



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DEL ANTÍGENO HE
(HEMAGLUTININA-ESTERASA) DEL VIRUS DE LA ANEMIA
INFECCIOSA DEL SALMÓN (ISA) EN LEVADURAS DE LA
ESPECIE *Pichia pastoris***

Daniela Paz Alejandra Avaria Piccardo

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

PROFESOR GUIA: DR. SERGIO BUCAREY VIVANCO

SANTIAGO – CHILE
2010

Agradecimientos

Quisiera expresar mi profundo agradecimiento a mi profesor guía el Dr. Sergio Bucarey Vivanco, por brindarme su apoyo, sus siempre útiles consejos y su incondicional guía durante todo este proceso, puesto que sin estos elementos, nada hubiese sido posible. Quiero además agradecerle su fe en mí, por darme la oportunidad de realizar tan desafiante e interesante proyecto. También, quiero expresar mi gratitud hacia el Dr. Leonardo Sáenz, por su colaboración y guía desinteresada cuando se la solicitaba. Además, quiero agradecer a al equipo que trabajan en el laboratorio Biovetec por toda su colaboración, especialmente a Sonia Vidal, por su gran disposición a ayudar cada vez que era necesario. Se agradece a la Unidad de Investigación y Desarrollo de Biológicos del Laboratorio Centrovét Ltda, por la facilitación de reactivos y material indispensables para el desarrollo de esta memoria. Deseo agradecer igualmente a mi madre, Cristina Piccardo y a mi padre, Fernando Avaria, por su incondicional apoyo durante toda esta travesía, por haber compartido conmigo las alegrías y frustraciones que ello conlleva.

Muchas Gracias.

FINANCIAMIENTO:

Esta memoria contó con el financiamiento del Proyecto Bicentenario PSD 23 de CONICYT; y Proyecto de Iniciación en Investigación VID I/07, de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile.

Índice

Agradecimientos	1
Índice	2
Introducción	5
Revisión Bibliográfica	6
Hipótesis	12
Objetivo General:.....	12
Objetivos Específicos:	12
Materiales y Métodos:	13
1- Manipulación de ADN	13
Clonamiento del gen <i>HE</i> del virus ISA.	13
2- Transformación de <i>P. pastoris</i> e inducción de síntesis proteica.	15
3- Análisis de Proteínas Recombinantes.....	15
3.1 Determinación de la concentración de la proteína total en el sobrenadante de cultivo	15
3.2 Visualización mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE).....	16
3.3 Análisis Western blot de los sobrenadantes de cultivos utilizando un anticuerpo específico anti-HE.....	16
3.4 ELISA indirecto de sueros de salmones infectados naturalmente.....	17
3.5. Fuente, obtención y manipulación de los sueros	18
4. Análisis de Resultados	19
Esquema Resumen de Procedimientos	20
Resultados	22
1- Manipulación de ADN	22
Clonamiento del gen <i>HE</i> del virus ISA.	22
2- Transformación de <i>P. pastoris</i> e inducción de síntesis proteica.	27
3- Análisis de Proteínas Recombinantes.....	29
3.1 Determinación de la concentración de la proteína total en el sobrenadante de cultivo	29
3.2 Análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS-PAGE	30
3.3 Análisis Western blot de los sobrenadantes de cultivos utilizando un anticuerpo específico anti-HE.....	32
3.4 ELISA indirecto con suero de salmones del Atlántico infectados naturalmente....	33
Discusión	35
Conclusiones	41
Bibliografía	42
Anexo 1	46
Anexo 2.....	47
Anexo 3.....	48
Anexo 4.....	51

Resumen

La anemia infecciosa del salmón es una enfermedad que afecta principalmente a los salmones del Atlántico (*Salmo salar*) y es causada por el virus ISA (infectious salmon anemia), el cual pertenece al género *Isavirus* de la familia *Orthomyxoviridae*. En Chile fue detectado por primera vez en salmones del Atlántico en el año 2007, causando innumerables pérdidas a la industria salmonera. El virus posee variadas proteínas de superficie, siendo las más estudiadas la neuroaminidasa, y la hemaglutinina-esterasa (HE). El gen que codifica para la proteína HE, posee una “región altamente polimórfica”, la cual le confiere gran variabilidad entre diferentes aislados del virus ISA. En el presente estudio se utilizó el gen *HE* del genotipo viral aislado con mayor frecuencia en Chile (genotipo EU), el cual fue sintetizado químicamente y optimizado para ser expresados por levaduras. El gen *HEopt* fue subclonado dentro del vector de expresión pPICZ α junto a un péptido señal de secreción extracelular, el cual fue integrado al genoma de la levadura *Pichia pastoris* por recombinación homóloga. La cepa de la levadura que se obtuvo como resultado, fue sometida a fermentación y la cantidad de proteína HE secretada al medio de cultivo fue medida a través de la técnica de Bradford. Con el fin de corroborar la especificidad de la inmunorreacción de las proteínas recombinantes secretadas se realizaron ensayos Western blot y ELISA, utilizando un anticuerpo específico anti-ISA y sueros de salmones infectados naturalmente con el virus, respectivamente. De estos análisis se concluyó que la proteína recombinante producida y secretada por la cepa de levadura es específica y presenta inmunorreactividad positiva. De lo anterior puede inferirse que la plataforma montada y las proteínas recombinantes producidas en esta memoria serían de gran utilidad para la futura generación de técnicas tanto de diagnóstico como de control del virus de la anemia infecciosa del salmón en Chile.

Abstract

Infectious salmon anemia (ISA) is a viral disease that mainly affects farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). This disease is caused by the ISA virus, which belongs to the genus *Isavirus*, *Orthomyxoviridae* family. It was first detected in 2007 in farmed Atlantic salmon of the coast of Chile, causing significant loss to the salmon industry. The ISA virus possesses many known surface projections; however the neuraminidase and hemagglutinin-esterase (HE) are the most widely studied. The encoding gene for the HE protein possesses a "highly polymorphic region", which confers it great variability among ISA virus isolates. In this study, the *HE* gene was used as it is the most frequently isolated genotype in Chile. The *HE* gene with a yeast-optimized codon usage was chemically synthesized. The full length HE-optimized encoding gene of ISA virus was cloned into a secretory pPICZ α vector and then inserted by homologous recombination into *Pichia pastoris* genome. The recombinant yeast strain was submitted to a fermentation process and the amount of secreted protein to the supernatant was measured by the Bradford technique. To test whether yeast-secreting HE protein possesses the same antigenic properties as the natural ISA virus HE protein, Western blot and ELISA immunoassays were conducted using a specific anti-ISA antibody and a natural infected salmon serum, respectively. Both immunoassays showed a positive result. Consequently, these results suggest that the yeast-expression system set up in this study and that the recombinant proteins thus produced, could aid the development of both diagnosis and control techniques for the infectious salmon anemia disease thus preventing the loss caused by this disease.

Introducción

El virus de la anemia infecciosa del salmón (ISA, del inglés infectious salmon anemia), pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, del género *Isavirus*. Afecta principalmente al salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Vike *et al.*, 2008), pudiendo infectar a otros miembros de la familia *Salmonidae*. Sin embargo, se considera altamente hospedero-específico, por lo que no representa un riesgo ni para otras especies, ni para la salud humana.

El virus ISA está presente en la mayoría de los países productores de salmón del Atlántico, tales como Noruega, Canadá, Irlanda, Islas Faroe y EUA (Vike *et al.*, 2008). En Chile se identificó por primera vez en el año 1999 en el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), sin que los peces presentaran la sintomatología clásica, sino que una condición clínica llamada “*Síndrome Icterus*” (Godoy *et al.*, 2008). Sin embargo, en el año 2007 en un criadero de salmones del Atlántico en Chiloé, se presentó un brote con signología concordante con la forma clásica de la enfermedad asociada al virus (Godoy *et al.*, 2008).

Uno de los principales factores de virulencia del virus ISA es la proteína HE (hemoaglutinina-esterasa), la cual además de poseer actividad hemoaglutinina, posee una actividad acetilsterasa, por lo que se le ha denominado antígeno HE. Esta proteína de superficie es esencial para la unión del virus a las células del hospedero. El gen que codifica para ella posee una “región altamente polimórfica” HPR (highly polymorphic region), dando origen a distintos genotipos virales, los cuales poseen diferentes niveles de efectos citopáticos (virulencia) (Markussen *et al.*, 2008).

Con la realización de esta memoria se espera obtener información de relevancia para utilizar esta proteína en el desarrollo de métodos de diagnósticos y control del virus de la anemia infecciosa del salmón en Chile.

Revisión Bibliográfica

El virus ISA (la sigla que da origen al nombre proviene del inglés infectious salmon anemia), causa la enfermedad llamada anemia infecciosa del salmón, la cual afecta principalmente al salmón del Atlántico (Vike *et al.*, 2008), pudiendo infectar a otros miembros de la familia *Salmonidae*. Sin embargo, es en los salmones del Atlántico en quienes se produce la forma clásica de la enfermedad, la cual se manifiesta a través de signos tanto externos como internos. Entre los primeros destacan: aumento de mortalidad, peces letárgicos, palidez de branquias (debido a la anemia), hemorragia de la cámara anterior del ojo y exoftalmia. Dentro de los signos internos con mayor relevancia se describen: congestión intestinal y hepática, ascitis, petequias en ciegos pilóricos y en grasa visceral.

La producción de salmones, y en general la mayoría de las producciones, se caracterizan por tener altas densidades de individuos en poco espacio, si a esto le adicionamos que la anemia infecciosa del salmón es una enfermedad altamente contagiosa, se traduce en una situación ideal para la diseminación de la enfermedad. Es por esta causa, más el gran impacto económico que genera la enfermedad, que fue listada como una enfermedad de notificación obligatoria por la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) (Mardones, *et al.*, 2009).

Una vez establecido el virus en una piscicultura, este puede propagarse de jaula en jaula por varios meses, observándose rangos de mortalidad variable, así como distintos grados de afección a los peces infectados (Mardones, *et al.*, 2009). En general, se inicia con expresiones bajas de mortalidad pudiendo aumentar en relación a las temperaturas del agua a niveles más significativos (entre 0,5 a 1%), llegando a mayores tasas de mortalidad acumuladas en aquellas jaulas infectadas al cabo de algunos meses (Sernapesca, 2008).

La transmisión del virus ocurre principalmente de forma pasiva por medio del agua de mar, o bien, por contacto directo entre salmones infectados y sanos en una misma jaula (Nylund *et al.*, 2006). El virus se propaga esencialmente a través de sangre, mucus, contenido intestinal y orina de animales infectados, los cuales pueden transmitir el virus semanas antes de la aparición de los signos clínicos (Cipriano, 2002). Además, el agente puede sobrevivir y replicarse en peces silvestres, los que actúan como reservorios y diseminadores del virus. Entre estos se encuentran los arenques del Atlántico (*Clupea harengus*), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la trucha café y trucha de mar (*Salmo trutta*) (OIE, 2000; Sernapesca, 2008). Adicionalmente se ha observado que la presencia del vector *Caligus sp.*, denominado comúnmente como “piojo de mar”, juega un rol importante en la diseminación del virus (Sernapesca, 2008).

El diagnóstico se puede realizar en base a los signos clínicos, evidencias histopatológicas y pruebas moleculares tales como RT-PCR (reverse transcriptase - polymerase chain reaction) e IFAT (immunofluorescence antibody test) (Godoy *et al.*, 2008). Actualmente, los métodos de diagnóstico para el ISA están especialmente detallados y estandarizados internacionalmente para cada condición de la enfermedad en el “Manual de pruebas diagnósticas para animales acuáticos” de la OIE (*Manual of diagnostic test for aquatic animal*) (OIE, 2006).

Hasta el día de hoy, no existe tratamiento médico contra la enfermedad por lo que es necesario tomar estrictas medidas de profilaxis con el fin evitar la entrada del virus a una determinada zona. Para enfrentar esta situación el Servicio Nacional de Pesca (Sernapesca) ha dispuesto diversas medidas entre las cuales se destacan:

- Eliminación o cosecha de las jaulas con animales afectados por ISA.
- Delimitación de zonas de cuarentena y vigilancia.
- Restricción de movimientos de la zona afectada.
- Estrictas medidas de bioseguridad.
- Condiciones de cosecha y proceso especiales para centros ubicados en las zonas bajo cuarentena y vigilancia.
- Chequeo de smolt y reproductores.
- Sistemas de desinfección de RILES en plantas de proceso.
- Establecimiento de monitoreo y vigilancia permanente de los centros de las zonas afectadas y otros relacionados con el brote.
- Reporte semanal de mortalidades por parte de los centros de cultivo como elemento de alerta temprana.
- Adicionalmente los laboratorios de diagnóstico y empresas de cultivo deben reportar de manera inmediata los resultados y cambios clínicos sugerentes de la enfermedad.
- Realizar una cosecha temprana de los peces, lo que se traduce en una disminución de la carga viral.
- Eliminación de los peces de las balsas-jaula con mortalidad por ISA.
- Los salmones infectados con ISA deben ser procesados en plantas de proceso autorizadas para ello, puesto que deben contar con sistemas de tratamiento de los efluentes que sea capaz de eliminar el riesgo de diseminar el virus a otras áreas. Conjuntamente con esto, el Sernapesca y la autoridad marítima, deben ser previamente informados.

