

PRC2016014 IZSLER – Sintesi dei risultati

Studio dell'espressione ed immunogenicità delle proteine del Myxoma virus secrete da cellule infette: possono essere usate per sviluppare nuovi test diagnostici?

Introduzione

Nella lista delle specie animali (lagomorfi) che ospitano il virus della Mixomatosi (Myxv), il coniglio europeo (*Oryctolagus cuniculus*) ha due specificità: è l'ultima specie che si è aggiunto alla lista, in pratica negli anni '50, ed è l'unico ove all'infezione segue una patologia ad alta mortalità. Il Myxv appartiene alla famiglia dei Poxovirus, come tale ha un genoma a DNA di oltre 100 geni che esprimono numerose proteine che interagiscono con diverse componenti del sistema immunitario dell'ospite causando, nelle infezioni degli strains più virulenti, una rilevante immunosoppressione causa prima della patologia mortale. A tutt'oggi la Mixomatosi è causa di consistenti danni alla zootecnica cunicola, in particolari nei mesi primaverili ed estivi allorché gli insetti (zanzare) ne incrementano enormemente la diffusione. Ciò nonostante l'utilizzo intensivo del vaccino che però, proprio a causa della complessità del rapporto virus-ospite, ha un'efficacia limitata.

Obiettivi

La sierologia rientra fra gli strumenti di controllo e studio della Mixomatosi, anche se il maggiore contributo dato dal sistema immunitario alla protezione dalla malattia viene dal sistema cellulare mediato piuttosto che da quello umorale. I metodi ELISA sierologici disponibili utilizzano come antigene il virus intero, eccetto quello utilizzato al laboratorio OIE IZSLER che usa la proteina di membrana M-71 ed un MAb specifico (metodo sviluppato in un precedente PRC). Dati sierologici riportati nella bibliografia degli anni 50-60 ed ottenuti con metodi di immunodiffusione, riportavano una discrepanza in termini di sensibilità allorché venivano comparati i risultati utilizzando come antigene il virus intero o le proteine secrete dal virus nelle colture cellulari. A partire da queste osservazioni e considerando che fra le proteine secrete alcune regolano i rapporti fra virus e ospite, il progetto si è posto gli obiettivi di: a) identificare tali proteine e caratterizzarle, b) scegliere quella (o quelle) potenzialmente utili per sviluppare un metodo sierologico alternativo a quello verso le proteine strutturali del virus, c) allestire e standardizzare il metodo con l'uso di sieri noti per la reattività verso il virus.

Materiali e metodi

Tutti gli studi hanno usato virus e proteine prodotte per amplificazione *in vitro* (in genere cellule RK13) dei diversi ceppi di Myxv, utilizzati in genere a 10 MOI. Lo stato di infezione delle cellule è stato monitorato per microscopia.

A fine incubazione, il terreno era raccolto a parte ed il monostrato, per la parte ancora presente, raccolto in PBS. Il terreno era: a) centrifugato a 1000 g per 10 minuti per eliminare cellule e residui cellulari, b) ulteriormente centrifugato a 12000 g per un ora per eliminare le particelle virali presenti. L'analisi delle proteine presenti nel terreno di coltura è stata eseguita in PAGE-SDS e colorazione con coomassie. In alternativa le proteine sono state analizzate in western blotting con sieri noti.

Per la caratterizzazione e purificazione delle proteine sono state utilizzate metodiche di cromatografia liquida, in particolare gel filtrazione e scambio ionico. La proteina M-T7 è stata espressa per clonaggio nel gene in un vettore di E.coli. Le reazioni ELISA sono state seguite per adsorbimento delle proteine alla fase solida, diluizione dei sieri ed utilizzo di un MAb anti IgG di coniglio coniugato con l'HRP. La proteina M-T7 è stata espressa in E.coli per clonaggio del suo gene nel vettore pET-22 CPD.

