



Norwegian University  
of Life Sciences

# Karakterisering av **PISCINE MYOCARDITIS VIRUS (PMCV)**

Aase B. Mikalsen

Norges miljø og biovitenskapelige universitet

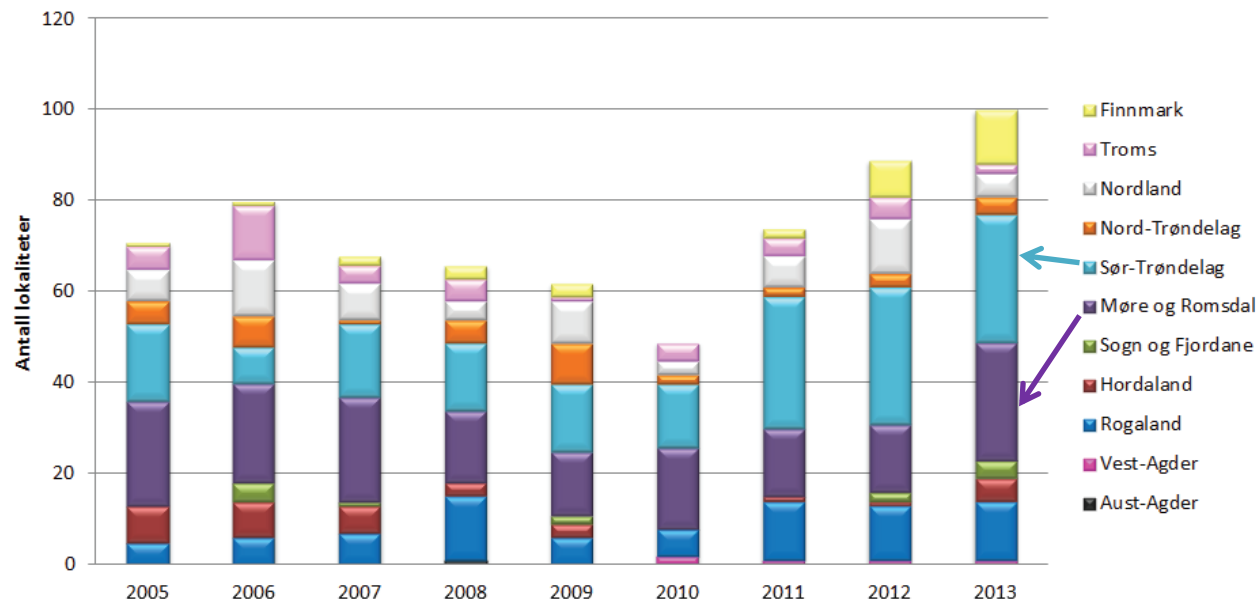
# CMS

## Introduksjon

### Kardiomyopatisyndrom/Cardiomyopathy syndrome (CMS)

- «Hjertesprekk»
- Rammer stor og slaktemoden fisk
- Beskrevet som sykdom hos Atlantisk laks siden 1985
- Også beskrevet i Scotland, på Færøyene og i Canada

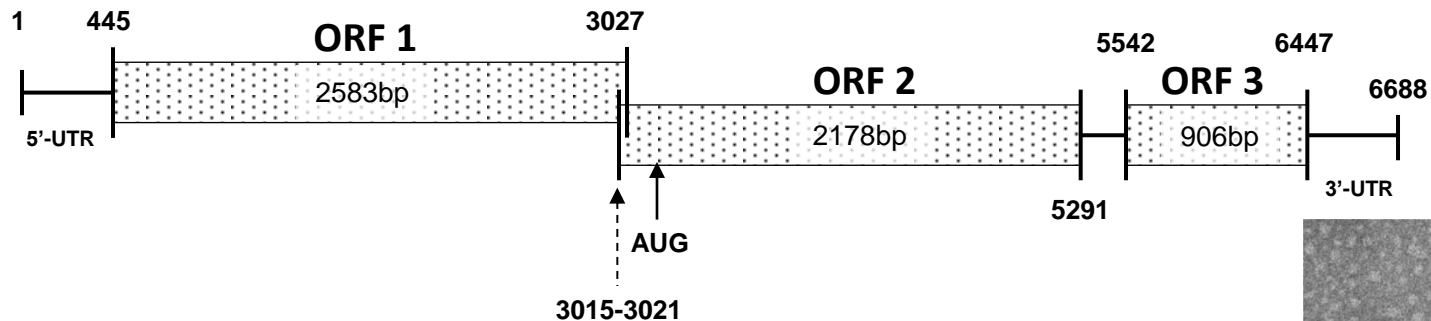
#### Fylkesvis fordeling av CMS 2005 – 2013:



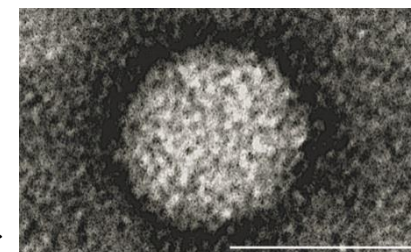
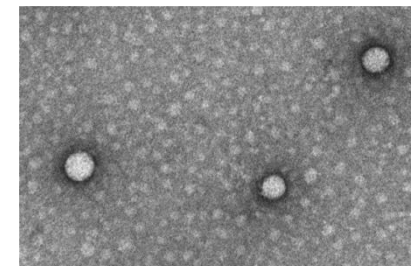
## CMS

# Piscine myocarditis virus (PMCV)

- Dobbeltrådet RNA genom
- 6688bp
- Tre mulige proteinkodende leserammer



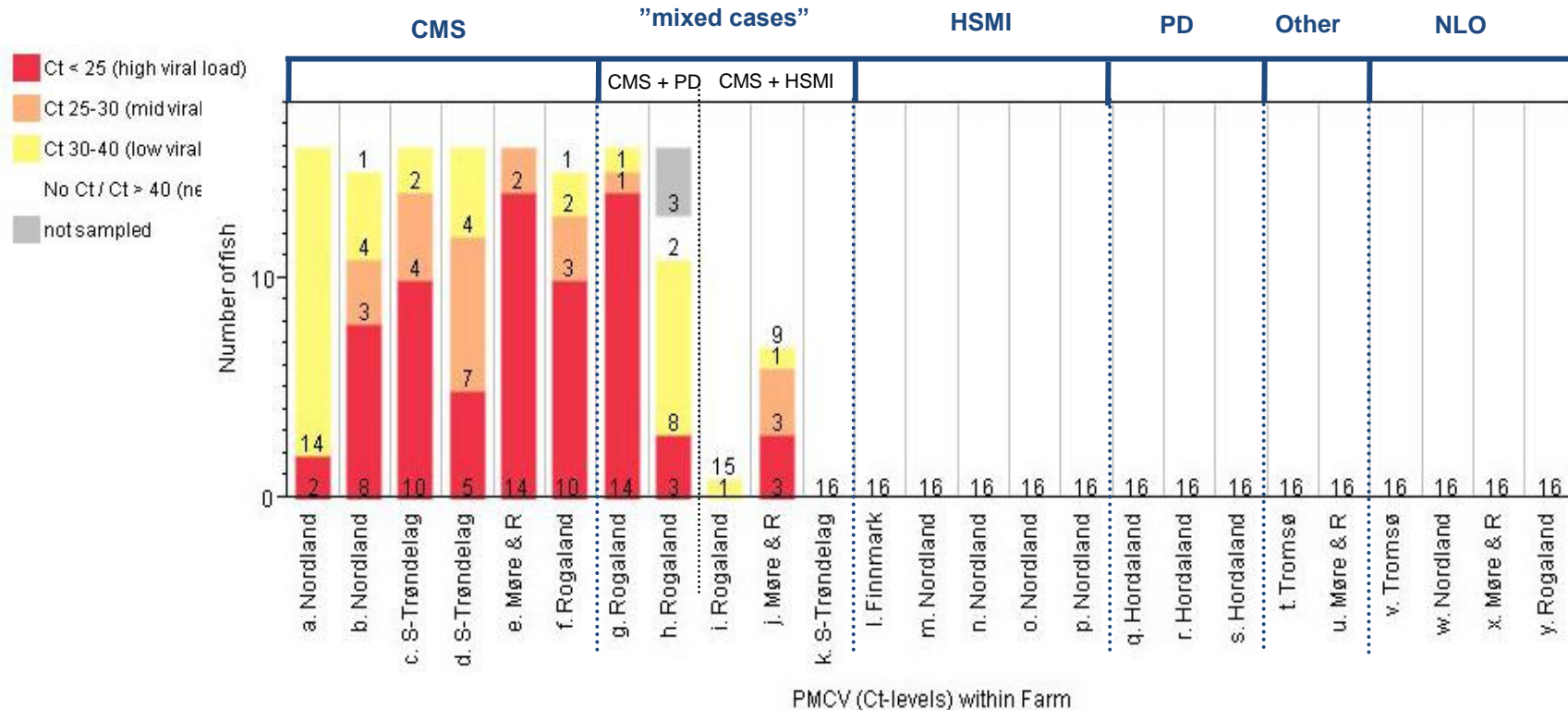
- Bare sekvensen fra ORF2 gav signifikant likhet med andre virus
  - RNA dependent RNA polymerase (RdRp) hos virus i *Totiviridae*-familien
- Tetthet og diameter av viruspartikler samsvarer med *Totiviridae*