La anemia infecciosa del salmón se ha convertido en una de las enfermedades más importantes para la industria del salmón (Mardones *et al.*, 2009). Luego que se detectara por primera vez en Noruega en el año 1984 (Vike *et al.*, 2008), el virus se diseminó rápidamente hacia otras partes del mundo, reportándose brotes en Canadá en el año 1996, Escocia en 1998, Islas Faroe en 1999, Estados Unidos en el año 2000 y en Chile afectando por primera vez a los salmones del Atlántico, en el año 2007 (Godoy *et al.*, 2008). La enfermedad permanece como endémica en la gran mayoría de estos países. Sin embargo, Escocia, es el único país donde se ha logrado su erradicación (Vike *et al.*, 2008). De acuerdo al análisis del genoma viral, se han diferenciado dos genotipos designados según el área geográfica de aislamiento: el genotipo europeo (EU) y el norteamericano (N), (Godoy *et al.*, 2008; Bouchard *et al.*, 2001).

Chile ocupa el segundo lugar como país productor de salmones del Atlántico, luego de Noruega (Mardones *et al.*, 2009) y la presencia del virus ISA ha causado grandes estragos sobre la industria salmonera del país. En Chile se detectó por primera vez en el año 1999, en el salmón coho, sin que los peces presentaran la sintomatología clásica, sino que una condición clínica llamada “*Síndrome Icterus*”. Luego de aislar el virus, se demostró que pertenecía al genotipo N (Godoy *et al.*, 2008). Por otra parte, en el año 2007 en un criadero de salmones del Atlántico en Chiloé, se registraron aumentos repentinos en la mortalidad de peces que se estaban recuperando de piscirickettsiosis. Basándose en los signos clínicos, lesiones presentes y pruebas inmunohistológicas, se logró confirmar el diagnóstico de ISA virus. Posteriormente, a través de la realización de un análisis genético mediante PCR y secuenciación, se determinó que correspondía al genotipo EU (Godoy *et al.*, 2008).

Puesto que la cepa que afecta a los salmones de nuestro país tiene una estrecha relación filogenética con la cepa proveniente de Noruega, adicionado a que en Chile no existen hospederos naturales, ya que el salmón del Atlántico ha sido introducido desde diversos países, entre ellos Noruega; se postula que la propagación del virus pudo haberse ocasionado vía transmisión vertical por medio de embriones infectados provenientes de este país, ya que anualmente grandes cantidades son importadas a Chile (Vike *et al.*, 2008).

El virus ISA pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, del género *Isavirus* (Godoy *et al.*, 2008), es un virus ARN envuelto de 45 a 140 nm de diámetro (Cipriano, 2002) con proyecciones de superficie, las cuales corresponden a una glicoproteína hemoaglutinina-esterasa (HE), una proteína neuroaminidasa (NA) y una proteína de fusión (F); codificadas en el segmento 6, 4 y 5 respectivamente (Godoy *et al.*, 2008).

El genoma del virus ISA consiste en 8 fragmentos de ARN negativo de hebra simple de 1 a 2,4 kb, con un peso molecular total de aproximadamente 14 kb. De todo el genoma, los marcos de lectura abiertos más estudiados corresponden a ORF6, el cual codifica para la proteína HE; ORF5, que codifica para la proteína de fusión; ORF4 que codifica para la NA y ORF2 que codifica para la ARN polimerasa (Clouthier *et al.*, 2002).

La HE es esencial para la unión del virus a la célula hospedero. El gen que codifica para esta proteína posee en una de sus regiones una serie de 35 aminoácidos que varía entre los distintos aislados del virus, a esta secuencia se le llama “región altamente polimórfica” o “HPR” (highly polymorphic region) dando origen a distintos grupos de HPR, los cuales tienen diferentes niveles de efectos citopáticos. (Devold *et al.*, 2001; Mikalsen *et al.*, 2005).

La producción de proteínas recombinantes, es decir, que son producidas a partir de material genético proveniente de distinto origen, permite la modificación o mantención de rasgos conformacionales presentes en la proteína original. Para la producción de antígenos virales con fines biotecnológicos, es esencial que las proteínas recombinantes resultantes tengan características conformacionales similares a las del virus de campo. Para esto deben ser producidas, preferentemente, por organismos eucariontes los cuales le otorgarán un plegamiento y modificaciones postraduccionales adecuadas (Allnutt *et al.*, 2007).

Últimamente, las levaduras de la especie *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) han ofrecido una plataforma ideal para la expresión de proteínas virales; combinando un alto rendimiento con la mantención de las conformaciones y modificaciones químicas de las proteínas nativas. Adicionalmente, este sistema posee la capacidad de secretar las proteínas producidas al medio de cultivo, lo que facilita en gran medida su posterior purificación (Sevastyanovich *et al.*, 2009).

Por esta razón, en esta memoria, fueron utilizadas las levaduras de la especie *P. pastoris* como células receptoras, para expresar una versión sintética y optimizada del gen *HE* proveniente de un aislado nacional del virus ISA, para luego purificar el antígeno recombinante como proteína de secreción. Con esto se espera obtener antígenos con características inmunogénicas similares a las presentes en el virus nativo, las cuales podrán ser utilizadas tanto en métodos de diagnóstico como de control.

Hipótesis

La expresión del gen *HE* optimizado del virus ISA en levaduras de la especie *P. pastoris*, permitirá producir antígeno recombinante como proteína de secreción, la cual presentará reactividad frente a un anticuerpo específico anti-HE y a sueros de salmones naturalmente infectados.

Objetivo General:

Expresar una versión sintética y optimizada del gen que codifica para el antígeno *HE* del virus ISA proveniente del genotipo viral más comúnmente aislado en Chile (EU), utilizando como célula receptora la levadura *P. pastoris* y posteriormente evaluar la reactividad del antígeno producido como proteína de secreción, frente a un anticuerpo específico anti-HE y a sueros de animales naturalmente infectados.

Objetivos Específicos:

- Subclonar la versión optimizada del gen *HE* del virus ISA genotipo EU, en el vector de expresión pPICZ α , a partir de un clon ya secuenciado, 16SY.
- Transformar la levadura *P. pastoris* con la construcción pPICZ α ::*HE* y optimizar la producción del antígeno *HE* en condiciones nativas, como proteína de secreción.
- Evaluar la inmunorreactividad de la antígeno *HE* a través de Western blot y ELISA indirecto, utilizando un anticuerpo específico anti-HE y sueros de salmones naturalmente infectados por ISA virus.

Materiales y Métodos:

1- Manipulación de ADN

Clonamiento del gen *HE* del virus ISA.

Una versión sintética del gen *HE* cuya secuencia nucleotídica proviene de un aislado nacional del virus ISA (Base de datos GenBank, número de acceso: FJ594332.1), ha sido optimizado para ser traducido en levaduras. Este gen se encuentra clonado en el vector pYES2, bajo la denominación de plasmidio 16SY, el cual está disponible en el laboratorio Biovetec. Sin embargo, la plataforma de expresión escogida para esta memoria, las levaduras de la especie *P. pastoris*, utilizan como vectores de expresión plasmidios específicos que posean características necesarias para ser expresados eficientemente. Es por esta razón que el gen *HE* debió ser subclonado en el plasmidio pPICZ α (anexo 1), dado que posee una serie de propiedades que lo hacen adecuado para ser traducido en esta plataforma de expresión. Entre estas propiedades se encuentran:

- Poseer un factor α , péptido de señal que indica a la célula que la proteína producida debe ser secretada.
- La utilización del promotor del gen AOX1 (alcohol oxidasa). Este promotor es sensible a metanol, el cual es utilizado al mismo tiempo por *P. pastoris* como fuente de carbono, por ende la presencia de metanol en el medio de cultivo se traduce en una alta actividad transcripcional desde el promotor del vector y por lo tanto en una alta expresión de la proteína en estudio.
- Poseer un gen marcador de resistencia a zeocina, lo cual permite una selección de transformación eficiente.

El plasmidio 16SY fue purificado por medio de lisis alcalina utilizando el “kit Axy prep plasmid miniprep” (Axygen Bioscience, Union City, CA, EUA) desde la cepa bacteriana *E. coli* DH5 α , de acuerdo a manual de usuario descrito por el proveedor.

Para subclonar el gen *HE* en el vector pPICZ α (EasySelect™ Pichia Expression Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), se procedió a liberar el gen *HE* desde el plasmidio 16SY, para esto el plasmidio purificado fue digerido utilizando las enzimas de restricción Xba I y

Pst I, bajo los protocolos descritos por los proveedores (New England Biolab, Ipswich, MA, EUA). Posteriormente, los insertos de alrededor 1kb obtenidos en la sección anterior, fueron purificados utilizando el “kit Axy prep DNA gel extraction” (Axygen Bioscience, Union City, CA, EUA) y posteriormente ligados al vector pPICZ α , el cual fue previamente digerido con las enzimas Xba I y Pst I. A continuación se realizó la ligación usando la enzima T4 ligasa (Fermentas, Burlington, ON, Canadá), de acuerdo al protocolo que se describe a continuación. Se adicionó 4 μ L de ADN inserto, junto a 3 μ L de ADN plasmidial completando un volumen final de 10 μ L con agua libre de DNAsa. A esta mezcla se le adicionó 1 μ L de T4 ligasa y se incubó a 16 °C por 24 hrs. Con la ligación ya efectuada, se procedió a transformar la cepa *E. coli* DH5 α ; los clones transformados fueron seleccionados en medio agar-luria zeocina 25 μ g/mL. Posteriormente, para la amplificación de las construcciones generadas, las bacterias fueron cultivadas en caldo luria zeocina 25 μ g/mL a 37°C durante 20 hrs. La identificación de los clones específicos se realizó mediante *screening* utilizando un método rápido de extracción plasmidial (Beuken *et al.*, 2005), el cual consistió en sedimentar 50 mL de cultivo bacteriano de cada clon, para posteriormente lisarlo directamente con 12 μ l de una solución 10% sacarosa 1mM azul de bromofenol. Posteriormente, el lisado se homogenizó con 12 μ l de fenol –cloroformo, y posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 15.000 g, el sobrenadante se sometió a electroforesis en geles de 1% agarosa TAE. A través del análisis de la electroforesis fue posible diferenciar los clones recombinantes de los plasmidios re-ligados, por medio de la comparación de sus movilidades electroforéticas con respecto a un plasmidio control.

Subsiguientemente, como prueba confirmatoria, los clones escogidos fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes para la liberación del inserto de un peso molecular específico (1 kb). La electroforesis se llevó a cabo en gel agarosa TAE al 1% según protocolo de rutina (Maniatis, 1982). Se utilizó como estándar la escala de peso molecular 1 kb “Axygen” (Bioscience, Union City, CA, EUA). La electroforesis se realizó en una cámara horizontal (Bioaxis, Santiago, Chile) a 80 V por 1 hr. Posteriormente, el gel fue teñido sumergiéndolo en una solución de bromuro de etidio por 10 minutos. El ADN se visualizó en un transiluminador UV y se fotografió con la cámara digital “Canon Power Shot A650IS”.

2- Transformación de *P. pastoris* e inducción de síntesis proteica.

Las levaduras de la especie *P. pastoris* fueron transformadas con el clon del vector de expresión que resultó contener el gen *HE* (pPICZ α ::*HE*) usando el método “*LiAc/SS carrier DNA*” (Gietz and Woods, 2006). Las colonias transformadas fueron cultivadas en medio selectivo YPD zeocina (extracto de levadura 10 g/L, peptona bacteriológica 20 g/L, glucosa 20 g/L y zeocina 25 μ g/mL) durante 48 hrs a 30°C. Las colonias recombinantes fueron transferidas a 10 mL del medio de cultivo YPD y cultivadas durante toda la noche a 30°C, hasta una densidad óptica de 0,2 (Densidad óptica: DO, absorbancia a 600nm). Posteriormente, las células fueron cosechadas y, luego de ser lavadas dos veces con tampón PBS ajustado a pH 7,2, fueron inoculadas en 50 mL de medio de inducción (YPD más metanol 20%) y cultivadas a 30°C con agitación constante hasta una DO final de 0,6. Las células fueron inducidas durante 72 hrs y luego cosechadas por centrifugación a 15000 g durante 15 minutos a 4°C. A continuación se midió la concentración proteica del sobrenadante del cultivo.

3- Análisis de Proteínas Recombinantes

3.1 Determinación de la concentración de la proteína total en el sobrenadante de cultivo

Las proteínas recombinantes fueron obtenidas como proteínas de secreción desde el sobrenadante del cultivo tal como se describió anteriormente, el cual se dializó contra PBS y posteriormente se procedió a concentrar por liofilización. La concentración de proteínas obtenidas fue medida mediante la técnica de Bradford, la cual se basa en la unión proporcional de la tinción azul de Coomassie G-250 a la proteína total. Se midió su absorbancia a 595 nm y se extrapoló el resultado con muestras estándares de concentración conocida con correlación lineal. En este caso fue utilizado como estándar concentraciones conocidas de la proteína BSA (*bovine serum albumin*).

3.2 Visualización mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE).

La proteína recombinante resultante de los pasos anteriores fue separada para su visualización por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12% en condiciones denaturantes siguiendo un protocolo de rutina (Maniatis *et al.*, 1982). Dicha electroforesis se realizó en una cámara vertical (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) a temperatura ambiente a 100 V y luego a 120 V una vez pasado el gel concentrador. Se utilizó como estándar de peso molecular “Prestained protein marker broad range” (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). El gel fue teñido con azul de Coomassie por 2 hrs con agitación constante y luego desteñidos con ácido acético al 10%. El gel fue fotografiado en un negatoscopio con una cámara digital “Canon Power Shot A650IS”.

