

Relationship between apoptosis and the BH2 domain sequence of the VP5 peptide of infectious pancreatic necrosis virus

Relación entre apoptosis y secuencia del dominio BH2 del peptido VP5 del virus de la necrosis pancreatica infecciosa

Cesar Ortega S,^{1*} Ph.D, Sylvia Rodríguez S,² Ph.D, Juan Carlos Espinoza,³ M.Sc, Juan Kuznar,³ Ph.D, Alex Romero,^{4,5} Ph.D, Ricardo Enríquez,⁴ Ph.D.

¹Universidad Autonoma del Estado de México, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, Advanced Animal Health Research and Study Center. Toluca, Mexico, AP. 4-56. ²Biologic Research Center (High Council for Scientific Research) c/ Ramiro de Maeztu 9 Madrid 28040, Spain. ³Universidad de Valparaiso, Faculty of Sciences, Biochemistry and Virology Laboratory. Gran Bretaña 1111, Valparaíso, Chile. ⁴Universidad Austral de Chile, Faculty of Veterinary Sciences, Biotechnology and Aquatic Pathology Laboratory. Valdivia, Chile. ⁵Centro FONDAPE: Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), Chile. *Correspondence: cos_mx@hotmail.com

Received: March 2013; Accepted: September 2013.

ABSTRACT

Objective. To determine whether the level of apoptosis induced by infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) is related to the amino acid sequence of the BH2 domain of the VP5 protein and the level of infectivity. **Materials and methods.** Three IPNV strains were used, the VP2 protein gene was amplified for genotyping and the VP5 sequence was also obtained. The infectivity of the strains was calculated using the viral titer obtained at 12, 24, 36 and 45 hpi in CHSE-214 cells. The percentage of apoptosis in infected cells was visualized by TUNEL assay and immunohistochemistry (caspase 3 detection). **Results.** The V70/06 and V33/98 strains corresponded to genotype Sp, while V112/06 to VR-299; the amino acid analysis of the V70/06 strain allows its classification as middle virulent strain and V33/98 and V112/06 strains as low virulent ones; infection with the V112/06 strain produced a lower viral titer ($p < 0.05$). The VP5 gene of the 3 strains showed four homologous domains to Bcl-2, however, the BH2 domain was truncated in V70/06 and V33/98 (12 kDa), being complete (15kDa) in V112/06, which also showed the Trp155 residue, equivalent to Trp188 considered as a critical factor for the function of Bcl-2. The average apoptosis was below 12%, showing no differences between strains ($p > 0.05$). **Conclusions.** The results showed that the differences in the BH2 sequence of the VP5 protein, infectivity and the VP2 sequence are not associated with the modulation of apoptosis.

Key words: Apoptosis, Infectivity, IPNV, VP5 (*Source: MeSH*).

RESUMEN

Objetivo. Determinar si el nivel de apoptosis inducido por cepas del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) tiene relación con la secuencia aminoacídica del dominio BH2 de la proteína VP5 y el nivel de infectividad. **Materiales y métodos.** Se utilizaron tres cepas de IPNV; el gen de la proteína VP2 fue amplificado para genotipificación y se obtuvo la secuencia de VP5. La infectividad

de las cepas se calculó mediante el título viral obtenido a 12, 24, 36 y 45 hpi en células CHSE-214. Los porcentajes de apoptosis en células infectadas se visualizaron mediante ensayo TUNEL e inmunohistoquímica (detección de caspasa 3). **Resultados.** Las cepas V70/06 y V33/98 correspondieron a genotipo Sp, mientras que V112/06 a VR-299; el análisis aminoacídico relacionó a V70/06 como cepa de mediana virulencia y a V33/98 y V112/06 de baja virulencia; la infección con V112/06 produjo menor título viral ($p < 0.05$). El gen VP5 de las 3 cepas presentó los cuatro dominios homólogos a Bcl-2; sin embargo, el dominio BH2 fue truncado en V70/06 y V33/98 (12 kDa); siendo completo (15kDa) en V112/06, que además, presentó el residuo Trp155, equivalente a Trp188 considerado factor crítico para la función de Bcl-2. El promedio de apoptosis fue inferior a 12%, no se observaron diferencias entre cepas ($p > 0.05$). **Conclusiones.** Los resultados mostraron que las diferencias en la secuencia de BH2 de la proteína VP5, la infectividad y en la secuencia de la proteína VP2 no están asociadas con la modulación de apoptosis.

Palabras clave: Apoptosis, infectividad, IPNV, VP5 (*Fuente: MeSH*).

INTRODUCCIÓN

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) ocasiona una enfermedad contagiosa de distribución mundial que afecta principalmente a salmónidos jóvenes (1); la especie, la edad y el estado de salud de los animales afectados y la virulencia de la cepa son factores que influyen sobre la signología clínica y el nivel de mortalidad (2,3).

El genoma de IPNV consiste de dos segmentos de ARN de doble cadena (dsRNA). El segmento A presenta dos marcos de lectura abiertos (ORFs); el ORF mayor codifica una poliproteína 5'-pVP2-NS-VP3', que es escindida co-traduccionalmente por la proteasa no estructural (NS) o VP4, generando las proteínas estructurales VP2 y VP3, que respectivamente integran la superficie externa e interna de la cápside viral; el ORF menor codifica un péptido NS conocido como VP5 el cual no forma parte del virión y ha sido implicado en la inhibición de apoptosis, favoreciendo así la supervivencia viral. El segmento B presenta un solo ORF que codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), conocida como VP1 (3,4).

El papel de las proteínas de IPNV como factor de virulencia no está plenamente determinado, pero se sugiere que a través de alguno de sus productos, el virus podría modular ciertos procesos celulares para favorecer la supervivencia de su progenie, además, de alterar mecanismos de defensa para establecer la infección (5,6). Sano et al (7), relacionaron la virulencia de IPNV con productos del genoma del segmento A, y posteriormente, Song et al (4) identificaron que variaciones en los residuos 217 y 221 en la secuencia aminoacídica de la proteína VP2 influyen en el nivel de virulencia de las cepas. La función de VP5 es incierta, pero debido a que presenta cuatro dominios homólogos con proteínas celulares anti-apoptóticas Bcl-2 (BH) se considera factor de virulencia que podría modular esta forma de muerte celular (6,8,9), asociado a la secuencia aminoacídica del dominio BH2 (10).

INTRODUCTION

The infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) causes a contagious globally distributed disease that mainly affects young salmonids (1); the species, age and health condition of animals affected and the virulence of the strain are factors that influence the clinical signs and mortality level (2,3).

The IPNV genome consists of two double-stranded RNA segments (dsRNA). Segment A exhibits two open reading frames (ORFs); the highest ORF encodes a polyprotein 5'-pVP2-NS-VP3', which is cotranslationally divided by the nonstructural protease (NS) or VP4, generating structural proteins VP2 and VP3, which respectively comprise the external and internal surface of the viral capsid; the lower ORF encodes an NS peptide known as VP5 which is not part of the virion and has been implicated in the inhibition of apoptosis, thus promoting viral survival. The Segment B shows a single ORF encoding a polymerase RNA dependent on RNA (RdRp), known as VP1 (3,4).

