicentrarchus labrax</i>	2000	Mar Adriatico, Italia
MIPAV 98/00	<i>Dicentrarchus labrax</i>	2000	Mar Adriatico, Italia
MIPAV 249/00	<i>Liza ramada</i>	2000	Cattività, Italia
MIPAV 351/01 AY620367	<i>Dicentrarchus labrax</i>	2001	Mar Adriatico, Italia
MIPAV 81/02	<i>Epinephelus marginatus</i>	2002	Cattività, Italia
MIPAV 983/02	<i>Dicentrarchus labrax</i>	2002	Mar Adriatico, Italia
MIPAV 1565/02 AY620368	<i>Atractoscion nobilis</i>	2002	California, USA
MIPAV 441/03	<i>Dicentrarchus labrax</i>	2003	Mar Adriatico, Italia
MIPAV1213/03	<i>Dicentrarchus labrax</i>	2003	Mar Adriatico, Italia
MIPAV 1348/03	<i>Dicentrarchus labrax</i>	2003	Mar Adriatico, Italia
MIPAV 1416/03	<i>Dicentrarchus labrax</i>	2003	Mar Tirreno, Italia
MIPAV1672/03	<i>Epinephelus marginatus</i>	2003	Cattività, Italia
SJNNV D38637	<i>Pseudocaranx dentex</i>	1995	Giappone
DIEV Y08700	<i>Dicentrarchus labrax</i>	1997	Grecia
ETNNV AF281657	<i>Epinephelus tauvina</i>	1991	Singapore
MGNNV AF245003	<i>Epinephelus malabaricus</i>	2001	Taiwan
DGNNV AF245004	<i>Epinephelus lanceolatus</i>	2001	Taiwan
GNNV AF499774	<i>Poecilia reticulata</i>	2000	Singapore
AHNNV AJ245641	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	2000	Norvegia

Tabella 1: Nella tabella sono indicate le caratteristiche dei ceppi utilizzati.
 Table 1: The table shows the characteristics of strains used in our analysis.

L'analisi antigenica della proteina è stata condotta tramite il metodo di Jameson-Wolf (Jameson & Wolf, 1988) che predice la presenza di potenziali siti antigenici. L'esistenza dei siti antigenici stimolanti l'immunità cellulo-mediata è stata valutata esaminando le sequenze aminoacidiche primarie con gli algoritmi AMPHI e SETTE. Questi algoritmi sono stati creati per lo studio preliminare delle sequenze primarie delle proteine in assenza del peptide purificato e sono molto utilizzati nello studio preliminare dei vaccini a subunità stimolanti l'immunità cellulo-mediata (Margalit *et al.*, 1987).

La predizione dei siti antigenici immunodominanti stimolanti i linfociti T helper, effettuata tramite l'algoritmo AMPHI si basa sull'identificazione di variazioni periodiche della polarità degli aminoacidi nella sequenza primaria che conferiscano alla molecola una struttura ad elica anfipatica stabile, struttura tipica dei siti antigenici che stimolano i linfociti T (Margalit *et al.*, 1987).

L'algoritmo SETTE, invece, permette la predizione dei siti antigenici che interagiscono con il complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC II) identificando i motivi strutturali deputati a questa funzione sulla base delle caratteristiche biochimiche degli aminoacidi che li compongono e non sulla base della effettiva identità aminoacidica (Sette *et al.*, 1989). Questi metodi sono stati validati su peptidi di eucarioti, procarioti e di origine virale mostrando una efficienza superiore al 75% (Sette *et al.*, 1989; Margalit *et al.*, 1987).

Tutti i metodi utilizzati sono implementati nel programma Protean (DNASTAR, Lasergene, USA).

RISULTATI

L'analisi antigenica ha evidenziato la presenza di varie zone ad attività antigenica comuni alla maggior parte dei ceppi analizzati, indipendentemente dal genotipo e dalla specie di origine facendo ipotizzare un coinvolgimento di questa proteina nella stimolazione dell'immunità cellulo-mediata. La presenza di siti antigenici stimolanti l'immunità cellulo-mediata, evidenziati dall'analisi effettuata sulla proteina del capsido conferma il risultato ottenuto da altri Autori che hanno evidenziato con prove sperimentali il coinvolgimento dell'immunità cellulo-mediata nell'infezione da *Betanodavirus* (Aranguren *et al.*, 2003) avvalorando quindi l'attendibilità del metodo predittivo utilizzato.