3.3 Análisis Western blot de los sobrenadantes de cultivos utilizando un anticuerpo específico anti-HE

Las proteínas recombinantes HE, fueron sometidas a electroforesis bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. A continuación, fueron transferidas desde el gel a membranas de nitrocelulosa, bajo un protocolo de rutina durante 120 minutos a 350 mA. Una vez finalizada la transferencia se bloquearon los sitios de unión inespecíficos de la membrana con una solución PBT de bloqueo (PBS, Triton 0,05% y leche descremada al 5%) por toda la noche a 4°C. Luego, se incubaron durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo comercial monoclonal (isotipo IgG2B) anti-HE del virus ISA, producido en ratón (ISA Hemagglutinin-Esterease protein. IgG fraction monoclonal antibody, Austral Biologicals Inc., California, EUA). La fracción IgG del anticuerpo monoclonal (clone 8D2/E9), fue obtenida mediante la inmunización de ratones con el fragmento N-terminal purificado de una versión recombinante de la HE del virus ISA. La fracción IgG fue purificada usando proteína G-Sefarosa

Las membranas fueron lavadas 3 veces con PBT durante 5 minutos y posteriormente incubadas por 2 hrs a 37°C con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a inmunoperoxidasa (Jackson Immuno Research Laboratories Inc, West Grove, PA, EUA) en una dilución 1:1000 en solución de bloqueo. Luego se lavó 3 veces durante 5

min con PBT. En forma paralela, 6 mg de 4-cloro-1-naftol (Pierce, Rockford, IL, EUA) fueron diluidas en 10 mL de metanol, se toman 5 mL de esta solución y se le adiciona 45 mL de PBS y 1 mL de H₂O₂ al 3%. En esta solución fue incubada la membrana durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez aparecida la coloración, se lavó con agua destilada dejando secar sobre un papel filtro. Se fotografió con la cámara digital “Canon Power Shot A650IS”.

3.4 ELISA indirecto de sueros de salmones infectados naturalmente.

La proteína recombinante HE producida en levaduras, se diluyó en buffer de activación hasta una concentración final de 100µg/mL. Luego se agregó 100 µL de dilución en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca), la cual fue posteriormente cubierta con *parafilm* e incubada durante 1 hr a 37°C. A continuación fueron bloqueados los sitios inespecíficos adicionando 200 µL de PBS-Leche descremada 2% durante 2 hrs a 25°C. Posteriormente, se lavó una vez con 200 µL de PBS por pocillo. A continuación se realizan diluciones en PBS-Leche descremada 2% de 1/50 y 1/100 de 3 sueros de salmones infectados naturalmente (provistos por Centrovét Ltda.), ajustando a un volumen final de 100 µL por pocillo. Se agregaron como controles negativos tanto una dilución sin suero (PBS-leche descremada 2%), como una dilución 1:100 con el suero de un pez que no ha sido enfrentado al virus. Como control positivo se agregó una dilución 1:100 de un suero de salmón desafiado con el virus ISA (Centrovét Ltda.). Las diluciones se incubaron durante la noche a 4°C, posteriormente se realizaron dos lavados con 200 µL por pocillo de PBS-Tween 0,1% y uno con 200 µL por pocillo de PBS 1X. Luego, se incubaron con 100 µL de dilución 1/1000 de un anticuerpo anti-IgM de salmón producido en ratón (mouse anti-salmon IgM; Jackson Immuno Research Laboratories Inc, West Grove, PA, EUA) en PBS-Leche descremada 2% a 25°C por una hr y seguidamente se realizan dos lavados con 200 µL por pocillo de PBS-Tween 0,1% y uno con 200 µL por pocillo de PBS 1X. A continuación los pocillos fueron incubados con 100 µL de dilución 1/5000 de anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a inmunoperoxidasa en PBS-Leche descremada 2% a 25°C durante una hr, para luego ser lavados dos veces con 200 µL por pocillo de PBS-Tween 0,1% y una vez con 200 µL por pocillo de PBS 1X.

Para el revelado se disolvió TMB en DMSO a una concentración de 1 mg/mL. Se preparó para cada placa 1 mL de esta solución con 9 mL de tampón de revelado y 3 μ L H_2O_2 . El revelado se realizó agregando 100 μ L de solución por pocillo y posteriormente se esperó entre 10 a 20 minutos o hasta observar coloración amarilla. La reacción fue detenida agregando 100 μ L de H_2SO_4 2 M.

Los valores de la DO 450nm fueron medidos usando el equipo “microplate reader” modelo 680 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

3.5. Fuente, obtención y manipulación de los sueros

Para la obtención de los tres sueros de salmones infectados naturalmente con el virus ISA, se utilizaron peces que presentaban signología clínica concordante con la enfermedad y positividad de la sangre a través de RT-PCR para el virus ISA (Centrovét Ltda). El diagnóstico definitivo se realizó mediante el análisis histopatológico de las lesiones. Como control positivo se utilizó el suero de un salmón desafiado con el virus ISA (Centrovét Ltda) y como control negativo se utilizó el suero de un pez sin signología clínica, el cual fue negativo mediante análisis de RT-PCR para ISA virus (Centrovét Ltda).

Los especímenes utilizados tuvieron un peso de 300 g al momento de la toma de muestra. La sangre fue sacada de la vena caudal utilizando una jeringa de 1mL, fue almacenada a 4°C durante 24 hrs y posteriormente centrifugada por 10 minutos a 6000 g. El sobrenadante que contiene las muestras de suero fue recuperado, decantado y almacenado a -20°C hasta su uso.

Tanto la manipulación y mantención de los peces como la toma de muestra y análisis molecular e histopatológico de éstas, fueron realizados por personal de Centrovét Ltda, (Santiago Chile).

4. Análisis de Resultados

Para los ensayos ELISA, los resultados fueron analizados tomando en consideración la DO medida a 450 nm de ambos controles negativos y la del control positivo. La prueba se consideró válida cuando la DO de ambos controles negativos fue menor o igual a 0,2 y la DO del control positivo fue mayor que 0,25. Los datos se analizaron tomando como valor la media aritmética de las mediciones +/- las desviaciones estándar obtenidas desde cada experimento realizado en triplicado.

Los puntos de corte se calcularon como se señala a continuación:

Punto de corte negativo = DO del control negativo \leq 0,2

Punto de corte positivo = DO del control positivo \geq 0,25

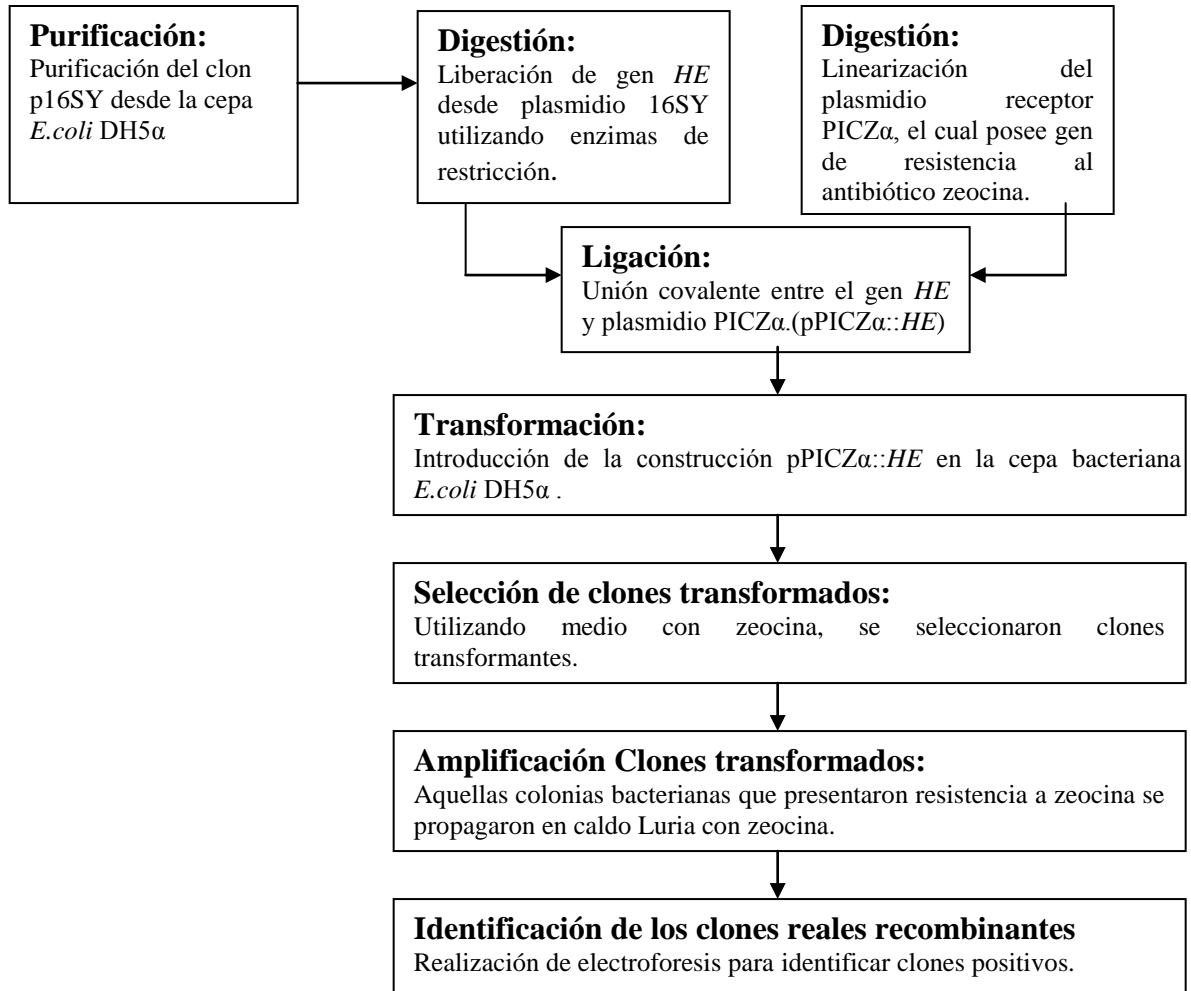
Muestras con DO superiores al punto de corte positivo fueron consideradas con reactividad positiva contra el antígeno HE. Muestras con DO menores que el punto de corte negativo fueron consideradas con reactividad negativa y las muestras con DO entre ambos puntos de corte se consideraron dudosas.

Para el ensayo Western blot, el resultado fue analizado basándose en la presencia (reactividad positiva) o ausencia (reactividad negativa) de precipitación del sustrato cromogénico en la membrana de nitrocelulosa como una banda específica o bandeo múltiple.

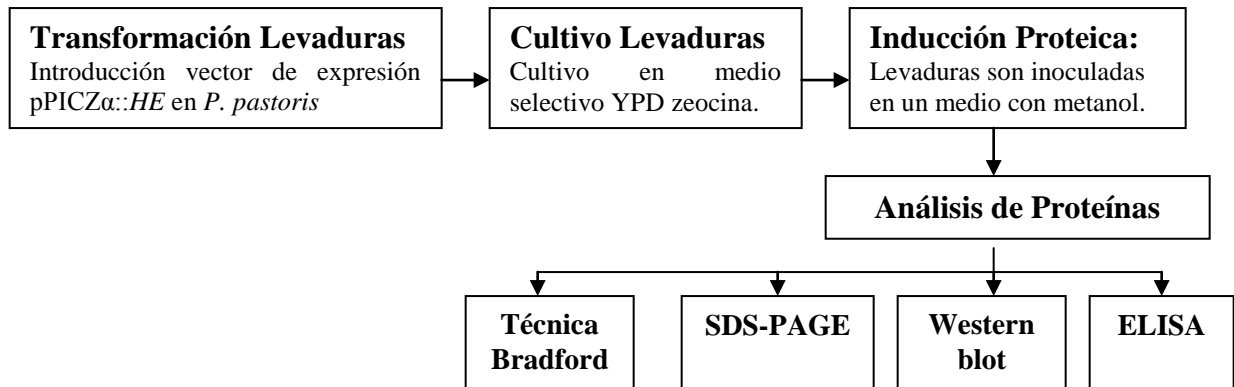
Esquema Resumen de Procedimientos

1-Manipulación ADN

Clonamiento del gen *HE* del virus ISA



2-Transformación *P. pastoris* e inducción de síntesis proteica



La secuencia nucleotídica del gen *HE* del genotipo viral de virus ISA aislado con mayor frecuencia en Chile, fue “codón optimizada” para ser expresada en levaduras de la especie *P. pastoris*.