The role of IPNV proteins as virulence factor is not fully determined, but it is suggested that through any of its products, the virus could modulate certain cellular processes to favor the survival of its progeny, in addition, to alter defense mechanisms for establishing the infection (5,6). Sano et al (7), related the virulence of IPNV with products of the genome of segment A, and subsequently, Song et al (4) identified that variations in residues 217 and 221 in the amino acid sequence of the VP2 protein influence the virulence level of strains. The function of VP5 is uncertain, but since it shows four homologous domains with anti-apoptotic cellular proteins Bcl-2 (BH) it is considered as virulence factor that could modulate this form of cell death (6,8,9), associated with the amino acid sequence of the BH2 domain (10).

La apoptosis es un proceso de muerte celular genéticamente controlado, implicado en regular el desarrollo y la homeostasis de los tejidos; también es un mecanismo de defensa que puede estimularse por reacciones inmunes o cuando existe daño celular por enfermedad o agentes tóxicos. Este proceso puede iniciarse mediante estimulación celular externa (vía extrínseca o mediada por receptor) o interna (vía intrínseca o mitocondrial); en ambas vías participan un grupo conservado de cisteína-proteasas específicas de aspartato denominadas caspasas que se sintetizan como zimógenos, los cuales deben sufrir fragmentación proteolítica para activarse. La activación de la caspasa iniciadora desencadena un programa de muerte secuencial, donde las caspasas ejecutoras alteran proteínas del citoesqueleto y la matriz nuclear. La activación de caspasa 3 libera el inhibidor de una DNAasa citoplasmática (CAD) que da lugar a la fragmentación internucleosomal del ADN (9,11,12). Ante infecciones virales, la modulación de apoptosis se ha asociado a productos del virus, que pueden manipular ciertos procesos de las células para permitir la supervivencia de su progenie (13-15).

Hong et al (5), reportaron que el efecto citopático (CPE) que muestran células infectadas con IPNV es un proceso post apoptótico, relacionado con represión del gen del factor de supervivencia Mcl-1, un miembro de la familia de proteínas antiapoptóticas Bcl-2; en contraste, Espinoza et al (13), reportan que sólo el 12% de la población celular infectada con una cepa de serotipo VR-299 presentó apoptosis, prevaleciendo la muerte celular por necrosis. Santi et al (10), no observaron diferencias en el porcentaje de apoptosis en células infectadas con cepas recombinantes de serotipo Spjarup (Sp), incluyendo una cepa que no expresaba VP5, sugiriendo que sustituciones o ausencias de ciertos residuos de la secuencia del dominio BH2 u otro(s) factor(es) del virus podrían influir en el desarrollo de esta forma de muerte celular. Ante estos antecedentes, este estudio se realizó para relacionar el nivel de inducción de apoptosis con la secuencia del dominio BH2 y con el nivel de infectividad de tres cepas de campo de IPNV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células y virus. Se utilizaron células *Chinook salmon embryo* (CHSE-214) para propagación de IPNV y en los ensayos para evaluar apoptosis. Las células se cultivaron a 20°C en medio de cultivo *Minimal Essential Medium* con sales de Eagle (E-MEM), suplementado con 100 UI de penicilina/ml, 100 µg de estreptomycin/ml y 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB). Una vez formada la monocapa, las células se mantuvieron en E-MEM suplementado con 2% (v/v) de SFB.

Apoptosis is a genetically controlled cell death process, involved in regulating the development and homeostasis of tissues; it is also a defense mechanism that can be stimulated by immune reactions or when there is cell damage by disease or toxic agents. This process can be initiated by external (extrinsic or receptor-mediated) or internal (intrinsic or mitochondrial) cell stimulation; both involve a preserved group of specific aspartate cysteine-proteases called caspases that are synthesized as zymogens, which must undergo proteolytic fragmentation to activate. The activation of the initial caspase triggers a sequential death program, where executing caspases alter proteins of the cytoskeleton and nuclear matrix. The activation of caspase 3 releases the inhibitor of a cytoplasmic DNase (CAD) that gives rise to the internucleosomal fragmentation of DNA (9,11,12). In viral infections, the modulation of apoptosis has been associated with products of the virus, which can manipulate certain cells processes to allow the survival of their progeny (13-15).

Hong et al (5) reported that the cytopathic effect (CPE) showed by cells infected with IPNV is a post apoptotic process, related to the suppression of the gene of the survival factor Mcl-1, a member of the antiapoptotic protein family Bcl-2; in contrast, Espinoza et al (13), reported that only 12% of the cell population infected with a strain of serotype VR-299 showed apoptosis, with cell death by necrosis taking precedence. Santi et al (10), observed no differences in the percentage of apoptosis in cells infected with recombinant strains of Spjarup serotype (Sp), including a strain that did not express VP5, suggesting that replacements or absences of certain residues of the sequence of the BH2 domain or other factor(s) of the virus could influence the development of this form of cell death. With this background, this study was undertaken to relate the induction level of apoptosis with the BH2 domain sequence and with the level of infectivity of three field strains of IPNV.

MATERIALS AND METHODS

Cells and virus. *Chinook salmon embryo* (CHSE-214) cells were used for the propagation of IPNV and in assays to assess apoptosis. Cells were cultured at 20°C in a *Minimal Essential Medium* with Eagle (E-MEM) salts, supplemented with 100 IU of penicillin/ml, 100 µg of streptomycin/ml and 10% (v/v) of fetal bovine serum (FBS). Once the monolayer has been formed, cells were kept in E-MEM supplemented with 2% (v/v) of FBS.

Las cepas de virus utilizadas fueron obtenidas de casos clínicos de necrosis pancreática infecciosa (IPN). El virus V33/98 fue aislado en 1998 a partir de juveniles de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) cuya infección ocasionó un 80% de mortalidad; el virus V70/06 se obtuvo en 2006 de juveniles de *S. salar* en los que se observó mortalidad inicial alta con evolución a baja mortalidad y cronicidad, mientras que el virus V112/06, se aisló de crías de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) donde se observó un 40% de mortalidad (16). Los virus se reactivaron por inoculación en células CHSE-214 pre-confluentes en E-MEM con 2% (v/v) de SFB; al presentar extenso efecto citopático (CPE), el cultivo se congeló por 24 h y posteriormente se descongeló y centrifugó durante 10 min a 4000 rpm a 4°C; el título viral se calculó por el método de Reed y Muench (17).

Los siguientes códigos de acceso al GenBank se utilizaron para alineamiento y comparación de la proteína VP5 de IPNV: AAK71697 VP5 Ab/E1S; AY379740 VP5 de 12.1 kDa/Sp; Q69CI1 VP5 15 Kda IPNV/Sp; AAA92630 VP5 IPNV/VR-299; P10415 Bcl2 Humana-Apoptosis regulator.

Amplificación de los genomas de VP2 y VP5 por RT-PCR. El RNA viral, fue aislado de sobrenadantes de cultivo celular mediante extracción en columna según especificaciones del Viral RNA mini Kit Q1Aamp® (Cat. No. 52904; QiAGEN Alemania). El ARN eluido en 50 µl de agua desionizada estéril tratada con dietil pirocarbonato se cuantificó por espectrofotometría y se congeló a -80°C hasta su utilización.