Confrontando le sequenze primarie si evidenzia che l'elevata conservazione dei siti antigenici è da attribuire sia alla elevata conservazione della sequenza aminoacidica sia, nei casi di mutazioni, alla conservazione delle caratteristiche biochimiche e di polarità della struttura proteica. In particolare l'estremità amminica della proteina si è rivelata ricca di siti capaci di interagire con l'MHC II evidenziati tramite l'algoritmo Sette. Anche in questo caso i siti evidenziati hanno manifestato un'elevata conservazione indipendentemente dalla specie di origine e dal sito di provenienza del ceppo, ad eccezione del ceppo 77/00 isolato da *Dicentrarchus labrax* durante un focolaio ad elevata mortalità avvenuto nell'estate del 2000 in un allevamento del basso Mar Adriatico (Fig. 1).

Questo ceppo ha evidenziato una variazione significativa della sequenza aminoacidica a livello dell'estremità amminica della proteina con conseguente alterazione delle caratteristiche di polarità della struttura (Fig. 2); questa variazione si è concretizzata nella perdita di un dominio che lega gli MHC II presente in tutte le altre sequenze analizzate anche appartenenti ad altri genotipi.

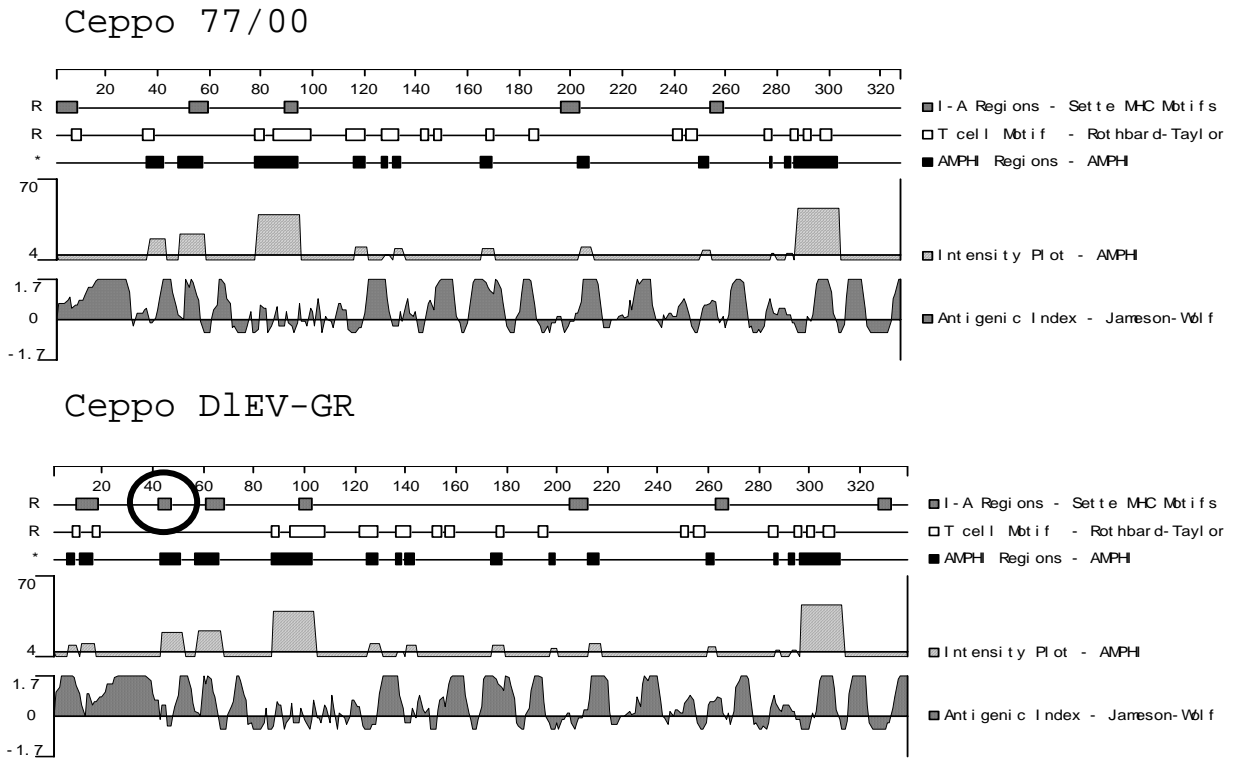


Figura 1 - Analisi antigenica dei ceppi 77/00 e DIEV-GR. Si evidenzia la mancanza di un dominio legante gli MHC nella porzione amminica del ceppo 77/00.