Elektronmikroskopi av PMCV⇒

# Piscine myocarditis virus (PMCV)

## Deteksjon i felt (Case control study)



- PMCV påvises i alle lokaliteter med entydig CMS-diagnose
- PMCV påvises ikke i lokaliteter uten CMS-diagnose
- PMCV påvises i varierende grad i 4 av 5 lokaliteter med blandet diagnose
- Tilstedeværelse av PMCV er tydelig korrelert med CMS-forandringer

## Piscine myocarditis virus (PMCV)

# Deteksjon i felt (Case control study)

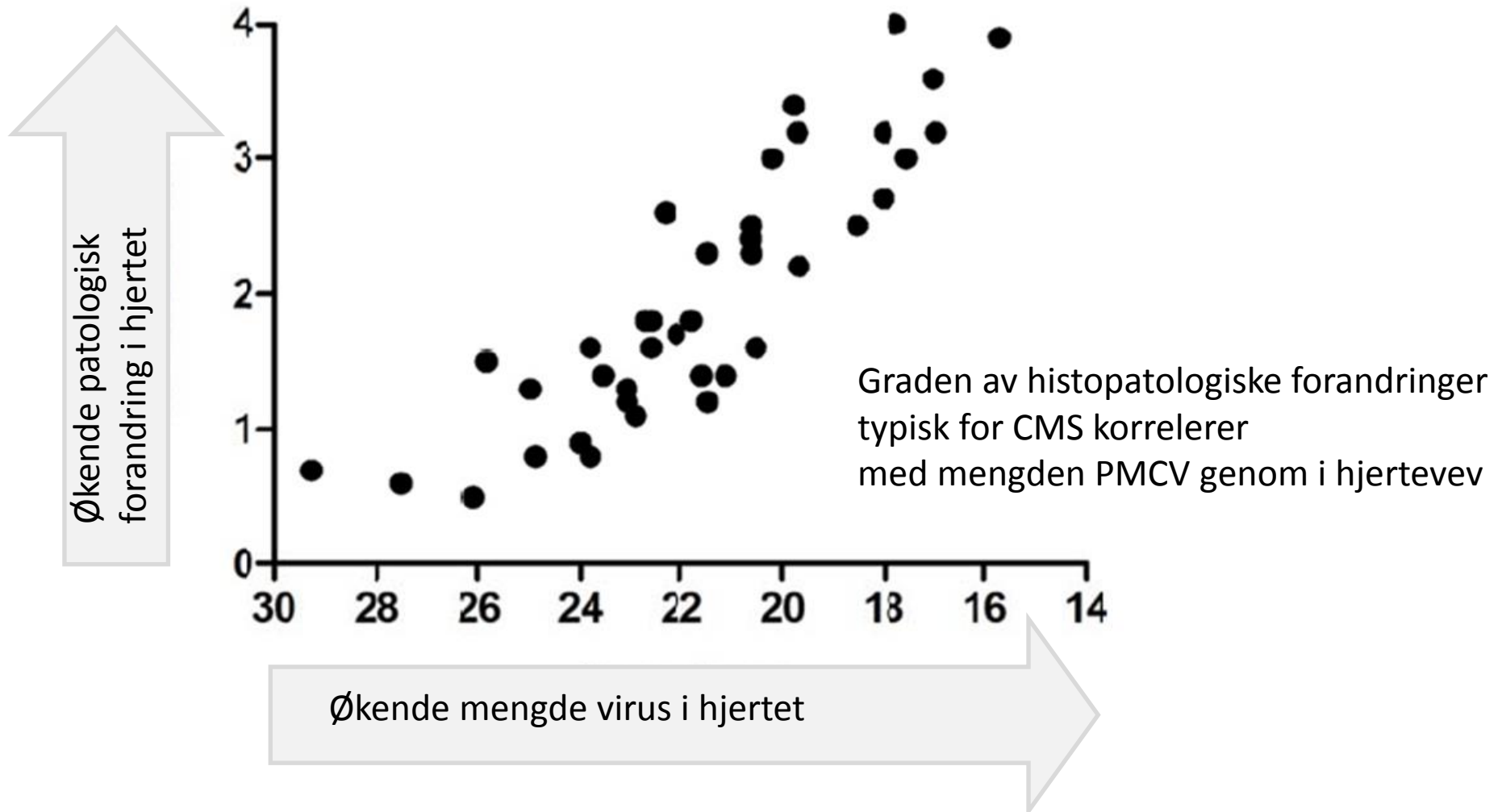
Atlantic salmon calici virus (ASCV)  
Nytt calicivirus med høy prevalens i  
norsk Atlantisk laks i oppdrett  
- Mikalsen et al. PlosOne Sept. 2014

	County	Main diagnosis	#Pos PMCV	# Pos PRV	#Pos SAV3	# Pos ASCV
1	Rogaland	CMS	10 / 10	10 / 10	0 / 10	1 / 10
2	Nordland	CMS	9 / 10	10 / 10	0 / 10	3 / 10
3	Møre & Romsdal	CMS	10 / 10	2 / 10	0 / 10	8 / 10
4	Møre & Romsdal	CMS	10 / 10	10 / 10	0 / 10	6 / 10
6	Sør-Trøndelag	CMS	10 / 10	10 / 10	0 / 10	7 / 10
7	Sør-Trøndelag	CMS	10 / 10	10 / 10	0 / 10	1 / 10
11	Rogaland	CMS/PD/HSMI?	8 / 10	10 / 10	9 / 10	4 / 10
15	Nordland	HSMB	0 / 10	10/10	0 / 10	0 / 10
20	Hordaland	PD	0 / 10	10 / 10	6 / 10	4 / 10

- PMCV påvises i alle lokaliteter med entydig CMS-diagnose
  - Med andre virus som PRV og ASCV
  - I anlegg med blandingsdiagnose sammen med PRV, SAV3 og ASCV