La obtención y amplificación de cDNA se realizó utilizando 0,25 µg de Random primers (Promega) en 20 µl de solución de reacción. La amplificación de un producto génico de 1180 pb correspondiente a parte de la secuencia codificante de VP2 se realizó en un termociclador Gene Amp PCR System 2400® (Perkin Elmer) en un volumen de 50 µl; los *primers* utilizados para amplificación de VP2 y los parámetros de ciclos fueron iguales a lo descrito en Ortega et al (16). La amplificación del gen VP5 se realizó con cantidades de reactivos y ciclos similares como para VP2, sustituyendo los *primers* específicos para amplificar un producto de 450 pb: Fwd-5' ATGGCGAAGCCCTTTCTAAC-3' y Rev-5' ACAGACTTCCTTCGAAGGTG-3'; ambos productos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, aplicando corriente de 80 mA por 30 min en cámara SUB-CELL GT® y fuente de poder POWER-PAC 200® (BIO-RAD). Los geles se analizaron en transiluminador TFX-20.M® (VILBER LOURMAT), detectando fragmentos de 1180 pb y 450 pb, correspondientes a VP2 y VP5, respectivamente.

The virus strains used were obtained from clinical cases of infectious pancreatic necrosis (IPN). The V33/98 virus was isolated in 1998 from juvenils of Atlantic salmon (*Salmo salar*) the infection of which caused a mortality of 80%; the V70/06 virus was obtained in 2006 from juvenils of *S. salar* in which high initial mortality was observed with evolution to low mortality and chronicity, while the V112/06 virus was isolated from rainbow trout fries (*Oncorhynchus mykiss*) where a mortality of 40% was observed (16). The virus was reactivated by inoculation in pre-confluent CHSE-214 cells in E-MEM with 2% (v/v) of FBS; when showing an extensive cytopathic effect (CPE), the culture was frozen for 24 h and then thawed and centrifuged for 10 min at 4,000 rpm at 4°C; the viral titer was calculated by the Reed-Muench method (17).

The following access codes to the GenBank were used for the alignment and comparison of the VP5 protein of IPNV: AAK71697 VP5 Ab/E1S; AY379740 VP5 of 12.1 kDa/Sp; Q69CI1 VP5 15 Kda IPNV/Sp; AAA92630 VP5 IPNV/VR-299; P10415 Bcl2 Humana-Apoptosis regulator.

Amplification of VP2 y VP5 genomes by RT-PCR. The viral RNA was isolated from cell culture supernatants by column extraction according to specifications of the Viral RNA mini Kit Q1Aamp® (Cat. No. 52904; QiAGEN Germany). The RNA diluted in 50 µl of sterile deionized water treated with diethyl pyrocarbonate was quantified by spectrophotometry and frozen at -80°C until use.

The obtaining and amplification of cDNA was carried out using 0.25 µg of Random primers (Promega) in 20 µl of reagent solution. The amplification of a gene product of 1180 pb corresponding to a portion of the VP2 coding sequence was carried out in a thermal cycler Gene Amp PCR System 2400® (Perkin Elmer) in a volume of 50 µl; the primers used for the amplification of VP2 and cycle parameters were the same as described in Ortega et al (16). The amplification of the VP5 gene was carried out with quantities of reagents and similar cycles as for VP2, replacing specific primers to amplify a product of 450 pb: Fwd-5' ATGGCGAAGCCCTTTCTAAC-3' and Rev-5' ACAGACTTCCTTCGAAGGTG-3'; both products were subjected to electrophoresis in agarose gel at 1% with ethidium bromide, applying a current of 80 mA for 30 min in a camera SUB-CELL GT® and power supply POWER-Cap 200® (BIO-RAD). The gels were analyzed in a transilluminator TFX-20.M® (VILBER LOURMAT), detecting fragments of 1.180 pb and 450 bp, corresponding to VP2 and VP5, respectively.

Los segmentos de cDNA con parte de la secuencia codificante de VP2 y VP5 se extrajeron desde el gel de agarosa de acuerdo a instrucciones del proveedor de E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit (OMEGA BIO-TEK) y una vez purificados, se enviaron a secuenciar. Las secuencias nucleotídicas obtenidas se tradujeron mediante ExPASy y la secuencia aminoacídica deducida de ambas proteínas se comparó con secuencias obtenidas en NCBI, utilizando el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4.0 MEGA4 (4,16).

Determinación del título viral en sobrenadante de cultivo de células. Para determinar diferencias en el nivel de infectividad y de replicación de los virus utilizados se inocularon células CHSE-214 a una multiplicidad de infección MDI=0.1 en botellas de cultivo de 25 cm² y después de 12, 24, 36 y 45 h de incubación a 15°C las botellas se congelaron y descongelaron en dos ocasiones; el contenido fue centrifugado a 4.000 rpm por 10 min a 4°C y los sobrenadantes se titularon de acuerdo con el método de Reed y Muench (17). Los títulos obtenidos se representaron por el promedio de tres muestras con barra indicadora de desviación estándar.

Detección de inducción de apoptosis en células CHSE-214. Células CHSE-214 con confluencia de 90% en cubreobjetos circulares de vidrio fueron infectadas por triplicado a MDI=10 con cada una de las cepas; tres cubreobjetos no fueron infectados para usarse como control negativo. Después de 8, 12 y 18 h de incubación a 15°C, las muestras se lavaron en PBS pH 7.2 y se fijaron durante 15 min en paraformaldehído al 4%. La apoptosis fue detectada por identificación de la fragmentación de ADN mediante ensayo TUNEL (Terminal Transferase Uridyl Nick End Labelling) de acuerdo a instrucciones del proveedor Apoptosis Detection Kit (USBiological T9162-180), y también por detección de caspasa 3 mediante ensayo inmuno-histoquímico, siguiendo recomendaciones del fabricante del producto Anti-ACTIVE[®] Caspase-3 pAb. Las muestras se analizaron bajo microscopio confocal; el número de células positivas en una muestra de aproximadamente 300 células fue obtenido, y se representó como el promedio de tres muestras independientes \pm error estándar de la media (SEM). Los datos se analizaron mediante test de Friedman, con significancia estadística definida en valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

A 36 horas post-infección (hpi) las tres cepas de virus ocasionaron múltiples focos de efecto citopático (CPE) en las células infectadas; mediante inmunofluorescencia indirecta (IFAT) se demostró la presencia y distribución intracitoplasmática del

Segments of cDNA with a portion of the VP2 and VP5 coding sequence were extracted from the agarose gel according to the instructions of the supplier of the E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit (OMEGA BIO-TEK) and once purified, were sent to be sequenced. The nucleotide sequences obtained were translated using ExPASy and the amino acid sequence deduced of both proteins was compared with sequences obtained from NCBI, using the Molecular Evolutionary Genetics Analysis software version 4.0 MEGA4 (4,16).

Determination of the viral titer in cell culture supernatant. For determining differences in the level of infectivity and replication of the viruses used, CHSE-214 cells were inoculated to a infection multiplicity MDI=0.1 in 25 cm² culture bottles and after 12, 24, 36 and 45 h of incubation at 15°C, the bottles were frozen and thawed twice; the content was centrifuged at 4.000 rpm for 10 min at 4°C and the supernatants were tittered in accordance with the Reed and Muench method (17). The titers obtained were represented by the average of three samples with a standard deviation indicator bar.