Original	1	ATGCGCTTCCGAGCATTTTTACCGCGGTGCTGTTTGC GGCGAGCAGCGCGCTGGCGCGC
Optimizada	1	ATGAGATTTCCATCTATTTTTACTGCTGTTTTGTTTCTGCTTCTTCTGCTTTGGCTAGA
Original	61	CTATGTCTTAGAACTACCTGACACCACCTGGTTAGGTGACTCTCGAAGCGATCAGTCC
Optimizada	61	TTGTTTGGAGAAATATCCAGATACTACTTGGTTGGGTGACTCCAGATCAGATCAATCA
Original	121	AGAGTGAATCCACAGTCTTTGGATCTGGTACTGAGTTC AAGGGGTGCTGCAGGCCAAA
Optimizada	121	AGAGTTAATCCACAATCTTTGGATTTGGTTACTGAGTTC AAGGGTGTTTGCAAGCTAAA
Original	181	AACGGAAATGGACTTTTGAAGCAGATGAGTGAAGGTTTCCAAGTACTGGTACACACCT
Optimizada	181	AATGGTAATGGTTGTTGAAACAAATGCTCGGTAGATTCCCATCTGATTTGGTACTCCA
Original	241	ACTACAAAGTACCGGATCTGTACTTGGGAACCAATGACTGCAC TACGGACCTACTGAC
Optimizada	241	ACTACTAAGTACAGAAATTTGTATTTGGTACTAACGATGTACTGATGGTCCAACTGAT
Original	301	ATGATCATCCCAACTTCGATGACACTGGACGACGCGCAAGGGAGCTGTACCTGGGAGCA
Optimizada	301	ATGATTATTCCAACTTCTATGACTTTGGATAATGCTGCTAGAGAATTTGATTTGGGTGCT
Original	361	TGCAGGGGAGACGTGAGAGTGACGCCTACATTTGTGGGAGCAGCAATTTGTTGGACTTTGTT
Optimizada	361	TGTAGAGGTGACGTTAGAGTTACTCCAACCTTTTGTGGTCTGCTATTGTTGGTTGGTT
Original	421	GGACGAACGACGCAATTACCGGTTTTTCGGTGAAGGTGTTGACTTTCAACAGCTCTACA
Optimizada	421	GGTAGAAGTACTGATGCTATCACTGGTTTTCTGTTAAGGTTTGTACTTTAATTCCTCAACT
Original	481	ATTGTGGTGGTGGGCTGAACGGCATGAGCGGCATTTATAAAGTGTGCATTGCGGGCACC
Optimizada	481	ATCGTTGTTGTTGGTTTGAATGGCATGCTCGGTACTACAAAGTTGTATTGCTGCTACT
Original	541	TCTGGGAATGTGGGAGAGTGACACTTATCAACGGATGCGGATATCTCAACACACCTTTG
Optimizada	541	TCTGGTAATGTTGGTGGTGTACTTTGATTAATGGTTGTGGTTACTTCAACACTCCATTG
Original	601	AGGTTTGACAATTTCCAAGGACAAATCTACGTGTCAGACACCTTTGAAGTGAGGGGAACC
Optimizada	601	AGATTCGATAACTTCCAAGGTCAAATCTACGTTTCTGATACTTTGCAAGTTAGAGGTACT
Original	661	AAAAACAAGTGTGTTCTGCTAAGATCTTCTAGTGATACGCCTTTGTGTTACACATCATG
Optimizada	661	AGAAACAATGTTGTTTGGTTGAGATCCTCAAGTGATACTCCATTGTTGTTCTCATATCATG
Original	721	AGGAACGTTGAGTTAGATGAGTATGTAGACACACCAAATACAGGGGGTGTTTATCCTTCT
Optimizada	721	AGAAACGTTGAATGGATGAATACGTTGATACTCCAACACTGGTGGTGGTTTATCCATCT
Original	781	GATGGTTTTGATTCACTACATGGTTCAGCTTCCGTTAGAACGTTCCCTCACTGATGCATTG
Optimizada	781	GATGGTTTTGATCTTTGTCATGGTCTGCTTCTGTTAGAACTTTCTTGACTGATGCTTTG
Original	841	ACATGCCAGACATTGACTGGAGTAGAATTGATGCTGCTTCGTGTGAATATGACAGCTGC
Optimizada	841	ACTTGTCCAGATATTGATTGGTCAAGAATTGATGCTGCTTCTTGTGAATACGATTCTTGT
Original	901	CCTAAGATGGTTAAGATTTTGACCAGACAAGCTTAGGTAACACAGACACACTTATCATG
Optimizada	901	CCAAGATGGTTAAGGATTTGATCAAACCTTTTGGGTAACACTGATACTTTGATCATG
Original	961	AGGGAGGTAGCATTGCACAAAGGAGATGATCAGTAAACTTCAGAGGAACATCACAGATGTA
Optimizada	961	AGAGAAGTTGCTTTGCATAAAGAAATGATTTCTAAATGCAAGAAATATTACTGATGTT
Original	1021	AAAACATCTGTGTTGAGCAACATCTTCATTTCTTAA
Optimizada	1021	AAAACCTCTGTTTTGTCTAATATTTCATCTCTTAA

Fig. 1 Alineamiento del gen *HE* original del virus ISA genotipo EU y la versión sintética “codón optimizado” para levaduras. Los codones modificados están indicados con color rojo. El gen *HE* se encuentra clonado dentro del plasmidio pYES2, el cual ha sido denominado como p16SY

Resultados

1- Manipulación de ADN

Clonamiento del gen *HE* del virus ISA.

Dado que el plasmidio 16SY contiene clonado el gen *HE* optimizado del virus ISA, éste debió ser amplificado y purificado desde la cepa bacteriana *E. coli* DH5 α . En forma paralela se realizó la amplificación y purificación del plasmidio receptor pPICZ α tanto en sus versiones A como B, desde la misma cepa. La purificación de ambas moléculas se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa TAE 1%, la cual reveló bandas de distintos tamaños, correspondientes a diferentes grados de enrollamiento plasmidial o topoisómeros. (Fig.2).

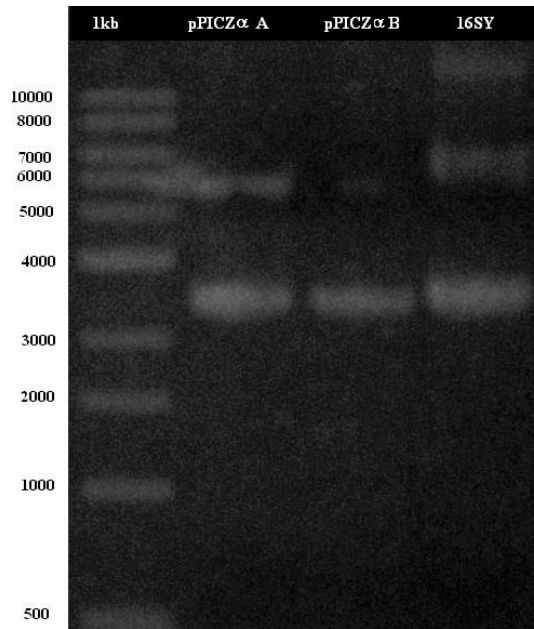


Fig.2 Purificación y análisis mediante electroforesis en gel agarosa-TAE de los plasmidios PICZ α A, PICZ α B y 16SY. Se visualizan bandas de diferente tamaño para cada una de las muestras, correspondientes a distintos grados de enrollamiento plasmidial.

Posteriormente, se procedió a la digestión del plasmidio 16SY con las enzimas de restricción Xba I y Pst I para generar la liberación del gen *HE* con extremos cohesivos. Con la finalidad de obtener el plasmidio en estado lineal con extremos compatibles al gen

liberado, el vector pPICZ α en su versión A fue digerido con las enzimas Xba I y Pst I en forma paralela. Las enzimas fueron seleccionadas según su sitio de múltiple clonamiento de ambos plasmidios de acuerdo a los proveedores (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Los resultados de la digestión fueron analizados por medio de electroforesis en geles de agarosa. En el segundo y tercer carril de la figura 3, se observa la digestión del plasmidio 16SY, exhibiendo una banda en los 6000 pb, concordante con la longitud de pYES2 linearizado y otra de 1000 pb coincidente el gen *HE*. En paralelo se analizó la digestión del plasmidio pPICZ α en su versión A, donde se observa una banda entre los 3000 y los 4000 pb, concordante con la longitud teórica de 3600 pb del plasmidio. (Fig.3). En forma simultanea se realizó la digestión del plasmidio pPICZ α , en su versión B, con las enzimas EcoR I y Xba I de modo de tener una estrategia de clonamiento alternativa del gen *HE* (Dato no mostrado).

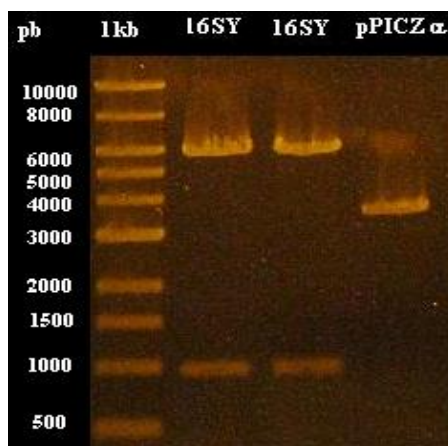


Fig. 3 Análisis mediante electroforesis de la digestión del plasmidio 16SY y del plasmidio PICZ α En el segundo y tercer carril se observa el resultado de la digestión del plasmidio p16SY, realizada con las endonucleasas de restricción Xba I y Pst I. Las bandas observadas se encuentran a nivel de los 6000 pb, longitud equivalente al vector pYES2 y otra banda de aproximadamente 1000 pb, concordante con la longitud del gen *HE*. En el tercer carril se observa el resultado de la digestión del plasmidio PICZ α en su versión A, en la cual se aprecia una banda entre los 3000 y 4000 pb, longitud concordante con el peso molecular teórico de dicho plasmidio. En la primera columna se observa como estándar, la escala de peso molecular 1kb “New England” (Biolab, Ipswich, MA, EUA).

A continuación, se purificó desde el gel la banda correspondiente al gen *HE* liberado, y se ligó con el plasmidio pPICZ α digerido, utilizando la enzima T4 ligasa. Una vez obtenido el producto de la ligación, se procedió a transformar con éste la cepa bacteriana *E. coli DH5 α* . Este mismo procedimiento se llevo a cabo para la versión B del plasmidio pPICZ α , con la salvedad que se utilizaron las enzimas EcoR I y Xba I para liberar el fragmento y dejar el vector en forma lineal.

Las colonias transformadas fueron seleccionadas en medio agar luria-zeocina dado que el plasmidio pPICZ α contiene un gen de resistencia a este antibiótico. Este procedimiento hizo posible seleccionar las colonias bacterianas que efectivamente fueron transformadas por este plasmidio.

Los clones que efectivamente ligaron el gen *HE* en forma específica fueron diferenciados de los clones no recombinantes, mediante su movilidad electroforética en geles de agarosa. En esta etapa de búsqueda o *screening*, se observaron distintos clones tanto para la versiones A como B del vector pPICZ α (Fig.4). Los probables clones positivos, es decir, que contendrían el gen *HE*, se encuentran demarcados con amarillo y presentaron una movilidad electroforética menor a la del plasmidio pPICZ α , utilizado como control negativo (Fig. 4).

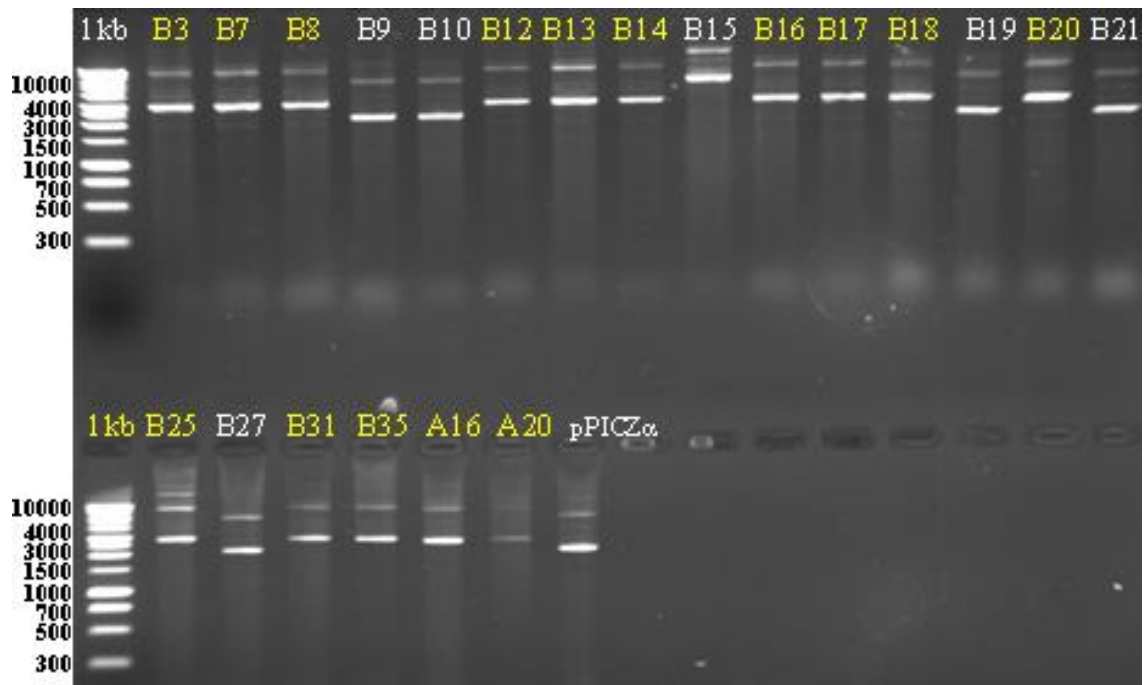


Fig. 4 Búsqueda o *screening* mediante electroforesis de las distintas colonias bacterianas transformadas con el fin de seleccionar los clones recombinantes positivos. . Las muestras rotuladas con amarillo son probablemente positivas y muestran una banda de alrededor de 1000 pb más que pPICZ α , plasmidio utilizado como control negativo. La letra mayúscula indica si es PICZ α A o B y el número indica la colonia bacteriana. En la primera columna se observa la escala de estándar de peso molecular 1kb “Axygen” (Bioscience, Union City, CA, EUA).

Posteriormente, con el propósito de corroborar los resultados de la electroforesis realizada para seleccionar los clones (Fig. 4), se digirió una muestra, aparentemente, positiva proveniente de la versión A del vector y de la versión B, en forma paralela junto a una muestra, aparentemente, negativa con las mismas enzimas de restricción utilizadas en sus respectivos clonamientos. Como resultado (Fig. 5), en las muestras A16 y B3 se puede observar la liberación de una banda de una longitud de alrededor 1000 pb consistente con la longitud del gen *HE*, lo cual no se observa en la muestra negativa (B9).