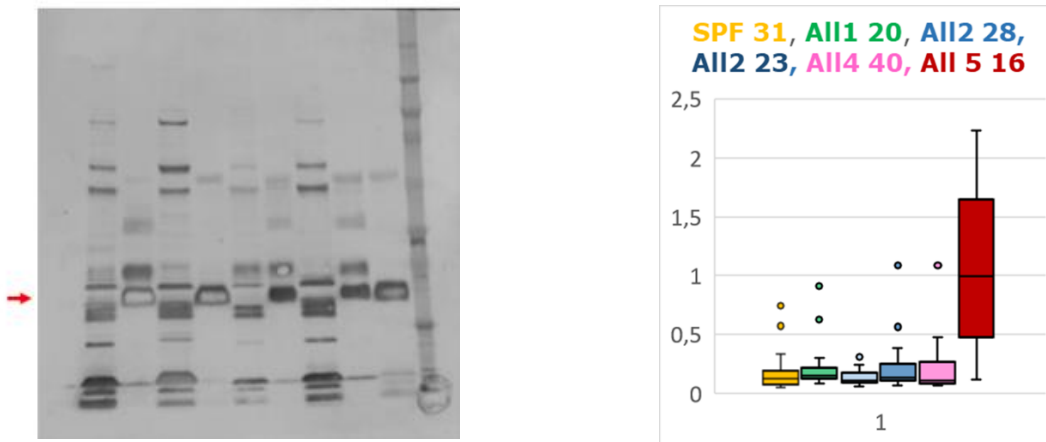
Risultati

L'analisi in PAGE dei terreni di coltura a 24 p.i. con diversi strains di Myxv mediante PAGE-SDS ha evidenziato un livello di espressione delle proteine secrete ben più ridotto dell'atteso, al limite di risoluzione del sistema PAGE-Coomassie (limite di circa 20 ng/banda o 2 ug/ml). Tuttavia, l'utilizzo dell'western blotting e di sieri immuni Myxv, grazie ad una sensibilità più elevata di 20-100 volte, ha consentito di mettere in evidenza la presenza di una proteina Myxv immuno-reattiva con un peso molecolare di circa 35Kd. La proteina si è poi resa visibile anche in PAGE-SDS previa concentrazione per ultra filtrazione o precipitazione con acetone (5-10x), consentendo di stabilire il livello di espressione di 2-3 ug/ml. L'analisi della cinetica di espressione con più strains (del campo e di riferimento) seguita per PAGE e western blotting, metteva in evidenza che la proteina 35 Kd diveniva identificabile dai sistemi dopo le 12-14 ore raggiungendo il suo massimo fra e 16-24 ore. L'analisi di più strains rilevava che tutti producevano la proteina secerndola nel terreno, ad eccezione del ceppo Borghi, per il quale in diverse condizioni di infezione e di rilevamento mai ha mostrato la secrezione della proteina 35Kd nel terreno. Il dato ha un suo interesse, considerando che il ceppo Borghi è utilizzato come ceppo vaccinale e quindi la proteina 35Kd è potenzialmente utilizzabile quale antigene di differenziazione fra animali vaccinati (Borghi) ed infetti. Per contro il ceppo SG33, di origine francese ed usato pure come ceppo vaccinale, esprime la proteina Kd35 come gli isolati dal campo. Per confermare che la proteina 35Kd induca anticorpi negli animali infetti, l'analisi in western blotting è stata ripetuta più volte con sieri anti Myxv a diverso titolo in ELISA (Figura 1). I dati hanno dimostrato la positività della proteina 35Kd con tutti i sieri con una gradualità della reazione correlata ai titoli ELISA. Ad ulteriore verifica che la proteina 35Kd sia oggetto di risposta anticorpale durante un'infezione Myxv, la stessa è stata adsorbita direttamente alla fase solida per l'esecuzione di una classica ELISA diretta ed un gruppo di sieri di coniglio negativi e positivi nella cELISA utilizzata nella sierologia Myxv. I risultati hanno confermato quello dell'western blotting con negatività dei sieri negativi e reazioni di grado variabile per i positivi. In vista di un potenziale uso come antigene in ELISA, è stato messo a punto un protocollo di purificazione mediante cromatografia liquida. Una volta concertato per ultrafiltrazione, il surnatante cellulare è stato: a) centrifugato a 12000g per 1 ora, b) passato su resina a scambio ionico (ResQ scambiatore anionico) da cui la proteina 35Kd è stata eluita da una contrazione di NaCl di 30-40 mM, c) passato su resina per gel filtrazione (Superdex 200). Le frazioni di quest'ultimo frazionamento sono state analizzate in PAGE e western blotting da cui si deduce che la proteina 35Kd eluisce con un peso molecolare attorno ai 120Kd e si ottiene con un grado di purezza di almeno l'80%. La proteina purificata è stata escisa dal PAGE ed inviata all'analisi di identificazione al servizio esterno dall'analisi in liquida massa dei frammenti triptici ha identificato la proteina 35Kd quale proteina M-T7 secreta dal Myxv (mima il recettore del gamma Interferon). L'identificazione della proteina ha consentito di verificare a che livello degli steps di espressione si interrompe la sua produzione nel ceppo Borghi: si è dimostrato che nel genoma il gene è integro ma non è stato poi identificato, diversamente che negli altri Myxv, il corrispettivo mRNA. Se ne deduce che la non espressione della M-T7 nel Borghi è connessa a mutazioni a livello delle sequenze di DNA che ne regolano la trascrizione.