Detection of apoptosis induction in CHSE-214 cells. CHSE-214 cells with a confluence of 90% in circular glass coverslips were infected by triplicate at MDI=10 with each of the strains; three coverslips were not infected to be used as negative control. After 8, 12 and 18 h of incubation at 15°C, the samples were washed in PBS pH 7.2 and fixed for 15 min in paraformaldehyde at 4%. Apoptosis was detected by the identification of the DNA fragmentation by TUNEL assay (Terminal Transferase Uridyl Nick End Labeling) according to instructions from the supplier Apoptosis Detection Kit (USBiological T9162-180), and also by detection of caspase 3 by immuno-histochemical assay, following the recommendations of the manufacturer of the product Anti-ACTIVE[®] Caspase-3 pAb. Samples were analyzed under a confocal microscope; the number of positive cells in a sample of approximately 300 cells was obtained, and was represented as the average of three independent samples \pm standard error of the mean (SEM). Data were analyzed by the Friedman test, with statistical significance defined by $p < 0.05$ values.

RESULTS

Thirty-six hours after the infection (hpi), the three virus strains caused multiple cytopathic effect foci (CPE) in infected cells; the presence and intracytoplasmic distribution of the viral antigen (VP3 protein) was diffusely detected by indirect immunofluorescence (IFAT) showing areas of aggregation or inclusion bodies. The detection

antígeno viral (proteína VP3) en forma difusa con áreas de agregación o cuerpos de inclusión. La detección del antígeno fue más tardía en V112/06. Las células sin infectar utilizadas como control negativo no mostraron fluorescencia (Figura 1).

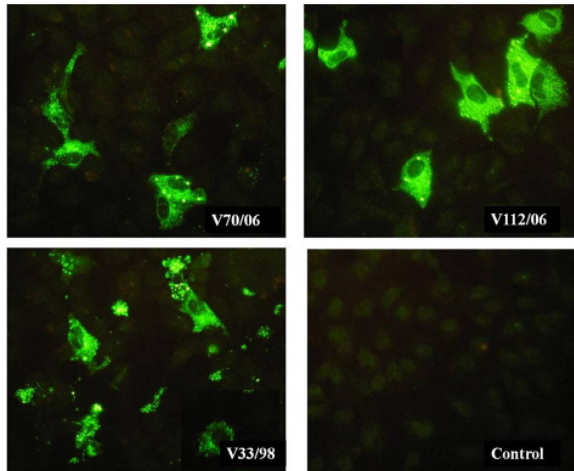


Figure 1. Demonstration of intracytoplasmic expression of the IPNV VP3 protein in CHSE-214 cells infected with the virus V70/06, V112/06 and V33/98. Control, non-infected cells.

Los fragmentos génicos de 1180 y 450 pb, correspondientes a las proteínas VP2 y VP5 de IPNV fueron detectados mediante RT-PCR en las células infectadas con las tres cepas (No mostrado). La secuencia aminoacídica de VP2 fue comparada con la secuencia de las cepas de referencia Sp (Genbank AJ829474) y VR-299 (L40584); la secuencia de las cepas V70/06 (Genbank GU072916) y de V33/98 (Genbank GU072915) correspondieron al genogruppo Sp, con el que presentan porcentajes de identidad de 98 y 96%, respectivamente; la secuencia de la cepa V112/06 (Genbank GU072914) mostró un porcentaje de identidad de 96% con el genogruppo VR-299.

El análisis de la secuencia de VP2 demuestra que los residuos implicados en la virulencia o infectividad de IPNV en la cepa V70/06 correspondieron a Pro-217 y Ala-221; Ala-217 y Thr-221 para V112/06, y finalmente Pro-217 y Thr-221 para V33/98 (Tabla 1).

of the antigen occurred later in V112/06. Non-infected cells used as negative control showed no fluorescence (Figure 1).

The gene fragments of 1180 and 450 pb, corresponding to the VP2 and VP5 proteins of IPNV, were detected by RT-PCR in cells infected with the three strains (not shown). The amino acid sequence of VP2 was compared with the sequence of the Sp (Genbank AJ829474) and VR-299 strains (L40584); the sequence of the V70/06 (Genbank GU072916) and V33/98 strains (Genbank GU072915) corresponded to genogroup Sp, which show identity percentages of 98 and 96%, respectively; the sequence of the V112/06 strain (Genbank GU072914) showed a identity percentage of 96% with genogroup VR-299.

The analysis of the VP2 sequence shows that the residues involved in the virulence or infectivity of the IPNV in the V70/06 strain corresponded to Pro-217 and Ala-221; Ala-217 and Thr-221 for V112/06, and finally Pro-217 and Thr-221 for V33/98 (Table 1).

Regarding VP5, the genes of the three strains showed the four homology domains with Bcl-2, and initiated translation at codon 16. However, the VP5 ORF in V112/06 was 394 pb, coding 131 aa (15 kDa); while in V70/06 and V33/98 the ORF was composed of 351 pb, coding a truncated protein of 116 aa (13 kDa).

The multiple alignment of VP5 sequences of V70/06 (JQ247979), V112/06 (JQ253903) and V33/98 (JQ253902), with the partial sequence of human protein Bcl-2 (P10415) and VP5 of strains E1S, 12 kDa and 15 kDa (10), was similar in BH4, BH1, and BH3 domains. However, the BH2 domain was only complete in V112/06, and partially truncated in V70/06 and V33/98. Residues 115 and 122 of VP5, which are homologous to residues Trp188 and Trp195 of Bcl-2 and that are considered critical to the antiapoptotic function of this protein, were Trp115 and Arg122 for V112/06; while V70/06 and V33/98 only showed Arg115 (Table 2).

Table 1. Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of 60 residues of the hypervariable region of the IPNV VP2 protein. Residues 217 and 221 are shown in yellow, residue 243 characteristic of genotype in blue, residue 247 in green.

Sp	[195]	CTAAIAPRRYEIDLPSQRLPPV	EATG	ALTTLYEGNADIVN	STTVTGD	INFSLAEQ	PAIET	[254]
V70/06	[195]	CTAAIAPRRYEIDLPSQRLPPV	EATG	ALTTLYEGNADIVN	STTVTGD	INFSLAEQ	PAVET	[254]
V33/98	[195]	CTAATAPRRYEIDLPSQRLPPV	EATG	LTLLTYEGNADIVN	STTVTGD	INFSLAEQ	PAVET	[254]
VR-299	[195]	CTAAIAPRRYEIDLPSERLPTVA	AATG	PTTIYEGNADIVN	STAVTGD	TFQLEAEP	VNET	[254]
Jasper	[195]	CTAAIAPRRYEIDLPSERLPTVA	AATG	PTTIYEGNADIVN	STAVTGD	TFQLEAEP	VNET	[254]
V112/06	[195]	CTAAIAPRRYEIDLPSERLPTVA	AATG	PTTIYEGNADIVN	STTVTGD	VFQLAAEP	ANET	[254]
Ab	[195]	CTAAIAPRRYEXDLPSERLPTVA	AATG	PTTIYXGXGDIVN	STTVTGD	ISFSLANN	PTADI	[254]
		****	*****	****	:***.*.***:	**:* * .*****:****:.*.*	:*.* :	

Table 2. Sequence and structural homology of human protein Bcl-2 with protein VP5 of virus V70/06, V112/06, V33/98 and reference strains.