Figure 1: Antigenic analysis of 77/00 and DIEV-GR strains. We underlined the absence of a MHC binding domain in 77/00 strain.

	*	20	*	40	*	60	
MGNNV	:	AKPATTKAANPQPRRRANNRRRSNRTDAPVSKASTVTGFGGRGTNDVHLSGMSRISQAVLEAG	:	62			
ETNNV	:	AKPATTKAANPQPRRRANNRRRSNRTDAPVSKASTVTGFGGRGTNDVHLSGMSRISQAVLEAG	:	62			
DGNNV	:	AKPATTKAANPQPRRRANNRRRSNRTDAPVSKASTVTGFGGRGTNDVHLSGMSRISQAVLEAG	:	62			
GGNV	:	AKPATTKAANPQPRRRANNRRRSNRTDAPVSKASTVTGFGGRGTNDVHLSGMSRISQAVLEAG	:	62			
DIEV-Gr	:	AKTATTKAANPQPRRRATNRRRSNREDAPLAKASTVTGFGGRGTNDVHLSGMSRISQAVLAAG	:	62			
SJNNV	:	AKPATTKAANPQPRRRATQRRRSGRADAPLAKASTITGFGGRGTNDVHLSGMSRIAQAVVPEAG	:	62			
ECNNV	:	AKPATTKAANPQPRRRANNRRRSNRTDAPVSKASTVTGFGGRGTNDVHLSGMSRISQAVLEAG	:	62			
SGNNV	:	AKPATTKAANPQPRRRANNRRRSNRTDAPVSKASTVTGFGGRGTNDVHLSGMSRISQAVLEAG	:	62			
77-00	:	AKPATTKAANPQPRRRANNRRRSNRTDAPVSKASTVTGFGGRGTNDVHLSGMSRISQAVLEAG	:	62			
		AKpaATTKAANpQPRRRAnnRRRSnRtDAPVSKAST6TGFGGRgtNDVH6SGMSRISQAV6pAG					

Figura 2: Allineamento della sequenza primaria della proteina del capsido di ceppi di *Betanodavirus* provenienti da varie specie ospiti e da varie aree geografiche. La mutazione responsabile della perdita del dominio legante l'MHC è stata resa evidente.

Figure 2: Alignment of the coat protein primary sequence of strains isolated from different species and different geographic area. We evidenced the mutation responsible of the absence of the MHC binding domain.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'infezione da *Betanodavirus* è responsabile di gravi danni economici nell'allevamento del branzino. Nonostante i numerosi studi in itinere non sono ancora disponibili misure di profilassi efficaci nei confronti di questa patologia.

Le difficoltà nell'applicazione della profilassi diretta nel sistema d'allevamento utilizzato per il branzino, la specie maggiormente colpita nel Mediterraneo, ha incentivato lo studio sull'allestimento di presidi vaccinali. L'elevata semplicità dell'agente eziologico ha permesso di concentrare gli studi sulla proteina del capsido, l'unica proteina strutturale del virus e quindi responsabile della stimolazione del sistema immunitario dell'ospite.

La stimolazione antigenica indotta da questa proteina sembra garantire un'immunità proteggente dalla reinfezione. La compartecipazione della componente cellulo-mediata all'immunità è stata recentemente dimostrata (Aranguren *et al.*, 2003).

Questo studio ha lo scopo di indagare le caratteristiche di antigenicità delle sequenze aminoacidiche primarie di proteine del capsido di vari isolati virali. In particolare sono stati evidenziati i siti antigenici stimolanti l'immunità cellulo-mediata.

In contrasto con una generale conservazione dei siti antigenici in ceppi appartenenti ai vari genotipi e provenienti da diverse aree geografiche e specie ospiti, è stata evidenziata la mancanza di un sito legante l'MHC II all'estremità amminica di un ceppo isolato in un focolaio ad elevata mortalità in cui erano stati colpiti sia soggetti giovani sia adulti.