## Piscine myocarditis virus (PMCV)

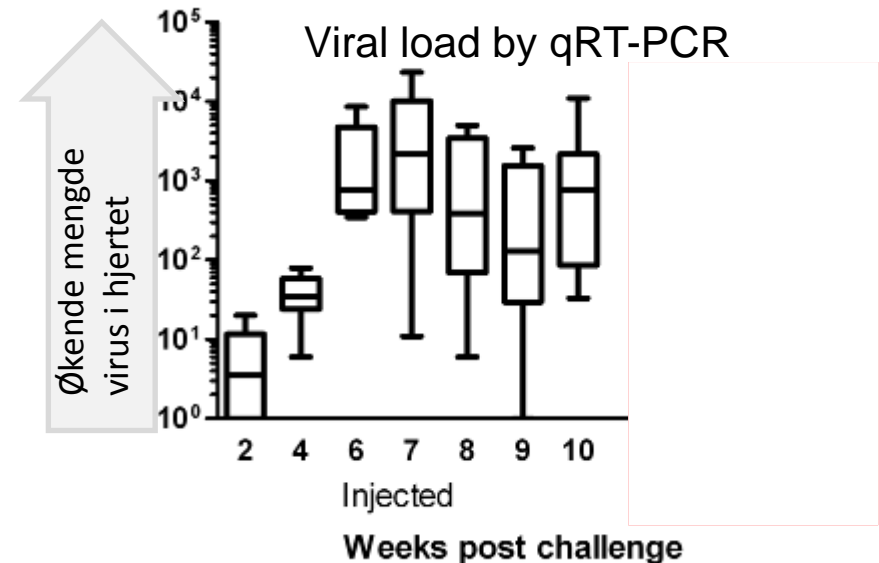
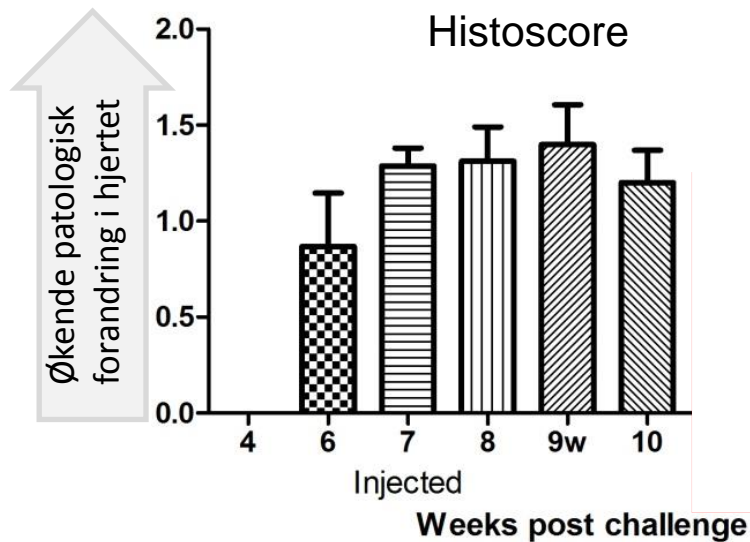
## Deteksjon i CMS typisk hjertevev



# Piscine myocarditis virus (PMCV)

## Smitteforsøk

- Eksperimentell smitte av laks med PMCV gir typisk CMS hjertepatologi
- Økning i mengden virus i hjertevevet er sammenfallende med utviklingen i graden av patologi
- Virus horisontalt overført fra injisert fisk til kohabitantfisk



# Piscine myocarditis virus (PMCV)

## Pågående karakterisering

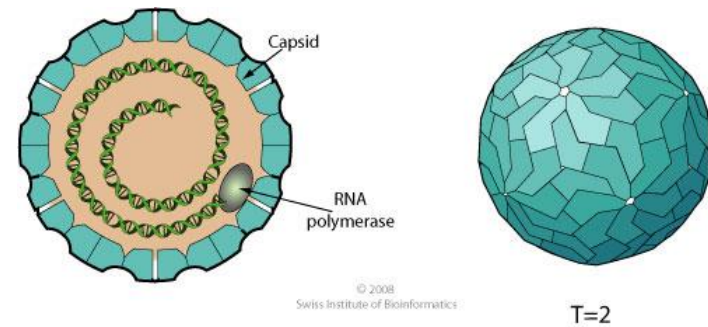
Innledende arbeid for utvikling av verktøy for karakteriseringen

- Revers genetikk system
  - virus av en enkelt presist definert genotype kan genereres fra en nukleinsyrevektor i cellekultur
  - muligheter for manipulering på nukleotid- og aminosyre-nivå
  - verktøy for studier av proteinfunksjon og infeksjonsmekanismer/vert-patogeninteraksjoner
- ORF1, 2 og 3 tilgjengelig i forskjellige vektorer for uttrykk av proteinene i eukaryote og bakterielle systemer med/uten tag for deteksjon
- Antistoff mot proteinene PMCV koder for
  - har flere tilgjengelige mot ORF1 (kappeprotein)
  - ORF3 i produksjon...