Cepa	BH3	BH1	BH2
Bcl-2 [97]	LRQAGDDF 104 -133	VVEELFRDGVNWGRIVAFFEF 153--184	HLHTW IQDNGGWD-AFVELY [202]
E1S [59]	LRSLGLRK 65 --84	LQMECEPDGTRVVRPVAGDVTG 104--125	HAAGWA-LCPEWDHQQCNLR [143]
12kDa [45]	LRGLRIRK 52 --70	LQMECEPDGAGVVRPVAGDVAG 90-----	-----
15kDa [45]	LRGLRIRK 52 --70	LQMECEPDGAGVVRPVAGDVAG 90--111	HTTGRS-LCSERDAQRCHLR [129]
V70/06 [43]	LRGLRIRK 50 --68	LQMECEPDGAGVVRPVAGDVAG 88--109	HTTGRS-LCS----- [117]
V112/06 [45]	LRGLRIRK 52 --70	LQVESEPDGTGIRPVVGNITG 90--111	EPSRWALLCTQRTDCIHLR [130]
V33/98 [45]	LRGLRIRK 52 --70	LQMECEPDGAGVVRPVAGDVAG 90--111	HTTGRS-L----- [117]
VR299 [60]	LRGLRIRK 67 --85	LQVESEPDGTGIRPVARDVTG 105--126	NPSRWS-VCTQWDPERCHLR [144]

BH4 domain excluded. The residues deemed critical in the apoptosis mechanism of Bcl-2 are shown in blue. Access codes to GenBank for VP5 of IPNV AAK71697 (E1S), AAQ75358 (12 kDa), Q69CI1 (15 kDa), AAA92630 (VR-299), P10415 (human Bcl-2)

Con respecto a VP5, los genes de las tres cepas presentan los cuatro dominios de homología con Bcl-2, e inician la traducción en el codón 16. Sin embargo, el ORF de VP5 en V112/06 fue de 394 pb, codificando 131 aa (15 kDa); mientras que, en V70/06 y V33/98 el ORF estuvo compuesto de 351 pb, codificando una proteína truncada de 116 aa (13 kDa).

El alineamiento múltiple de las secuencias de VP5 de V70/06 (JQ247979), V112/06 (JQ253903) y V33/98 (JQ253902), con la secuencia parcial de la proteína Bcl-2 humana (P10415) y con VP5 de las cepas E1S, 12 kDa y 15 kDa (10), fue similar en los dominios BH4, BH3 y BH1. Sin embargo, el dominio BH2 únicamente fue completo en V112/06, y fue parcialmente truncado en V70/06 y V33/98. Los residuos 115 y 122 de VP5, que son homólogos a los residuos Trp188 y Trp195 de Bcl-2 y que se consideran críticos para la función antiapoptótica de esta proteína, fueron Trp115 y Arg122 para V112/06; mientras que V70/06 y V33/98 solo presentaron Arg115 (Tabla 2).

En general, los títulos virales de las tres cepas se incrementaron conforme se extendió la infección. A las 12 hpi las células infectadas con V70/06 y V112/06 presentaron un título viral \leq a $1 \times 10^{0.66}$ TCID₅₀/mL, mientras que en las infectadas con V33/98 fue de $1 \times 10^{3.5}$. A 24 y 36 hpi, V70/06 presentó mayores títulos que las otras dos cepas, pero a 45 hpi su título fue similar a V33/98 ($1 \times 10^{7.5}$). Los títulos en V112/06 fueron menores a 36 y 45 hpi (Figura 2).

El porcentaje de apoptosis obtenido en las células infectadas con las tres cepas fue similar ($p > 0.05$); no se observó incremento progresivo entre los tiempos analizados, y en ningún caso el porcentaje fue mayor a 12%. En las células infectadas con V70/06, el porcentaje de apoptosis tuvo un incremento entre las 8 y 12 hpi, sin variación posterior (Figura 3). Las células usadas como control negativo, que no fueron infectadas presentaron menor porcentaje de apoptosis con respecto a las muestras infectadas.

In general, the viral titers of the three strains were increased as the infection spread. At 12 hpi, cells infected with V70/06 and V112/06 showed a viral titer $\leq 1 \times 10^{0.66}$ TCID₅₀/mL, while in those infected with V33/98 it was $1 \times 10^{3.5}$. At 24 and 36 hpi, V70/06 showed more titers than the other two strains, but at 45 hpi its titer was similar to V33/98 ($1 \times 10^{7.5}$). The titers in V112/06 were lower at 36 and 45 hpi (Figure 2).

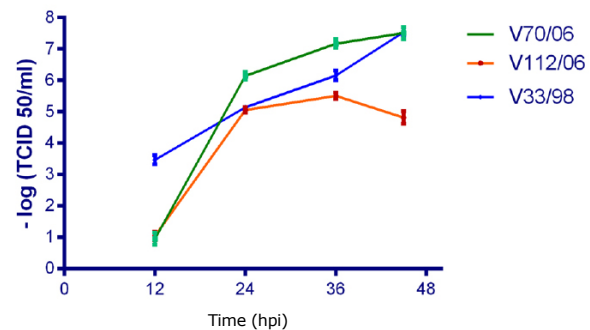


Figure 2. Viral titers associated with cultures of CHSE-214 cells infected with IPNV strains at MOI=0.1; expressed as TCID₅₀/ml.

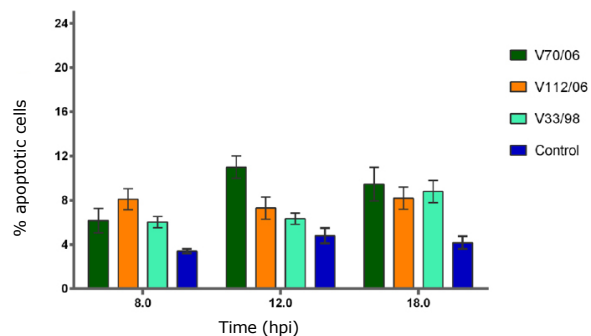


Figure 3. Percentage of apoptotic cells after infection with IPNV at MOI=10, evaluated by TUNEL assay.

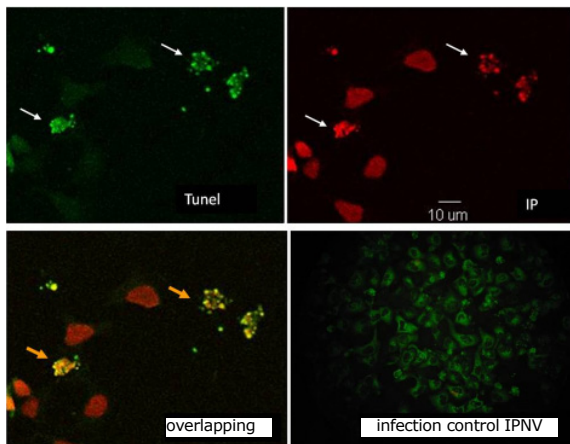


Figure 4. Confocal microscopy pictures for apoptosis detection by TUNEL assay. The dUTP-FITC is observed as fluorescent green and the propidium iodide as fluorescent red. The overlapping image indicates positive TUNEL cells (arrow). Bar 10 μ m.

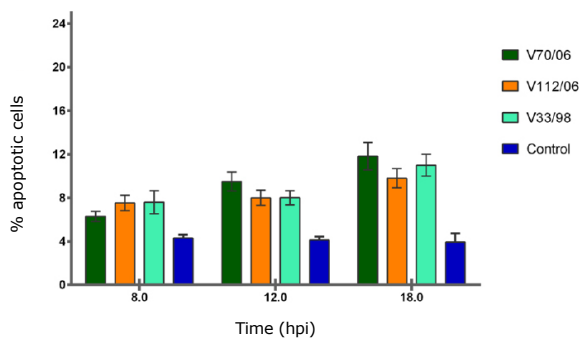


Figure 5. Percentage of cells in apoptosis after infection with IPNV at MOI=10, evaluated by detection of caspase 3.