Nonostante non vi siano studi sulla struttura terziaria della proteina del capsido dei *Betanodavirus*, la porzione amminica di questa proteina, sia per l'elevato contenuto di aminoacidi basici, sia in analogia con la proteina omologa degli *Alphanodavirus*, sembra essere deputata all'interazione con l'RNA virale assumendo una localizzazione più interna a livello della struttura terziaria della molecola. L'importanza dei siti antigenici stimolanti l'immunità cellulo-mediata a questo livello non è da ritenere di minore importanza, poiché a differenza dei siti stimolanti l'immunità umorale essi non sono sempre sulla superficie esterna della molecola (Vennema *et al.*, 1991).

Una diversa espressione dei domini antigenici influenza la capacità del virus di interagire con il sistema immunitario dell'ospite; la mancata espressione di questi domini può, infatti, consentire al virus di eludere il sistema immunitario incrementando la propria virulenza. Sebbene siano necessari ulteriori indagini che possano correlare le caratteristiche genetiche del virus con un diverso comportamento biologico, la diversa espressione antigenica dimostrata con il modello predittivo potrebbe essere indice di ceppi a diversa virulenza in analogia con quanto dimostrato per altri virus (Battilani *et al.*, 2003).

BIBLIOGRAFIA

Aranguren R., Villamil L., Tafalla C., Figueras A. & Novoa B. (2003). Immune response of sea bream, *Sparus aurata* L, experimentally infected with nodavirus: induction of MX and TGF β 1 expression. *11th International EAFP Conference on "Diseases of fish and shellfish" 21-26 settembre 2003, Malta*: O-98.

Battilani M., Ostanello F., Gallina L. & Morganti L. (2003). Analisi della sequenza aminoacidica della proteina del nucleocapside N dei coronavirus felini. *Atti LVII Convegno Nazionale Società Italiana Scienze Veterinarie, 25-27 settembre 2003, Ischia (Na)*: 157-158.

- Breuil G., Pepin J.F., Castric J., Fauvel C. & Thiery R. (2000). Detection of serum antibodies against nodavirus in wild and farmed adult sea bass: application to the screening of broodstock in sea bass hatcheries. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 20: 95-100.
- Jameson B.A. & Wolf H. (1988). The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *CABIOS.*, 4: 181-186.
- Margalit H., Spouge J.L., Cornette J.L., Cease K.B., Delisi C. & Berzofsky J.A. (1987). Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence. *J. Immunology*, 138: 2213-2229.
- Mushiaki K., Arimoto M., Furusawa T., Furusawa I., Nakai T. & Muroga K. (1992). Detection of antibodies against Striped Jack Nervous Necrosis virus (SJNNV) from broodstocks of striped jack. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 2351-2356.
- Nakanishi T., Fischer U., Dijkstra J.M., Hasegawa S., Somamoto T., Okamoto N. & Ototake M. (2002). Cytotoxic T cell function in fish. *Develop. Comp. Immunology*, 26: 131-139.
- Nishizawa T., Mori K., Furuhashi M., Nakai T., Furusawa I. & Muroga K. (1995) Comparison of coat protein genes of five *Nodavirus*, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *J. Gen. Virology*, 76: 1563-1569.
- Sette A., Buus S., Appella E., Smith J.A., Chesnut R., Miles C., Colon S.M. & Grey H.M. (1989). Prediction of major histocompatibility complex binding regions of protein antigens by sequence pattern analysis. *Proceedings of the National Academy of Science*, 86: 3296-3300.
- Tanaka S., Mori K., Arimoto M., Iwamoto T. & Nakai T. (2001). Protective immunity of sevendand grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *J. Fish Dis.*, 24: 15-22.
- 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*.
- Vennema H., De Groot R.J., Harbour D.A., Horzinek M.C. & Spaan W.J.M. (1991). Primary structure of the membrane and nucleocapsid protein genes of feline infectious peritonitis virus and immunogenicity of recombinant vaccinia viruses in kittens. *Virology*, 181: 327-335.
- Watanabe K., Suzuki S., Nishizawa T., Suzuki K., Yoshimizu M. & Ezura Y. (1998). Control strategy for viral nervous necrosis of barfin flounder. *Fish Pathol.*, 33: 445-446.