# Totiviridae

- ekspanderende familie av dsRNA virus



- «Nakne» viruspartikler med et enkelt kappeprotein (capsid protein; CP)
- Består av virus som persistent infiserer encellede parasitter og sopp

– Fem registrerte genera:

- *Totivirus* (Sopp)
  - *Giardavirus* (*Giardia lamblia* protozoa)
  - *Leishmanivirus* (*Leishmania* protozoa)
  - *Victorivirus* (Sopp)
  - *Trichomonasvirus* (*Trichomonas vaginalis* protozoa)
- 
- “Nye” og mer komplekse totivirus har blitt funnet
    - Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus - IMNV (Shrimp)<sup>Poulos et al. 2006</sup>
    - *Armigeres subalbatus* totivirus – AsTV (Mosquito)<sup>Zhai et al. 2010</sup>
    - *Drosophila melanogaster* totivirus – DTV (Common fruit fly)<sup>Wu et al. 2010</sup>
    - **Piscine myocarditis virus – PMCV (Atlantic salmon)** <sup>Haugland et al. 2011</sup>

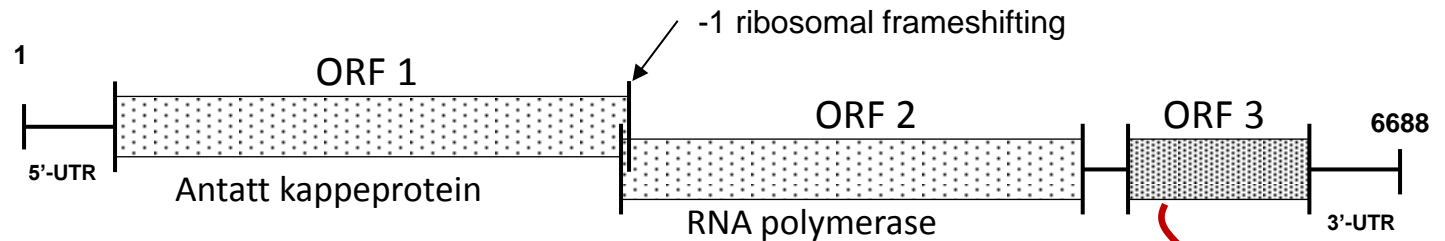
**Infiserer leddyr**  
Foreslått genus:  
Artivirus  
(fra Arthropod  
totivirus)

Første potensielle medlem av  
*Totiviridae* som infiserer en vertebrat vert

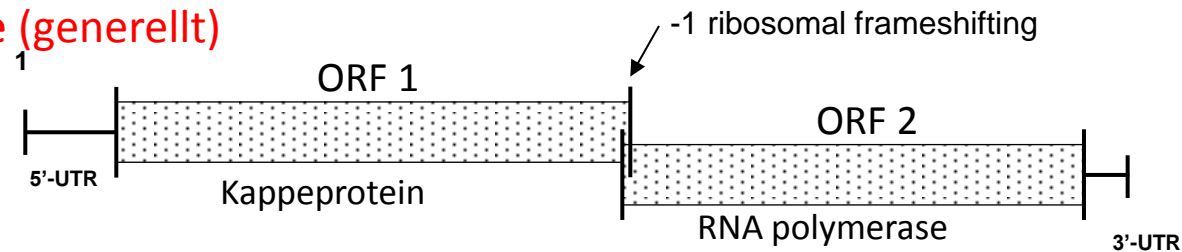
# Piscine myocarditis virus (PMCV)