La figura 4 representa muestras positivas a la reacción del ensayo TUNEL y células positivas a la infección por IPNV.

El perfil de activación de caspasa 3 evaluado mediante inmuno-ensayo (Figura 5) fue similar entre las tres cepas; pese a que a las 18 hpi es posible observar un ligero incremento con respecto a la lectura anterior, no se mostraron diferencias entre los tiempos evaluados (Figura 6), y el porcentaje de células en apoptosis no sobrepasó el 12% en los tiempos analizados ($p > 0.05$).

DISCUSIÓN

Varios productos de genes de virus ARN que afectan peces han sido reportados como reguladores de apoptosis (14); debido a que la proteína VP5 de IPNV presenta cuatro dominios de homología con proteínas de la subfamilia Bcl-2 (BH) de actividad antiapoptótica, se ha sugerido que durante su

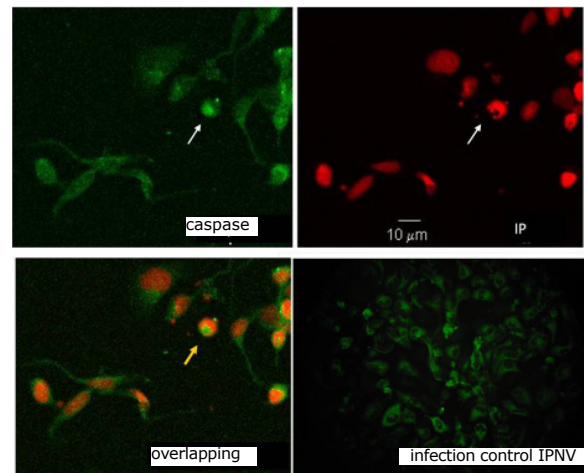


Figure 6. Confocal microscopy pictures for detection of caspase 3 in CHSE-214 cells infected with isolates of IPNV V70/06, V112/06 and V33/98. The anti-caspase 3 antibody is shown in fluorescent green and the propidium iodide in fluorescent red. The orange coloration of the overlapping images (Arrows) indicates cells positive to apoptosis. Bar 10 μ m.

The percentage of apoptosis obtained in cells infected with the three strains was similar ($p > 0.05$); there was no gradual increase between the times analyzed, and in any case the percentage was not greater than 12%. In cells infected with V70/06, the percentage of apoptosis increased between 8 and 12 hpi, without further variation (Figure 3). Cells used as negative control and not infected showed a lower percentage of apoptosis with respect to infected samples.

Figure 4 shows positive samples to the reaction of the TUNEL assay and positive cells to the IPNV infection.

The activation profile of caspase 3 examined by immunoassay (Figure 5) was similar among the three strains; despite the fact that at 18 hpi it is possible to observe a slight increase with respect to the previous reading, there were no differences between evaluated times (Figure 6), and the percentage of cells in apoptosis did not exceed 12% in the analyzed times ($p > 0.05$).

DISCUSSION

Several products of RNA virus genes affecting fish have been reported as regulators of apoptosis (14); since that VP5 protein of IPNV has four homology domains with proteins of the subfamily Bcl-2 (BH) with antiapoptotic activity, it has

replicación el virus podría inhibir la apoptosis para multiplicarse.

En este estudio, la proteína VP5 de las cepas utilizadas presentaron los cuatro dominios BH que son característicos de proteínas antiapoptóticas tipo Bcl-2. Sin embargo, el dominio BH2 que es considerado crítico para la actividad antiapoptótica fue truncado en V70/06 y V33/98, y fue completo en la cepa V112/06; pese a esto, no se observaron diferencias en el nivel de inducción de apoptosis entre las cepas, y el promedio no superó el 12% en los tiempos evaluados. Esto indica que el tamaño de VP5 no influye en la inducción de apoptosis, y está acorde con lo reportado por Santi et al (10), quienes observaron que IPNV puede inducir apoptosis independientemente del tamaño y expresión de la proteína VP5. Una situación similar se ha reportado con el virus de la peste porcina africana que contiene una proteína homóloga al inhibidor de apoptosis de baculovirus (IAP) que no es necesaria para el crecimiento viral *in vitro*, no modula la virulencia y tampoco influye en la inducción de apoptosis.

Como posible explicación a lo anterior, Cuconati y White (18), indicaron que algunas proteínas Bcl-2 virales pueden tener actividad antiapoptótica aun careciendo de alguno de los dominios BH, pero que el dominio BH2 es elemento clave para heterodimerizar con los promotores de muerte BAX y BAK. Para el caso de IPNV, dicha interacción se realizaría a través del residuo Trp155 de VP5 que correspondería al residuo Trp188 de Bcl-2, que es considerado un residuo crítico para cumplir la función anti-apoptótica; de acuerdo con esto, las cepas que expresan Trp-155 en VP5 deberían inhibir la apoptosis. En este sentido, Santi et al (10), propusieron que el hecho de no observar diferencias en el nivel de inducción entre las cepas de IPNV utilizadas en su estudio, pudo deberse a la ausencia del residuo Trp155. Sin embargo, pese a que en el presente estudio, VP5 de V112/06 presentó el residuo Trp-115 en BH2, no mostró diferencia de inducción con respecto a las otras cepas, por lo que la secuencia o sustitución de este residuo no es un factor crítico en la modulación de apoptosis.

El resultado obtenido en este estudio mostró que la proteína VP5 de IPNV no participaría en la modulación de apoptosis, contrario a lo observado en la infección con el virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV), que codifica una proteína homóloga que contiene una región transmembrana, pero carece de dominios de homología con Bcl-2, presenta un dominio PEST que usualmente está presente en proteínas de vida corta y de expresión temprana que cumplen actividad reguladora (19). Durante la replicación de IBDV, VP5 se acumula en la membrana celular,

been suggested that during replication the virus could inhibit the apoptosis to permit the viral replication.

In this study, the VP5 protein of the strains used showed the four BH domains characteristic of Bcl-2 antiapoptotic proteins. However, the BH2 domain, which is considered critical to the antiapoptotic activity, was truncated at V70/06 and V33/98, and was complete in the V112/06 strain; despite this, there were no differences in the induction level of apoptosis between strains, and the average did not exceed 12% in the times evaluated. This indicates that the size of VP5 has no influence on the induction of apoptosis and is consistent with what was reported by Santi et al (10), who observed that IPNV may induce apoptosis regardless of the size and expression of the VP5 protein. A similar situation has been reported with the virus of the African swine fever that contains a homologous protein to the inhibitor of apoptosis of baculovirus (IAP) that is not necessary for *in vitro* viral growth, does not modulates virulence and has no influence on the induction of apoptosis.

As a possible explanation for the above, Cuconati and White (18), pointed out that certain viral Bcl-2 proteins may have antiapoptotic activity even lacking some of the BH domains, but that the BH2 domain is a key element for heterodimerization with the BAX and BAK death promoters. In the case of IPNV, this interaction would take place through the residue Trp155 of VP5 that would correspond to residue Trp188 of Bcl-2, considered a critical residue for fulfilling the antiapoptotic function; accordingly, strains that express Trp-155 in VP5 should inhibit apoptosis. In this regard, Santi et al (10) proposed that the fact of not observing differences in the induction level among IPNV strains used in her study, could be due to the absence of the Trp155 residue. However, although in the present study the VP5 of V112/06 showed the Trp-115 residue in BH2, there was no difference in terms of induction with respect to other strains, so the sequence or substitution of this residue is not a critical factor in the modulation of apoptosis.