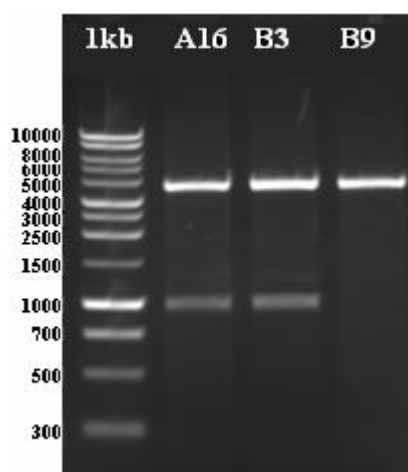


Fig. 5 Análisis mediante electroforesis de dos muestras positivas y una muestra negativa en la selección de clones. Las muestras son digeridas para corroborar la presencia del gen *HE* en el plasmidio PICZ α . En la columna donde se encuentran las muestras aparentemente positivas A16 y B3, de las versiones A y B del vector respectivamente, se observa una banda de alrededor de los 1000 pb, lo cual no se visualiza en la muestra negativa, situación que ratifica los resultados del análisis de clones (Fig. 4). En la primera columna se observa la escala estándar de peso estándar 1kb “Axygen” (Bioscience, Union City, CA, EUA).

Posteriormente, los clones A16 y B3 fueron escogidos para realizar la transformación de la cepa X-33 de las levaduras de la especie *P. pastoris*.

2- Transformación de *P. pastoris* e inducción de síntesis proteica.

La cepa X-33 de levaduras de la especie *P. pastoris*, fue transformada exitosamente con los vectores de expresión que contienen el gen *HE*, provenientes de los clones A16 y B3; obteniéndose un gran número de colonias de levaduras para cada clon (Fig.6).

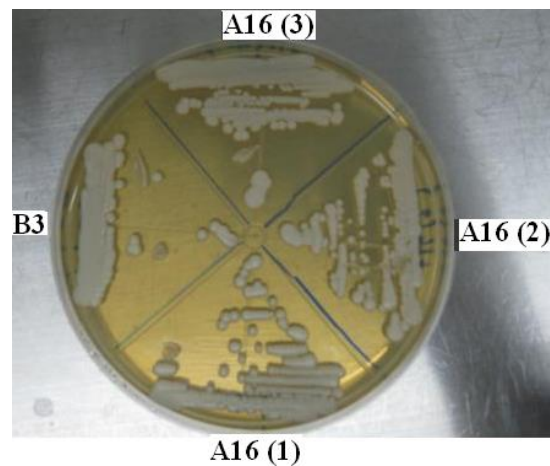


Fig. 6 Foto de las colonias de las levaduras transformadas con los clones A16 y B3. Se observan 3 aislamientos de colonias para la cepa de levadura X-33 transformada con el clon A16 y un aislamiento de colonias producto de la transformación de la misma cepa con el clon B3.

De la misma manera, la cepa GS115/Albúmina de levaduras de la especie *P. pastoris* fue aislada, ya que contiene clonado el gen que codifica para un fragmento de la proteína albúmina de bovino (BSA) bajo un vector de expresión. Existen antecedentes que esta cepa posee la capacidad de secretar altos niveles de BSA al medio, por lo que fue utilizada como control positivo de secreción (Fig. 7).

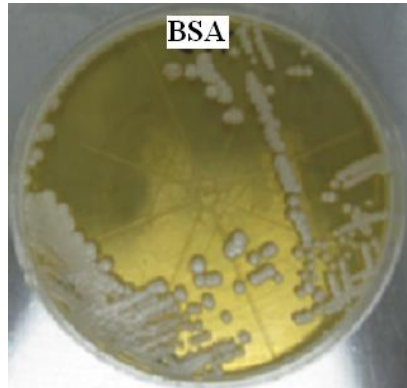


Fig. 7 Foto de un aislamiento de colonias de las levaduras de la cepa GS115/Albúmina. Esta cepa ha sido transformada con el vector de expresión en el cual se encuentra clonado un fragmento del gen de la albúmina bovina (BSA). Esta cepa fue utilizada como control positivo de secreción, por su propiedad de secretar la albúmina al medio de cultivo.

La información contenida en los genes del plasmidio pPICZ α fue introducida en el genoma de la levadura por medio de recombinación homóloga, esto fue posible puesto que tanto el plasmidio como el genoma de la levadura poseen el extremo 5' del gen AOX (alcohol oxidasa), sitio entre los cuales ocurrió la recombinación (Fig. 8).

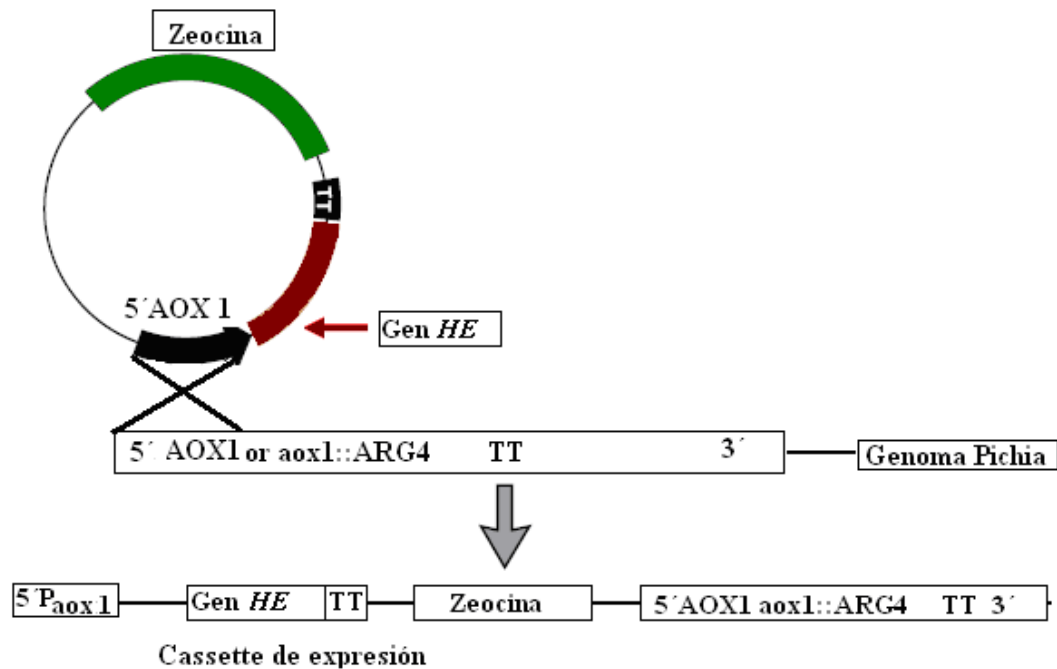


Fig. 8 Esquema de recombinación entre genoma de plasmidio pPICZ α y genoma de la levadura de la especie *P. pastoris*. La inserción del plasmidio en el genoma de la levadura se produce por recombinación homóloga entre los extremos 5' del gen AOX.

3- Análisis de Proteínas Recombinantes

3.1 Determinación de la concentración de la proteína total en el sobrenadante de cultivo

Como resultado de la transformación de la cepa de levadura *P. pastoris* X-33 con la construcción pPICZ α ::HE se obtuvo un producto de secreción con una expresión máxima a las 48 hrs de inducción, y un rendimiento de 10,4 gramos de proteína por litro de cultivo (gr/L). En paralelo fue inducida la cepa GS115/Albúmina con la construcción pPICZ α ::BSA, generando 50,6 gr/L.

3.2 Análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS-PAGE

Se realizó un análisis SDS-PAGE de los sobrenadantes de cultivos de las cepas de levaduras transformadas con los clones A16, B3 y BSA tras 24 y 72 hrs de inducción. Como resultado se observa que a la hora 24 de inducción existe escaso o nulo producto proteico secretado al medio de cultivo, en los tres clones analizados. Sin embargo, a las 72 hrs de inducción, el sobrenadante de la cepa GS115/Albúmina presenta una banda de aproximadamente 33 kDa de gran intensidad, mientras que el sobrenadante de la cepa transformada con el clon A16 exhibe una banda de aproximadamente 35 kDa de menor intensidad; pero que es consistente con el peso molecular esperado para la proteína HE del virus ISA. Por otra parte, en el sobrenadante de la cepa de levadura transformada con el clon B3 no se observa producto de secreción (Fig.9).

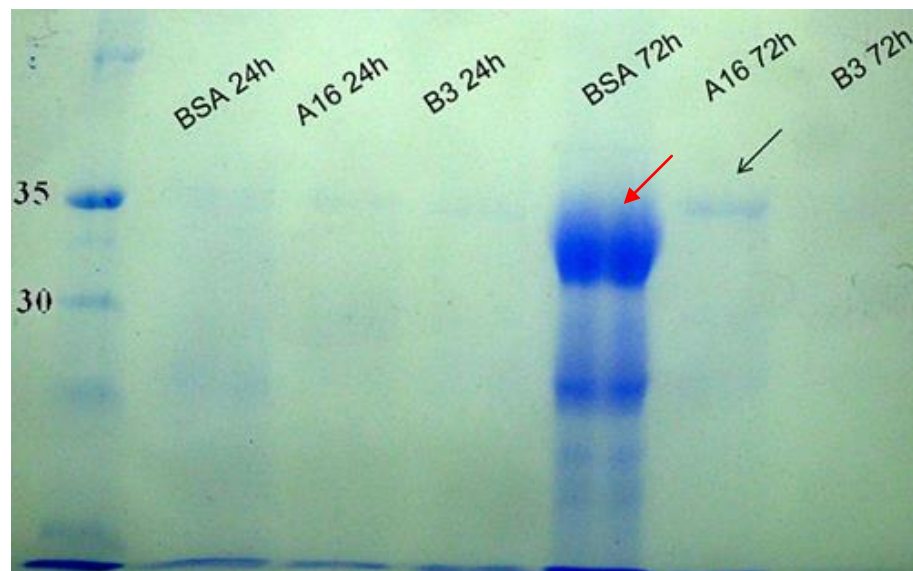


Fig. 9 Análisis SDS-PAGE de las proteínas secretadas al medio de cultivo tras 24 y 72 hrs de inducción. En la figura se aprecian los productos de secreción de las colonias de levaduras transformadas con los clones BSA, A16 y B3 respectivamente, a las 24 y 72 hrs de inducción. La flecha negra indica un producto de aproximadamente 35 kDa a las 72 hrs de inducción en el sobrenadante del clon A16. La flecha roja muestra el producto de secreción obtenido por la cepa GS115/Albúmina, utilizada como control positivo de secreción. En la columna donde se encuentra el clon B3 no se exhibe ningún producto de secreción.

Dado que el clon A16 reveló resultados consistentes con el peso molecular esperado para la proteína HE del virus ISA, se realizó un análisis SDS-PAGE del sobrenadante de cultivo a las 0, 24, 48 y 72 hrs de inducción con el fin de caracterizar su cinética de secreción. Se observa que la secreción del clon A16 alcanza un máximo a las 48 hrs, situación que se evidencia a través de una banda de mayor intensidad que a las 24 y 72 hrs. La banda se presenta a nivel de los 35 kDa de peso molecular, consistente con el peso de la proteína HE. Se incorporó, además, el sobrenadante del clon GS115/Albúmina a las 72 hrs de inducción, a modo de control positivo de secreción, en la cual se evidencia una banda de gran intensidad con un peso molecular de aproximadamente 28 kDa (Fig.10).

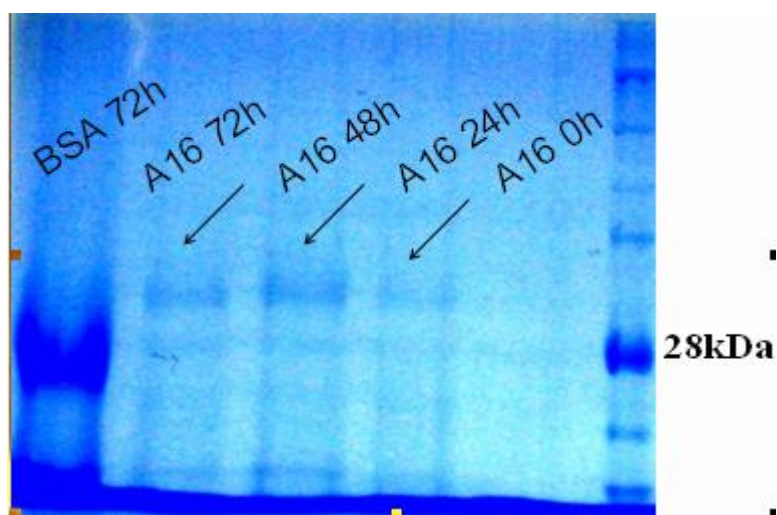


Fig. 10 Análisis SDS-PAGE de la cinética de secreción de la cepa X-33/pPICZ α ::HE clon A16 En la figura se observa el producto de secreción a las 0, 24, 48 y 72 hrs de inducción de las levaduras transformadas con el vector de expresión pPICZ α ::HE denominado clon A16. A modo de control positivo de secreción se incluye el producto de secreción de la cepa GS115/Albúmina a las 72 hrs de inducción. Se observa que el máximo nivel de expresión se alcanza a las 48 hrs, situación evidenciada por la mayor intensidad de la banda en relación a las 24 y 72 hrs.

3.3 Análisis Western blot de los sobrenadantes de cultivos utilizando un anticuerpo específico anti-HE

Posteriormente, con el fin de determinar la inmunorreactividad de la proteína presente en el sobrenadante del cultivo de la cepa X-33/pPICZ α ::HE clon A16, se procedió a realizar un ensayo Western blot utilizando un anticuerpo comercial anti-HE del virus ISA (ISA Hemagglutinin-Esterease protein. IgG fraction monoclonal antibody, Austral Biologicals Inc., California, EUA). Para esto se prepararon 2 geles de poliacrilamida SDS-PAGE con el fin de realizar dos electroforesis simultáneamente. Cada gel fue cargado con los sobrenadantes precipitados de los cultivos de las cepas X-33/pPICZ α ::HE, clones A16 y B3, a las 72 hrs de inducción, además a modo de control negativo, se incorporó el sobrenadante de cultivo de la cepa GS115/Albúmina a las 72 hrs de inducción. El primer gel se tiñó directamente con azul de Coomassie, mientras que el segundo gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa para realizar el inmunoensayo (Fig. 11).