## Pågående karakterisering – ORF3

PMCV

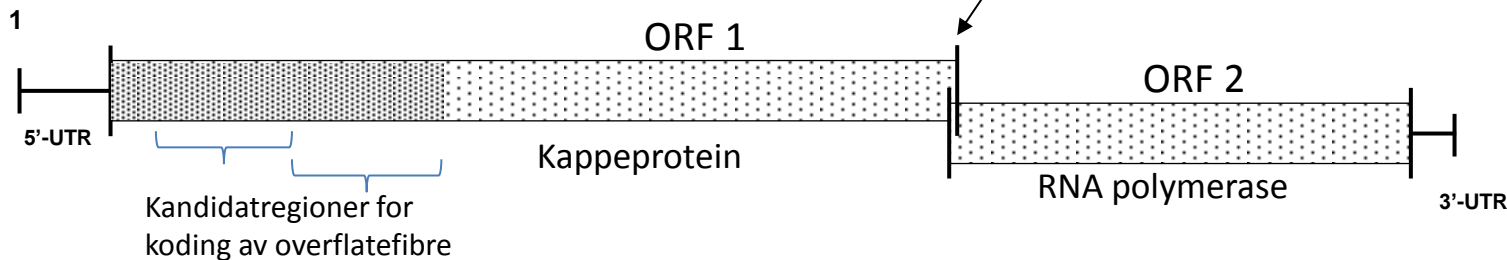


Totiviridae (generellt)



ORF3 protein  
Del av viruspartikkel  
eller kun lokalisert  
i cellen ved infeksjon?

IMNV



# Piscine myocarditis virus (PMCV)

## Pågående karakterisering

- Viktig å få bekreftet rollen til alle proteinene viruset koder for
  - Forstå virusets interaksjon med verten
  - Optimal vaksineutvikling (design av vaksine, valg av komponenter etc)
- ORF1 – trolig kappeprotein, støttes av
  - Posisjon i genom, størrelse, genetiske karakteristikker etc
  - ORF1 uttrykt i et baculovirussystem i insektceller viser at ORF1 uttrykt alene gir viruslignende partikler<sup>pers. komm. Marit Rode/Pharmaq</sup>
- ORF2 – trolig RNA avhengig RNA polymerase (RdRp), støttes av
  - Homologi til RdRp fra andre virus i *Totiviridae*
  - Overlappende region i genom mellom ORF1 og ORF2 viser motiv/karakteristikker også beskrevet for andre av medlemmene i *Totiviridae*
- ORF3 – ikke beskrevet hos andre virus i *Totiviridae*
  - Ingen homologi til noe beskrevet protein
  - Uvanlig oppførsel ved rekombinant uttrykk i cellekultur

# Piscine myocarditis virus (PMCV)

## Pågående karakterisering – ORF3

To hovedhypoteser:

### 1. ORF3-proteinet er en del av viruspartikkelen

**Utstikkende fibre på viruspartikkelen som hos reketotiviruset IMNV?**

- Har omtrent samme størrelse som antatt for fibre hos IMNV
- PMCV og IMNV smitter ved utskilling av virus fra cellene i motsetning til tradisjonelle totivirus – fiber kan ha rolle
- En mindre del av proteinet har likheter med kjemokin i immunforsvaret – hjelper viruset å binde seg til celler med reseptor for kjemokinet?

### 2. ORF3-proteinet uttrykkes bare i cellene ved infeksjon

**Protein med rolle i virusets kopiering av seg selv i cellene**

- Bioinformatiske analyser av aminosyresammensetningen viser en høy sannsynlighet for at proteinet lokaliseres til en (celle-)membran/påvirker en membran ⇒ viruset har ikke membran
- Studier med mutante versjoner av proteinet bekrefter at delen som går gjennom membranen er viktig for funksjon
- Like viruslignende partikler dannes uavhengig av om ORF3-proteinet uttrykkes samtidig eller ei ⇒ ikke nødvendig for dannelse av virusets kappe

**Hva slags rolle? Veldig mange muligheter....**

Takk for oppmerksomheten