The results obtained in this study showed that the IPNV VP5 protein would not participate in the modulation of apoptosis, contrary to what was observed in the infection with the infectious bursa disease virus (IBDV), that encodes a homologous protein containing a transmembrane region, but lacks homology domains with Bcl-2, shows a PEST domain that is usually present in short-lived and early-expression proteins that fulfill regulatory

altera su morfología y provoca ruptura posterior, actuando como factor de muerte permitiendo la liberación de su progenie (12, 20, 21).

La implicación de la proteína VP2 en la virulencia o infectividad de IPNV, está asociada a su secuencia aminoacídica; cepas que presentan los residuos Thr-217 y Ala-247 producen mayor título viral durante un ciclo de replicación, y se consideran de mayor virulencia (4). En este estudio, se observó que la infectividad de las cepas utilizadas no tuvo relación con el nivel de inducción de apoptosis en células CHSE-214; las cepas V70/06 y V33/98 correspondieron a cepas de virulencia media por presentar los residuos Pro-217 y Ala-247, y Pro-217 y Thr221 respectivamente, mientras que en V112/06 la secuencia fue Ala-217 y Ala-247, relacionada a cepas avirulentas (4). Pese a que en general las curvas de replicación de las tres cepas mostraron un patrón similar de crecimiento, V112/06 produjo títulos menores, confirmándose como una cepa de menor infectividad.

El porcentaje de apoptosis obtenido mediante pruebas de TUNEL e inmunoreacción no indica diferencias en las células infectadas con las cepas V70/06 y V33/98 de genotipo Sp y la cepa V112/06 de genotipo VR-299, evidenciando que el genotipo de la cepa no tiene relación con esta forma de muerte. Se ha indicado que el genoma dsRNA de IPNV puede desencadenar apoptosis por activación de la vía PKR que inhibe la traducción de proteínas celulares, y por la vía RNasa L que degrada los mRNA (22-24); más recientemente, Chiu et al (25), observaron que la proteína VP3 induce la expresión de *BAD* estimulando apoptosis a través de la vía mitocondrial. Estas aseveraciones respaldarían el hecho de que la apoptosis observada durante la infección por IPNV puede desarrollarse por razones independientes a las características de la cepa involucrada en la infección (14, 26). En respaldo a lo anterior, Imajoh et al (14), informa que células de *Salmo salar* positivas a la infección por IPNV, frecuentemente no expresan esta forma de muerte; sugiriendo que la apoptosis corresponde a un proceso de suicidio autónomo para eliminar células infectadas impidiendo la diseminación viral.

Tras infectar células CHSE-214 con IPNV serotipo Ab, considerado de baja virulencia con respecto de cepas Sp y VR-299, Hong y Wu (27), determinaron que la apoptosis se relaciona con expresión del gen de muerte *BAD*, como factor temprano de estrés, inducido a través de receptores de tipo TNF. En relación a esto, Espinoza et al (13) proponen que si la apoptosis es iniciada vía receptor, el serotipo viral no influye en la activación del proceso. Esta propuesta concuerda con lo observado en este estudio, donde no se muestran diferencias en el promedio de apoptosis obtenido en las células

actividades (19). During the replication of IBDV, VP5 accumulates in the cell membrane, alters its morphology and causes subsequent rupture, acting as death factor allowing the release of its progeny (12, 20, 21).

The involvement of the VP2 protein in the virulence or infectivity of IPNV is associated with its amino acid sequence; strains that show Thr-217 and Ala-247 residues produce more viral titer during a replication cycle, and are considered of greater virulence (4). In this study, it was observed that the infectivity of the strains used was unrelated to the induction level of apoptosis in CHSE-214 cells; strains V70/06 and V33/98 corresponded to average virulence strains by having the residues Pro-217 and Ala-247, and Pro-217 and Thr221 respectively, while in V112/06 sequence was Ala-217 and Ala-247, related to avirulent strains (4). While overall the replication curves of the three strains showed a similar growth pattern, V112/06 produced less titers, confirming it as a strain with lower infectivity.

The percentage of apoptosis obtained through TUNEL and immunoreaction assay does not show differences in cells infected with the strains V70/06 and V33/98 of the Sp genotype and strain V112/06 of genotype VR-299, evidencing that the genotype of the strain is not related to this form of cell death. It has been indicated that the IPNV dsRNA genome can trigger apoptosis by the activation of the PKR pathway that inhibits the translation of cellular proteins, and the RNase L pathway that degrades the mRNA (22-24); more recently, Chiu et al (25), observed that the VP3 protein induces the expression of *BAD* stimulating apoptosis through the mitochondrial pathway. These assertions would support the fact that apoptosis observed during infection by IPNV may develop for independent reasons from the characteristics of the strain involved in the infection (14, 26). In support of the foregoing, Imajoh et al (14) reports that *Salmo salar* cells positive to IPNV infection do not frequently express this form of death; suggesting that apoptosis corresponds to an autonomous suicide process for eliminating infected cells preventing the viral spread.

After infecting CHSE-214 cells with Ab serotype IPNV, considered of low virulence with respect to Sp and VR-299 strains, Hong and Wu (27) determined that apoptosis is related with the expression of the *BAD* death gene, as an early stress factor induced through TNF receptors. In relation to this, Espinoza et al (13) propose that if apoptosis is initiated via the receptor,

infectadas con las cepas V70/06 y V33/98 de serotipo Sp y la cepa V112/06 de serotipo VR-299. No obstante, se desconoce el receptor que pudiera modular el proceso.

Tomando en cuenta que la apoptosis es un mecanismo de defensa temprano, el nivel obtenido con las tres cepas de este estudio hace evidente que IPNV es pobre inductor de este mecanismo de muerte, lo que concuerda con Espinoza et al (13), quienes observaron que el porcentaje de células apoptóticas fue menor de 12%, mientras que a 15 hpi el 75 % de la población celular presentó necrosis; los resultados también están de acuerdo con lo reportado por Hong y Wu (27), que observaron que aunque prácticamente todas las células fueron positivas a la infección, sólo un bajo porcentaje desarrolló apoptosis.

En el presente estudio, se observó que el porcentaje de apoptosis obtenido durante la infección no tuvo relación con la presencia del residuo Trp-155 en la secuencia del dominio BH2 de IPNV; este resultado concuerda con investigaciones que indican que la apoptosis ocurre independientemente de la presencia o secuencia de algunos péptidos virales que tienen homología con Bcl-2 (14, 18, 26). Asimismo, en razón a que ni las diferencias en la secuencia de VP2 y VP5, ni la longitud de esta última influyen en el grado de apoptosis, probablemente otras variables como el tipo de tejido y la susceptibilidad de hospedero tendrían mayor relevancia, como se ha observado en caso de ISAV (28). Sin embargo, falta determinar la real participación de los componentes virales en la inducción de esta forma de muerte celular y en la patogénesis.