El anticuerpo comercial anti-HE reaccionó en forma manifiesta sólo en la columna donde se cargaron las proteínas secretadas por el clon A16. De este resultado se puede concluir que, la reacción es específica para la proteína secretada por el clon A16, puesto que en la columna donde se encuentra el clon GS115/Albúmina no existe ningún tipo de reacción. Además, dado que el clon B3 no originó reacción ni tampoco producto de secreción, no existe reacción al ser enfrentado a los anticuerpos. De este análisis se concluyó que el clon A16, secreta al medio de cultivo el antígeno HE del virus ISA (Fig. 11)

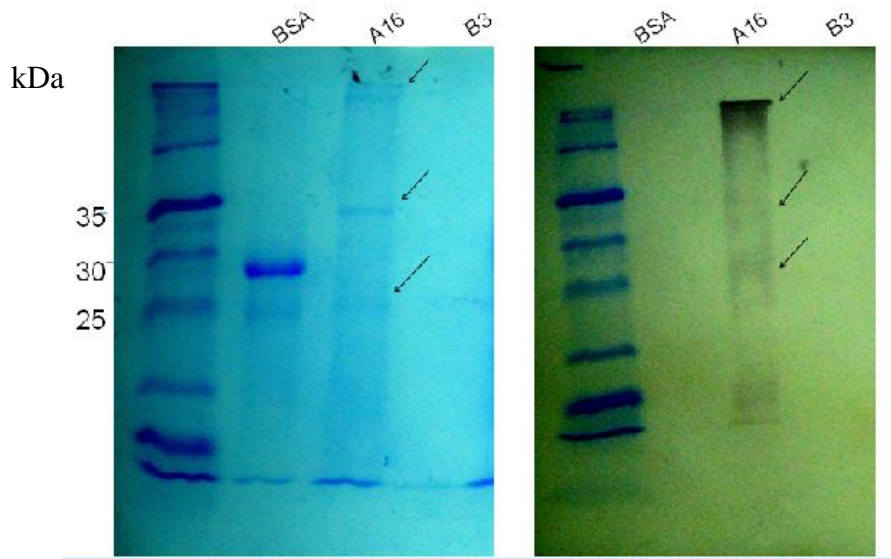


Fig. 11 Análisis SDS-PAGE (izquierda) y análisis Western blot (derecha) de sobrenadantes de cultivos de *P. pastoris*. Para realizar el ensayo Western blot, el gel SDS-PAGE fue transferido a una membrana de nitrocelulosa y posteriormente enfrentado a un anticuerpo comercial anti-HE para ser finalmente detectados mediante un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a inmunoperoxidasa. Se observa una reacción específica en el carril donde se encuentra la proteína HE producida por el clon A16, no así donde se encuentra el control negativo ni en el carril donde se encuentra B3.

3.4 ELISA indirecto con suero de salmones del Atlántico infectados naturalmente

La prueba de ELISA se realizó con sueros de 3 salmones infectados en forma natural con el virus ISA (Fig. 12). Se muestra como control negativo el suero de un pez que no ha sido enfrentado al virus y por lo tanto no posee anticuerpos anti-ISA, el cual mostró equivalencia con la reacción sin anticuerpo primario (dato no mostrado). La absorbancia leída a 450 nm del control negativo arrojó un valor menor a 0,2. Como control positivo se utilizó un suero de un salmón desafiado con el virus ISA. La DO del control positivo muestra un resultado mayor a 0, 25.

En el análisis de ELISA con el suero del primer y segundo pez se observa que ambas diluciones tienen una DO mayor a 0,25 por lo tanto son consideradas como positivas. En el caso del tercer pez ambas diluciones tienen una DO mayor que el control negativo, pero, menor que el control positivo, razón por la cual se considera muestra dudosa.

Siempre se observó consistencia entre las diluciones utilizadas y el título observado, puesto que la dilución menor (1:50) posee valores mayores de DO para los tres sueros y la dilución mayor (1:100) arroja valores menores de DO para los tres sueros, por lo que asumimos que la reacción antígeno-anticuerpo es específica.

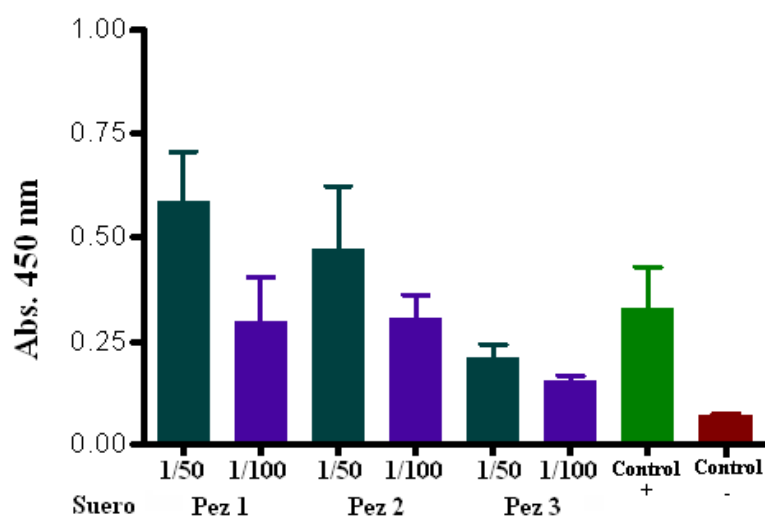


Fig. 12 Gráfico que representa el resultado de la prueba ELISA realizada con el suero de 3 salmones infectados naturalmente. Los datos corresponden al promedio +/- las desviaciones estándar de las absorbancias medidas a 450nm obtenidas desde un experimento representativo realizado en triplicado. Resultados similares fueron obtenidos desde dos experimentos adicionales.

Discusión

Elección de levadura de la especie P. pastoris

Para la producción de antígenos virales con fines biotecnológicos, es fundamental que las proteínas recombinantes resultantes posean características conformacionales similares a las del virus de campo. La expresión de antígenos virales en levaduras es una técnica frecuentemente utilizada para este propósito (Allnutt *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2005).

En esta memoria, las levaduras de la especie *P. pastoris* fueron utilizadas puesto que poseen grandes ventajas en relación a otras plataformas de expresión proteica (Cregg *et al.*, 1993). Por ser organismos eucariontes, son capaces de procesar las proteínas expresadas, obtener un correcto plegamiento y otorgarle modificaciones postraduccionales; logrando potencialmente, de esta manera, una mayor semejanza a las proteínas que conforman el virus en forma natural. Se describe además, que pueden ser manipuladas con mayor facilidad que otras plataformas similares, tales como *Saccharomyces cerevisiae*. Su cultivo posee también un menor costo asociado en relación a otros organismos eucariontes y habitualmente generan niveles superiores de expresión proteica (Allnutt *et al.*, 2007; Daly y Hearn, 2005). Otra característica de relevancia es el eficiente reconocimiento, por parte del sistema de transporte intracelular, de la señal de secreción α presente en el vector pPICZ α , en comparación con otras señales de secreción. De esta manera, esta plataforma permite que la proteína expresada pueda ser secretada directamente al medio de cultivo, facilitando en gran medida su posterior purificación (Sevastyanovich *et al.*, 2009). Todas estas características hacen de *P. pastoris* una atractiva plataforma de expresión de proteínas virales (Cereghino y Cregg, 2000).

Utilización de un gen optimizado

Dado que cada aminoácido puede ser codificado por diferentes codones, los distintos organismos han desarrollado preferencias en el uso de determinado codón, frente a otro que codifique para el mismo aminoácido, a esto se le llama “usaje de codones”. Esta situación se ve reflejada en una mayor eficiencia en la producción proteica (Bahir *et al.*, 2009). En esta memoria se utilizó el gen que codifica para la proteína HE del genotipo viral aislado con mayor frecuencia en Chile. Con el propósito de lograr mejores resultados, la secuencia genética del gen *HE* fue optimizada para ser expresada por las levaduras. El marco de lectura abierto del gen *HE* del virus ISA genotipo EU, fue sintetizado artificialmente de acuerdo a un usaje de codones optimizado. Para esto, la secuencia nucleotídica original que codifica para la proteína HE del virus se obtuvo de la base de datos GenBank (Número de acceso FJ594332.1) (Godoy *et al.*, 2008), la cual fue retro-traducida hacia una nueva secuencia nucleotídica, utilizando los codones de preferencia de las levaduras (Bucarey *et al.*, 2009).

Clonamiento y expresión del gen HE optimizado.

Fue posible clonar el gen optimizado del antígeno *HE* en los vectores pPICZ α A y pPICZ α B, a partir del plasmidio denominado 16SY el cual, ya poseía el gen clonado y secuenciado. Con el fin de seleccionar los clones derivados de los plasmidios pPICZ α A y pPICZ α B, que efectivamente poseían el inserto, se realizó un análisis utilizando un método rápido de extracción plasmidial (Beuken *et al.*, 2005), el cual consiste en lisar el clon bacteriano directamente con sacarosa-fenol –cloroformo y someter la mezcla digestión a electroforesis en geles de agarosa. A través del análisis de la electroforesis (Fig. 4) se observó que los dos clones analizados derivados del plasmidio pPICZ α A y 13 de los 19 clones analizados derivados del plasmidio pPICZ α B eran aparentemente positivos, es decir habían incorporado el gen *HE* optimizado, situación evidenciada por una movilidad electroforética distinta al plasmidio pPICZ α vacío, utilizado como control negativo. Posteriormente, como prueba confirmatoria, fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes, el clon A16 y el clon B3, los cuales representaban a las versiones A y B respectivamente de los plasmidios de expresión utilizados (Fig. 5). Como resultado ambos clones liberaron un fragmento específico, consistente con el tamaño esperado del gen *HE*.

Posteriormente, se realizó una transformación de la cepa X-33 de *P. pastoris* tanto con el clon A16 como con el clon B3. Esta transformación fue exitosa, obteniéndose un importante número de colonias para cada clon.

Posterior a la transformación, la expresión del gen desde el plasmidio, se realizó como una proteína de fusión entre el marco de lectura abierto del gen *HE* y la secuencia α de secreción de *P. pastoris*, lo cual permitiría potencialmente, tanto destinar como purificar de forma eficiente la proteína recombinante desde el medio de cultivo.

El análisis SDS-PAGE de los sobrenadantes inducidos mostró una proteína de 35 kDa, consistente con el tamaño esperado del antígeno *HE* del virus ISA, la cual alcanzó un máximo de expresión a las 48 hrs de inducción (Fig. 10). Este resultado fue observado únicamente con la cepa transformada con el plasmidio pPICZ α en su versión A (clon A16), no así en la cepa generada con la versión B de dicho vector (clon B3). Los distintos resultados de secreción obtenidos con los plasmidios pPICZ α en sus versiones A o B podrían ser explicados por qué la construcción genética, realizada en esta memoria, logró un correcto marco de lectura abierto, en fase, con la señal de secreción α , sólo en plasmidio pPICZ α A, no así en el pPICZ α B. Esta situación pudo haberse debido a una reacción de digestión errónea por parte de las endonucleasas de restricción utilizadas en el caso del clonamiento con el plasmidio B, Xba I y EcoR I, pese a que “*in silico*” estas enzimas logran una correcta ligación y posterior lectura del gen *HE* desde el plasmidio B, esta situación pudo no haberse producido en forma experimental. A modo de control positivo de secreción, se realizó en paralelo, la inducción de la cepa de *P. pastoris* GS115/Albúmina, la cual ha sido transformada con el gen que codifica para un fragmento de la proteína BSA. Dentro de las propiedades de esta cepa, ese encuentra la de secretar altos niveles de BSA al medio de cultivo

El análisis Western blot, consistente con el resultado anterior, reveló que al enfrentar un anticuerpo comercial anti-HE del virus ISA, con los sobrenadantes resueltos en geles de acrilamida de los cultivos de los clones A16 y B3, se obtenía una reacción positiva sólo con el clon A16. Este resultado confirma lo observado en análisis SDS-PAGE y ratifica que las proteínas recombinantes secretadas por el clon A16 son reconocidas en forma específica por el anticuerpo comercial. Esta reacción fue considerada específica, puesto que no se manifiesta al enfrentar el anticuerpo con el producto de secreción del clon GS115/Albúmina, utilizado esta vez como control negativo. Este clon fue utilizado como control negativo de inmunorreacción en el ensayo Western blot, debido a que secreta altos niveles de una proteína inespecífica (BSA) y posee el mismo fondo genético que la cepas analizadas, por lo tanto, si los productos de secreción estudiados son específicos y son derivación de la manipulación genética realizada, los anticuerpos utilizados para el inmunoensayo deberían reaccionar diferencialmente frente a las proteínas secretadas por ambas cepas.

Si bien el sobrenadante resuelto de la cepa A16 produjo una inmunomarcación, ésta no se reveló como una banda simple de 35kDa, sino como un bandeo múltiple. Este resultado se podría explicar, ya que, la resolución alcanzada de esta proteína por medio de SDS-PAGE fue deficiente, producto probablemente de poseer una estructura terciaria o cuaternaria compleja, dada por una serie de residuos de cisteína a lo largo de su secuencia primaria (anexo 2). Puesto que los residuos de cisteína poseen en su estructura un grupo funcional “tiol” que tiene la propiedad de formar enlaces disulfuro, incrementando su rigidez y confiriéndoles gran resistencia a la denaturación. Con el fin de lograr una resolución óptima de la proteína, se podría en el futuro, realizar la denaturación proteica con mayor concentración de β -mercaptoetanol, agente reductor de puentes disulfuros, y así generar una disminución de la complejidad molecular (Laemmli, 1970).