En conclusión las diferencias en la secuencia de BH2 de la proteína VP5, la infectividad y en la secuencia de la proteína VP2 no están asociadas con la modulación de apoptosis.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) proyecto 99736 y proyecto PROMEP 103.5/09/4196; a la Escuela de Graduados y el Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática del Instituto de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile.

the viral serotype does not affect the activation of the process. This proposal is consistent with that observed in this study, where there are no differences in the average of apoptosis obtained in cells infected with V70/06 and V33/98 Sp serotype and V112/06 VR-299 serotype strains. However, the receptor that could modulate the process is unknown.

Taking into account that apoptosis is an early defense mechanism, the level obtained with the three strains of this study evidences that IPNV is a poor inducer of this death mechanism, which is consistent with Espinoza et al (13), who observed that the percentage of apoptotic cells was less than 12%, while at 15 hpi 75% of the cell population showed necrosis; the results are also consistent with that reported by Hong and Wu (27), who observed that although practically all cells were positive to the infection, only a low percentage developed apoptosis.

In this study it was observed that the percentage of apoptosis during infection was unrelated to the presence of the Trp-155 residue in the sequence of the IPNV BH2 domain; this result is consistent with researches indicating that apoptosis occurs irrespective of the presence or sequence of certain viral peptides with Bcl-2 homology (14, 18, 26). Likewise, since neither the differences in the VP2 and VP5 sequence nor the length of the latter influence the degree of apoptosis, probably other variables such as the type of tissue and host susceptibility would have greater relevance, as observed in the case of ISAV (28). However, the actual participation of the viral components in the induction of this form of cell death and pathogenesis is yet to be determined.

In conclusion, differences in the BH2 sequence of the VP5 protein and the infectivity in the sequence of the VP2 protein are not associated with the modulation of apoptosis.

Acknowledgements

To The National Science and Technology Council (Conacyt) project 99736 and project PROMEP 103.5/09/4196; to the Graduate School and the Biotechnology and Aquatic Pathology Laboratory of the Animal Pathology Institute, Faculty of Veterinary Sciences of Universidad Austral de Chile.

REFERENCES

1. Roberts R, Pearson M. Infectious Pancreatic Necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Dis 2005; 28:383-389.
2. Bruslind L, Reno P. Virulence Comparison of Three Buhl-Subtype Isolates of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Brook Trout Fry. JAAH 2000; 12:301-315.
3. Shivappa R, Song H, Yao K, Aas-Eng A, Evensen Ø, Vakharia V. Molecular characterization of Sp serotype strains of infectious pancreatic necrosis virus exhibiting differences in virulence. Dis Aquat Org 2004; 61:23-32.
4. Song H, Santi N, Evensen Ø, Vakharia V. Molecular Determinants of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Virulence and Cell Culture Adaptation. J Virol 2005; 79:10289-10299.
5. Hong J, Hsu Y, Wu J. Infectious pancreatic necrosis virus induces apoptosis due to down-regulation of survival factor MCL-1 protein expression in a fish cell line. Virus Res 1999; 63:75-83.
6. Santi N, Song H, Vakharia V, Evensen Ø. Infectious Pancreatic Necrosis Virus VP5 Is Dispensable for Virulence and Persistence. J Virol 2005; 79:9206-9216.
7. Sano M, Okamoto H, Fukuda H, Saneyoshi M, Sano T. Virulence of infectious pancreatic necrosis virus is associated with the larger RNA segment (RNA segment A). J Fish Dis 1992; 15:283-293.
8. Hong J, Gong H, Wu J. IPNV VP5, a Novel Anti-apoptosis gene of the Bcl-2 Family, Regulates Mcl-1 and Viral Protein Expression. Virol 2002; 295:217-229.
9. Weber S, Fichtner D, Mettenleiter T, Mundt E. Expression of VP5 of infectious pancreatic necrosis virus strain VR299 is initiated at the second in-frame start codon. J Gen Virol 2001; 82:805-812.
10. Santi N, Sandtrø A, Sindre H, Song H, Hong J, Thu B, Wu J, Vakharia V, Evensen Ø. Infectious Pancreatic Necrosis Virus induces apoptosis *in vitro* and *in vivo* independent of VP5 expression. Virol 2005; 342:13-25.
11. Hong J, Lin T, Hsu Y, Wu J. Apoptosis Precedes Necrosis of Fish Cell Line with Infectious Pancreatic Necrosis Virus Infection. Virol 1998; 250:76-84.
12. Galloux M, Libersou S, Morellet N, Bouaziz S, Da Costa B, Ouldali M, Lepault J, Delmas B. Infectious Bursal Disease Virus, a Non-enveloped Virus, Possesses a Capsid-associated peptide That Deforms and Perforates Biological Membranes. J Biol Chem 2007; 282:20774-20784.
13. Espinoza J, Cortés M, Kuznar J. Necrosis of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) infected cells rarely is preceded by apoptosis. Virus Res 2005; 109:133-138.
14. Imajoh M, Hirayama T, Oshima S. Frequent occurrence of apoptosis is not associated with pathogenic Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) during persistent infection. Fish Shellfish Immunol 2005; 18:163-177.
15. O'Brien V. Viruses and Apoptosis. J Gen Virol 1998; 79:1833-1845.
16. Ortega C, Rodríguez S, de las Heras A, Romero A, Monrás M, Enríquez R. Evaluation of the level of Mx3 protein synthesis induced by infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strains of different infectivity. Vet Immunol Immunopathol 2011; 141:190-200.
17. Reed J, Muench H. A simple method for estimating fifty percent end points. Am J Hyg 1938; 27:493-497.
18. Cuconati A, White E. Viral homologs of BCL-2: role of apoptosis in the regulation of virus infection. Genes & Dev 2002; 16:465-2478.
19. Liu M, Vakharia V. Nonstructural Protein of Infectious Bursal Disease Virus Inhibits Apoptosis at the Early Stage of Virus Infection. J Virol 2006; 80:3369-3377.
20. Lombardo E, Maraver A, Espinosa I, Fernández-Arias A, Rodríguez J. VP5, the Nonstructural Polypeptide of Infectious Bursal Disease Virus, Accumulates within the Host Plasma Membrane and Induces Cell Lysis. Virol 2000; 277:345-357.
21. Brandt M, Yao K, Liu M, Heckert R, Vakharia V. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. J Virol 2001; 75:11974-11982.
22. Wolf K. Fish viruses and fish viral diseases. Ithaca, N.Y. Canstock Publishing Associates-Cornell University Press, 1988.

23. Lyles D. Cytopathogenesis and Inhibition of Host Gene Expression by RNA Viruses. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64:709-724.
24. Robertsen B. The interferon system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol* 2006; 20:172-191.
25. Chiu CL, Chou YL, Wu JL, Hong JR. Aquatic birnavirus capsid protein, VP3, induces apoptosis via the Bad-mediated mitochondria pathway in fish and mouse cells. *Apoptosis* 2010; 15:653-668.
26. Eléouet J, Druésne N, Chilmonczyk S, Momge D, Dorson M, Delmas B. Comparative Study of In-situ Cell Death Induced by the Viruses of Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) and Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) in rainbow trout. *J Comp Pathol* 2001; 124:300-307.
27. Hong J, Wu J. Induction of apoptotic death in cells via *Bad* gene expression by Infectious pancreatic necrosis virus infection. *Cell. Death Differ* 2002; 9:113-124.
28. Joseph T, Cepica A, Brown L, Ikede B, Kibenge F. Mechanism of cell death during infectious salmon anemia virus infection is cell type-specific. *J Gen Virol* 2004; 85:3027-3036.