En segundo lugar, lo que probablemente no permitió conseguir una óptima resolución de la proteína por medio de SDS-PAGE, fue que la proteína al ser producida por un organismo eucarionte, puede poseer modificaciones post-traduccionales alternativas. Frente a esta hipótesis, se realizó un análisis bioinformático de su secuencia primaria, la cual reveló la presencia de dos potenciales sitios de glicosilación (anexo 3) y veinticuatro potenciales sitios de fosforilación (anexo 4). Lo que sugiere que posee gran cantidad de sitios potenciales a sufrir cambios post-traduccionales, los cuales le otorgarían movilidades electroforéticas diferenciales. Este resultado es novedoso, ya que, si bien la expresión de proteínas con actividad hemaglutinina (HA) ha sido probada en levaduras (Wang *et al.*, 2007), esta memoria plantea por primera vez la expresión de una proteína con actividad hemaglutinina-esterasa en este tipo de organismos.

Por otra parte, la prueba de ELISA se realizó utilizando suero de tres salmones infectados con el virus en forma natural. Dos de los tres sueros revelaron un resultado positivo puesto que su DO fue mayor a 0,25 para ambas diluciones. El tercer suero reveló un resultado dudoso, puesto que su DO no supera los 0,25, situación que puede ser explicada por numerosas razones, una de ellas es un bajo título de anticuerpos anti- ISA producido por mal manejo del suero o bien por causa de alteraciones en el sistema inmune del pez. Siempre se observó consistencia entre las diluciones utilizadas y el título observado para los tres sueros, por lo que asumimos que la reacción antígeno-anticuerpo fue específica. Por motivos de disponibilidad de muestras, solamente se realizó el análisis del suero de tres peces, sin embargo, mayor número de sueros se analizaron con posterioridad a la realización de esta memoria de título.

El resultado positivo obtenido tanto por el análisis Western blot como por la prueba de ELISA realizada con las proteínas secretadas por la cepa generada, muestran que las proteínas recombinantes producidas en esta memoria a partir de un gen optimizado sintetizado químicamente, son reconocidas por los anticuerpos que han sido generados tanto en forma artificial en ratón, como en forma natural en salmón enfrentado al virus de campo. Consecuentemente se puede inferir que, las proteínas originadas en esta memoria, poseen una secuencia primaria y una conformación similar a las del virus de campo, siendo ésta la razón por la que ambos anticuerpos son capaces de reconocerlas.

Utilización de la proteína HE en métodos de prevención y diagnóstico.

En todo sistema de cultivo, especialmente en los sistemas de cultivo intensivos, las enfermedades infecciosas representan una seria amenaza que requiere la toma de medidas serias y eficaces. En esta memoria se propone que la expresión y purificación en la levadura *P. pastoris* de la proteína HE, proveniente del genotipo viral aislado con mayor frecuencia en Chile, puede ser utilizada tanto en estudios serológicos de prevalencia en peces sanos como en el diagnóstico de animales que estén cursando con una sintomatología concordante con la enfermedad. Además, puede ser utilizada en el futuro desarrollo de una vacuna, la cual sería capaz de generar inmunidad frente al virus que afecta a los salmones nuestro país, ayudando así a prevenir o bien atenuar los efectos que la enfermedad produce en las plantas de producción, disminuyendo de esta forma las grandes pérdidas ocasionadas por el virus de la anemia infecciosa del salmón.

En la presente memoria, se exhiben los resultados obtenidos desde la levadura de la especie *P. pastoris* que expresa y secreta el antígeno HE del virus ISA lo cual constituiría un producto inmunológico para ser utilizado tanto en métodos diagnósticos como profilácticos en una vacuna oral contra el virus ISA.

Conclusiones

- Fue posible subclonar el gen optimizado que codifica para el antígeno *HE* del virus ISA en el vector pPICZ α A y B. Sin embargo, únicamente el plasmidio pPICZ α A logró el producto de secreción esperado.
- Al transformar la levadura *P. pastoris* con la construcción pPICZ α ::*HE* se obtuvo una proteína HE recombinante como producto de secreción, con un máximo de expresión a las 48 hrs de inducción, y con un rendimiento de aproximadamente 10,4 gr/L.
- En las pruebas Western blot y ELISA se observa que las proteínas recombinantes HE son inmunorreactivas, puesto que al ser enfrentados tanto a sueros de salmones infectados en forma natural como con un anticuerpo monoclonal anti-ISA, producen una reacción positiva.

Bibliografía

ALLNUTT, T.; BOWERS, R.; ROWE, C.; VAKHARIA, V.; LAPATRA, S.; DHAR, A. 2007. "Antigenicity of infectious pancreatic necrosis virus VP2 subviral particles expressed in yeast." *Vaccine* 21:4880-4888.

BAHIR, I.; FROMER, M.; PRAT, Y.; LINIAL, M. 2009. "Viral adaptation to host: a proteome-based analysis of codon usage and amino acid preferences." *Molecular Systems Biology* 5:311.

BEUKEN, E.; VINK, C.; BRUGGEMAN, C. 1998. "One-step Procedure for Screening Recombinant Plasmids by Size." *Biotechniques* 24:748-750.

BOUCHARD, D.; BROCKWAY, K.; GIRAY, C.; KELEHER, W.; MERRILL, P. 2001. "First report of infectious salmon anemia (ISA) in the United States." *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 21(2):86-88.

BUCAREY, S.; NORIEGA, J.; REYES, P.; TAPIA, C.; SÁENZ, L.; ZUÑIGA, A.; TOBAR, J. 2009. "The optimized capsid gene of porcine circovirus type 2 expressed in yeast forms virus-like particles and elicits antibody responses in mice fed with recombinant yeast extracts." *Vaccine* 27:5781-5790.

CEREGHINO, J.; CREGG, J. 2000. "Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." *FEMS Microbiology Reviews* 1:45-66.

CIPRIANO, R. 2002. "Infectious Salmon Anemia Virus", United States Geological Survey National Fish Health Research Laboratory. Fish Disease Leaflet number 85 [En línea] <http://www.lsc.usgs.gov/fhb/leaflets/FHB85.pdf> [consulta 05-04-2009].

CHEN, F.; CHEN, X.; CHEN, Z.; JIANG, H.; PAN, X.; HU, Z. 2005. "Construction and application of a yeast expression system for thymosin alpha1." *Biocell* 3:253-259.

CHILE. SUB SECRETARIA DE PESCA. Abril 2008. Documento Informativo: Anemia Infecciosa del Salmón en Chile (virus ISA). [En línea] http://www.sonepsyn.cl/sochinf/Virus_ISA.pdf [consulta 10-04-2009].

CLOUTHIER, C.; RECTOR, T.; BROWN, N.; ANDERSON, E. 2002. “Genomic organization of infectious salmon anemia virus.” *Journal of General Virology* 83:421-428.

CREGG, J.; VEDVIK, T.; RASCHKE, W. 1993. “Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*.” *Biotechnology* 8:905-910.

DALY, R.; HEARN, M. 2005. “Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production.” *Journal of Molecular Recognition* 18(2):119-138.

DEVOLD, M.; FALK, K.; DALE, O.; KROSSOY, B.; BIERING, E.; ASPEHAU, V.; NILSEN, F.; NYLUND, A. 2001 “Strain variation, based on the hemagglutinin gene, in Norwegian ISA virus isolates collected from 1987 to 2001: indications of recombination.” *Diseases of Aquatic Organism*. 47(2):119–128.

GIETZ, R.; WOODS, R. 2006. “Yeast Transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method.” *Methods Molecular Biology* 313:107-120.

GODOY, M.; AEDO, A.; KIBENGE, M.; GROMAN, D.; YASON, C.; GROTHUSEN, H.; LISPERGUER, A.; CALBUCURA, M.; AVENDAÑO, F.; IMILÁN, M.; JARPA, M.; KIBENGE, F. 2008. “First detection, isolation and molecular characterization of infectious salmon anaemia virus associated with clinical disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Chile.” *BMC Veterinary Research*. 4:28-41.

JOOSTEN, P.; ENGELSMA, M.; VAN DER ZEE, M.; ROMBOUT, J. 1997. “Induction of oral tolerance in carp (*Cyprinus carpio L.*) after feeding protein antigens.” *Veterinary Immunology Immunopathology* 60(1-2):187-196.

LAEMMLI, UK. 1970. “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.” *Nature* 227(5259):680-685.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.; SAMBROOK, J. 1982. “Molecular Cloning: A Laboratory Manual.” 1^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, C.S.H., New York. 60-70pp.

MARDONES, O.; PEREZ, A.; CARPENTER, T. 2009 “Epidemiologic investigation of the re-emergence of infectious salmon anemia virus in Chile” *Diseases of Aquatic Organism*. 84(2):105-114.

MARKUSSEN, T.; JONASSEN, C.; NUMANOVIC, S.; BRAAEN, S.; HJORTAAS, M.; NILSEN, H.; MJAALAND, S. 2008. “Evolutionary mechanisms involved in the virulence of infectious salmon anaemia virus (ISAV), a piscine *orthomyxovirus*.” *Virology* 374(2):515-527.

MIKALSEN, A.; SINDRE, H.; MJAALAND, S.; RIMSAT, E. 2005. “Expression, antigenicity and studies on cell receptor binding of the hemagglutinin of infectious salmon anemia virus.” *Archives of Virology* 150(8):1621-1637.

NYLUND, A.; PLARRE, H.; KARLSEN, M.; FRIDELL, F.; OTTEM, K.; BRATLAND, A.; SAETHER, P. 2006. “Transmission of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in farmed populations of Atlantic salmon (*Salmo salar*).” *Archives of Virology* 152:151–179.

OIE. DANNEVIG, B. 2000. “Aquatic Animal Disease Cards” [En línea] <http://www.marine.ie/NR/rdonlyres/38ABD305-7322-4C7F-A699-7365C2606F/0/InfectiousSalmonAnemiaOIEDiseaseCard.pdf> [Consulta 16-05-2009].

OIE. 2006 “Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animal” 5^a ed. [En línea](http://www.oie.int/eng/Normes/fmanual/A_00026.htm) [Consulta 16-05-2009].

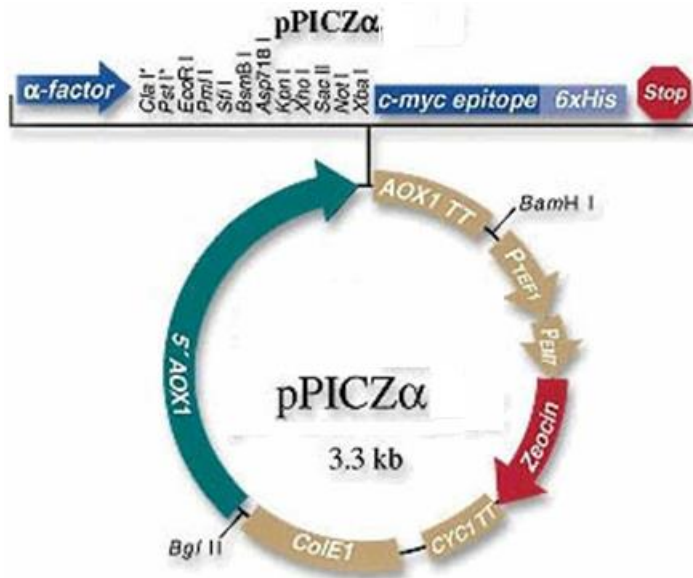
SEVASTSYANOVICH, Y.; ALFASI, S.; COLE, J. 2009. “Recombinant protein production: a comparative view on host physiology.” *New Biotechnology* 25(4):175-180.

VIKE, S.; NYLUND, S.; NYLUND, A. 2008. “ISA virus in Chile: Evidence of vertical transmission.” *BMC Veterinary Research*. 154(1):1-8.

WANG, C.; LUO, Y.; CHEN, Y.; LI, S.; LIN, C.; HSIEN, Y.; LIU, H. 2007. “The cleavage of hemagglutinin protein of H5N2 avian influenza virus in yeast.” *Journal of Virological Methods*. 146(1-2): 293-297.

Anexo 1

Esquema de Plasmidio PICZ α utilizado como vector de expresión para la transformación de las levaduras de la especie *P. pastoris*.



Anexo 2

Secuencia aminoacídica predicha del gen *HE* del virus ISA .

En color rojo se destacan los residuos de cisteína de la proteína (10 residuos) que podrían potencialmente formar puentes disulfuro.

MRFPSIFTAVLFAASSALARL**C**LRNYPDTTWLGDSRSDQSRVNPQSLDLVTEFKGVLOAKN
GNLLKQMSGRFPSDWYTPPTTKYRILYLGTD**C**TDGPTDMI IPTSMTLDNAARELYLG**C**R
GDVRVTPTFVGAAIVGLVGRDAITGFSVKVLTFNSTIVVVGLNGMSGIYKV**C**IAATSGN
VGGVTLING**C**GYFNTPLRFDNFQGGIYVSDTFEVRGTKNK**C**VLLRSSSDTPL**C**SHIMRNVE
LDEYVDTPNTGGVYPSDGFDSLHGSASVRTFLTDALT**C**PDIDWSRIDAAS**C**EYDS**C**PKMVK
DFDQTSLGNTDTLIMREVALHKEMISKLQRNITDVKTSVLSNIFIS

Anexo 3



NetOGlyc 3.1 Server - prediction results

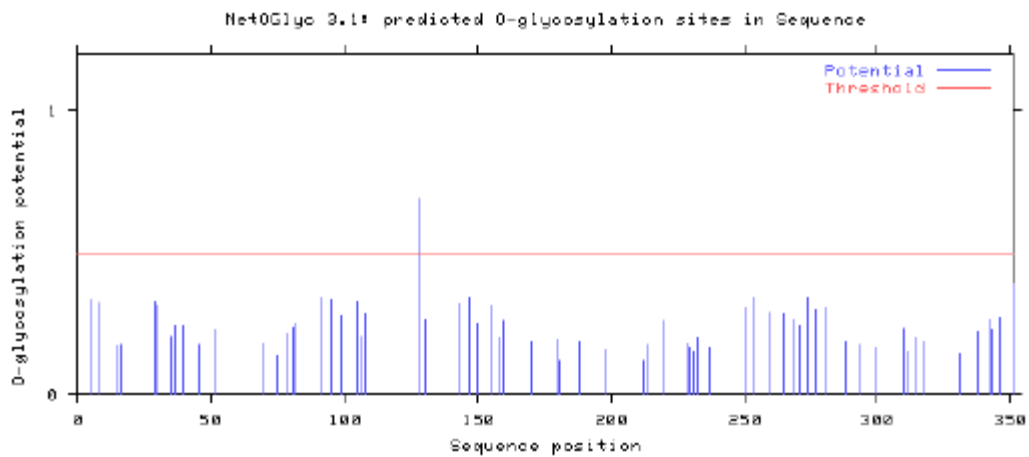
Technical University of Denmark

Name: Sequence Length: 351
 MRFPSIFTAVLFAASSALARLCLRNYPDTTWLGDSDQSRVNPQSLDLVTEFKGVLQAKNGNLLKQMSGRFPPSDWYTP
 TTKYRILYLGTDNDCTDGPDMIIPSTMTLDNAARELYLGACRGDVRVPTPFVGAIVGLVGRDTDAITGFSVKVLTFSPT
 IIVVGLNGMSGIYKVCIAATSGNVGGVTLINGCCGYFNTPLRFDNFQGIYVSDTFEVRGKTKNCVLLRSSSDTPLCSHIM
 RNVELDEYVDTNPNTGGVYPSDGFDSLHGSASVRFLTDALTCPDIDWSRIDAASCEYDSCPMMVKDFDQTSLGNTDTLIM
 REVALHKEMISKLQRNITDVKTSVLSNIFIS

.....
T.....

Name	S/T	Pos	G-score	I-score	Y/N	Comment
Sequence	S	5	0.337	0.033	.	-
Sequence	T	8	0.320	0.076	.	-
Sequence	S	15	0.171	0.035	.	-
Sequence	S	16	0.173	0.029	.	-
Sequence	T	29	0.326	0.037	.	-
Sequence	T	30	0.311	0.111	.	-
Sequence	S	35	0.203	0.020	.	-
Sequence	S	37	0.243	0.027	.	-
Sequence	S	40	0.242	0.023	.	-
Sequence	S	46	0.173	0.043	.	-
Sequence	T	51	0.225	0.059	.	-
Sequence	S	70	0.179	0.068	.	-
Sequence	S	75	0.136	0.035	.	-
Sequence	T	79	0.218	0.075	.	-
Sequence	T	81	0.236	0.029	.	-
Sequence	T	82	0.251	0.057	.	-
Sequence	T	91	0.342	0.057	.	-
Sequence	T	95	0.333	0.070	.	-
Sequence	T	99	0.279	0.301	.	-
Sequence	T	105	0.327	0.419	.	-
Sequence	S	106	0.203	0.067	.	-
Sequence	T	108	0.281	0.170	.	-
Sequence	T	128	0.257	0.689	T	-
Sequence	T	130	0.264	0.351	.	-
Sequence	T	143	0.316	0.063	.	-
Sequence	T	147	0.337	0.052	.	-
Sequence	S	150	0.248	0.057	.	-
Sequence	T	155	0.309	0.078	.	-
Sequence	S	158	0.196	0.055	.	-
Sequence	T	160	0.261	0.050	.	-
Sequence	S	170	0.187	0.032	.	-
Sequence	T	180	0.193	0.242	.	-
Sequence	S	181	0.120	0.081	.	-
Sequence	T	188	0.190	0.037	.	-
Sequence	T	198	0.158	0.025	.	-
Sequence	S	212	0.116	0.110	.	-
Sequence	T	214	0.173	0.044	.	-
Sequence	T	220	0.261	0.234	.	-
Sequence	S	229	0.183	0.025	.	-

Sequence	S	230	0.162	0.048	.	-
Sequence	S	231	0.152	0.033	.	-
Sequence	T	233	0.199	0.047	.	-
Sequence	S	237	0.163	0.070	.	-
Sequence	T	251	0.304	0.056	.	-
Sequence	T	254	0.338	0.080	.	-
Sequence	S	260	0.287	0.494	.	-
Sequence	S	265	0.285	0.041	.	-
Sequence	S	269	0.267	0.044	.	-
Sequence	S	271	0.242	0.030	.	-
Sequence	T	274	0.342	0.053	.	-
Sequence	T	277	0.300	0.079	.	-
Sequence	T	281	0.304	0.049	.	-
Sequence	S	288	0.184	0.031	.	-
Sequence	S	294	0.173	0.036	.	-
Sequence	S	299	0.162	0.039	.	-
Sequence	T	310	0.231	0.041	.	-
Sequence	S	311	0.155	0.050	.	-
Sequence	T	315	0.199	0.046	.	-
Sequence	T	317	0.190	0.031	.	-
Sequence	S	331	0.143	0.053	.	-
Sequence	T	338	0.222	0.050	.	-
Sequence	T	342	0.268	0.059	.	-
Sequence	S	343	0.228	0.230	.	-
Sequence	S	346	0.271	0.054	.	-
Sequence	S	351	0.388	0.053	.	-



[Graphics in PostScript](#)



NetNGlyc 1.0 Server - prediction results

Technical University of Denmark

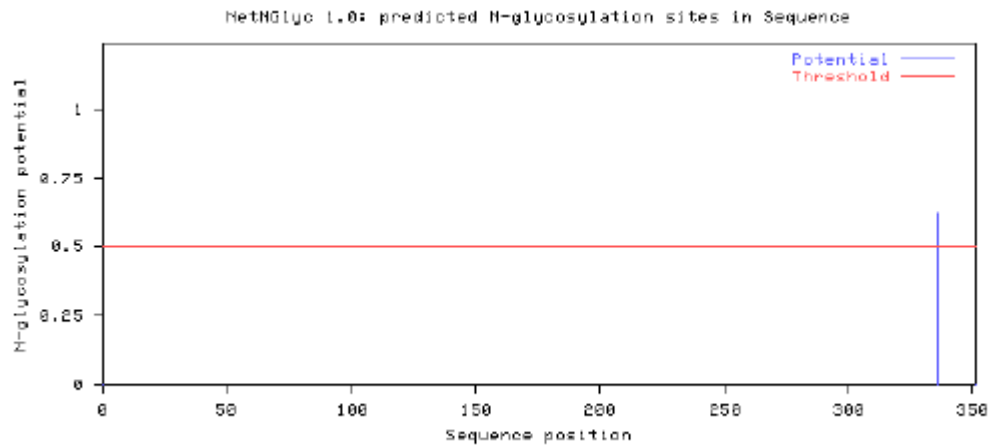
Asn-Xaa-Ser/Thr sequons in the sequence output below are highlighted in **blue**.
Asparagines predicted to be N-glycosylated are highlighted in **red**.

Output for 'Sequence'

```
Name: Sequence      Length: 351
MRFPSIFTAVLFAASSALARLCLRNYPDTTWLGDSDQSRVNPQSLDLVTEFKGVLQAKNGNLLKQMSGRFPSDWYTP      80
TTYRILYLGTDNDCTDGPDMIIPTSMTLDNAARELYLGACRQDVRVTPTFVGAIVGLVGRDAITGFSVKVLTFSNSPT      160
IVVVGILNGMSGIYKVCIAATSGNVGGVTLINGCCYFNTPLRFDNFQGGIYVSDTFEVVGRGKTKNCVLLRSSSDTPLCSHIM  240
RNVELDEYVDTPTNTGGVYPSDGFDSLHGASVVRTFLTDALTCPDIDWSRIDAASCEYDSCPKMKVDFDQTSLGNTDTLIM  320
REVALHKEMISKLRNITDVKTSVLSNIFIS
.....N.....
.....
.....
.....
.....
```

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	336 NITD	0.6227	(7/9)	+



[Graphics in PostScript](#)

Anexo 4



NetPhos 2.0 Server - prediction results

Technical University of Denmark

```

351 Sequence
MRFPSIFTAVLFAASSALARLCLRNYPDTTWLGDERSDQSRVNPQSLDLVTEFKGVLQAKNGNGLLKQMSGRFPSPDWYTP      80
TTKYRILYLGTDNDCTDGPDTMIIPSTMTLDNAARELYLGACRGDVRVTPFVGAAIVGLVGRDITGFSVKVLTFFNSPT      160
IVVVGLNGMSGIYKVCIAATSGNVGGVTLINGCCGFNTPLRFDFNFQGGIYVSDTFEVRGTRKNCVLLRSSSDTPLCSHIM      240
RNVELDEYVDTPTNTGGVYPSDGFDSLHGSASVRTPLTDALTCPDIDWSRIDAASCEYDSCPMMVKDFDQTSLGNTDTLIM      320
REVALHKEMISKLRNITDVKTSVLSNIFIS      400
.....T.....S.....S.....S.....Y..      80
.T.Y.....T.....T.....S.....      160
.....Y.T.....Y.S.....T.....S.S.....      240
.....Y.....S.....S.Y.....TS.....      320
.....S.....      400
  
```

Phosphorylation sites predicted: Ser: 11 Thr: 7 Tyr: 6

Serine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
v				
Sequence	5	MRFPSIFTA	0.042	.
Sequence	15	LFAASSALA	0.009	.
Sequence	16	FAASSALAR	0.004	.
Sequence	35	WLGDSRSQ	0.995	*S*
Sequence	37	GDSRSQSR	0.020	.
Sequence	40	RSDQSRVNP	0.830	*S*
Sequence	46	VNPQSLDLV	0.011	.
Sequence	70	LKQMSGRFP	0.779	*S*
Sequence	75	GRFPSDWYT	0.277	.
Sequence	106	IIPSTMTLD	0.048	.
Sequence	150	ITGFSVKVL	0.754	*S*
Sequence	158	LTFNSPTIV	0.006	.
Sequence	170	LNGMSGIYK	0.025	.
Sequence	181	IAATSGNVG	0.015	.
Sequence	212	QIYVSDTFE	0.559	*S*
Sequence	229	VLLRSSSDT	0.980	*S*
Sequence	230	LLRSSSDTP	0.422	.
Sequence	231	LRSSSDIPL	0.844	*S*
Sequence	237	TPLCSHIMR	0.006	.
Sequence	260	GVYPSDGF	0.199	.
Sequence	265	DGFDSLHGS	0.430	.
Sequence	269	SLHGSASVR	0.014	.
Sequence	271	HGSASVRTF	0.225	.
Sequence	288	DIDWSRIDA	0.970	*S*
Sequence	294	IDAASCEYD	0.940	*S*
Sequence	299	CEYDSCPMM	0.077	.
Sequence	311	FDQTSLGNT	0.965	*S*
Sequence	331	KEMISKLR	0.003	.
Sequence	343	DVKTSVLSN	0.898	*S*
Sequence	346	TSVLSNIFI	0.309	.
Sequence	351	NIFIS---	0.008	.

Threonine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
v				
Sequence	8	PSIFTAVLF	0.191	.
Sequence	29	NYPDTTWLG	0.205	.
Sequence	30	YPDTTWLGD	0.597	*T*

Sequence	51	LDLVTEFKG	0.016	.
Sequence	79	SDWYTPTK	0.071	.
Sequence	81	WYTPTKYR	0.448	.
Sequence	82	YTPTKYRI	0.720	*T*
Sequence	91	LVLGTNDCT	0.047	.
Sequence	95	TNDCTDGPT	0.027	.
Sequence	99	TDGPTDMI	0.004	.
Sequence	105	MIIPTSMTL	0.035	.
Sequence	108	PTSMILDNA	0.516	*T*
Sequence	128	DVRVPTPFV	0.726	*T*
Sequence	130	RVPTPFVGA	0.276	.
Sequence	143	LVGRDALT	0.012	.
Sequence	147	TDALTGFSV	0.031	.
Sequence	155	VKVLTFNSP	0.043	.
Sequence	160	FNSPTIVVV	0.075	.
Sequence	180	CIAATSGNV	0.103	.
Sequence	188	VGGVTLING	0.028	.
Sequence	198	GYFNTPLRF	0.649	*T*
Sequence	214	YVSDTFEVR	0.216	.
Sequence	220	EVRGTKNKC	0.578	*T*
Sequence	233	SSSDTPLCS	0.365	.
Sequence	251	EYVDPNTG	0.498	.
Sequence	254	DTPNTGGVY	0.475	.
Sequence	274	ASVRTFLTD	0.011	.
Sequence	277	RTFLTDALT	0.186	.
Sequence	281	TDALTCPDI	0.017	.
Sequence	310	DFDQTSLGN	0.568	*T*
Sequence	315	SLGNTDTLI	0.010	.
Sequence	317	GNTDTLIMR	0.089	.
Sequence	338	QRNITDVKT	0.321	.
Sequence	342	TDVKTSVLS	0.098	.

^

Tyrosine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
Sequence	26	CLRNYPDTT	0.077	.
Sequence	78	PSDWYTPTT	0.619	*Y*
Sequence	84	PTTKYRILY	0.518	*Y*
Sequence	88	YRILYLGTN	0.058	.
Sequence	117	ARELYLGAC	0.237	.
Sequence	173	MSGIYKVCV	0.044	.
Sequence	195	NGCGYFNTP	0.684	*Y*
Sequence	210	QQQIYVSDT	0.587	*Y*
Sequence	248	ELDEYVDTP	0.990	*Y*
Sequence	258	TGGVYPSDG	0.142	.
Sequence	297	ASCEYDSCP	0.569	*Y*

^