Constato il basso livello di espressione della M-T7 e verificato positivamente il suo potenziale uso come antigene in un test sierologico innovativo, si è deciso di produrre la proteina per via ricombinate. Il gene MT7 è stato così clonato in un vettore per l'espressione in E.coli con una coda proteica di fusione corrispondente ad una tossina (CPD) capace di auto-clivarsi una volta inattivata. La recM-T7 è stata purificata per cromatografia di affinità e adsorbita alla fase solida di piastre ELISA per l'analisi di un pannello di sieri di varia origine. I dati preliminari hanno mostrato che in generale sieri di animali vaccinati non contengono anticorpi anti M-T7 mentre quelli provenienti da allevamenti con focolaio Myxv esprimono elevati titoli anticorpali nella maggioranza degli animali, titoli che perdurano per almeno 2-3 settimane.

Discussione e conclusioni

L'obiettivo del progetto era quello di analizzare le proteine secrete dal Myxv durante la sua replicazione *in vitro* al fine di selezionare quella con le caratteristiche più appropriate per un suo utilizzo in un nuovo test sierologico, prima fra tutte che stimolasse ovviamente la produzione di anticorpi specifici durante la replicazione *in vivo* del virus. La sperimentazione ha dimostrato come il livello delle proteine escrete nel terreno di coltura fosse molto basso rispetto all'atteso, cosa spiegabile con il fatto che i dati in bibliografia, risalenti agli anni 50-70, derivavano da studi di replicazione *in vivo* su coniglio. In particolare si è comunque identificata una proteina espressa dalle 12 ore in poi a livelli finali di 2-3 ug/ml. La proteina è stata identificata come M-T7, proteina polifunzionale implicata nell'interazione virus - sistema immunitario ospite (mima il recettore interferone gamma). Si è poi dimostrato che sieri di animali convalescenti da Myxv e positivi in cELISA Myxv, mostravano una elevata reattività sia in western blotting che in ELISA diretta. Se da un lato si è messo a punto un sistema di purificazione dal terreno della M-T7, dall'altro, data la sua bassa resa *in vitro*, è stata anche espressa in E.coli (recM-T7). La recM-T7 è stata usata come antigene in un ELISA diretta che ha usato un pannello di sieri positivi e negativi per la Myxv. I risultati hanno dimostrato un'elevata correlazione con la cELISA tradizionale in caso di animali infetti, mentre la correlazione è negativa nel caso di animali vaccinati. Ciò conferma il potenziale uso dell'ELISA M-T7 negli studi di sierologia della Mixomatosi. In aggiunta, una simile metodologia ELISA potrebbe essere utilizzata anche per esplorare la possibilità di un test virologico, considerando il possibile elevato livello di M-T7 presente in conigli deceduti per Mixomatosi.



A destra: western blotting di terreni di coltura contrati derivati da infezioni di cellule RK13 con 4 diversi ceppi di Myxv. Nelle linee 2-4-6-8 si identifica la proteina M-T7 di 35Kd. A sinistra Grafico riassuntivo dei risultati in spELISA rec M-T7. Da sinistra: le prime 3 distribuzioni in box-plot corrispondono a sieri da allevamenti negativi, i due successivi a prelievi da allevamenti vaccinati e l'ultimo da un allevamento con focolaio Myxv. In ordinata i valori A₄₉₂ della diluizione 1/10 dei sieri.

Bibliografia essenziale:

Bart Spiesschaert et al. *The current status and future directions of myxoma virus, a master in immune evasion*. Veterinary Research 2011, 42:76

Mail riferimento e dell'UO operativa: lorenzo.capucci@izsler.it

Autori: Tecla Cremonesi, Patrizia Cavadini, Arianna Bregoli, Anna Castelli, Antonio Lavazza, Giulia Pezzoni e Lorenzo Capucci

Parole chiave: Myxoma virus, Mixomatosi, coniglio europeo, sierologia, proteina M-T7.

PRC2016014 IZSLER: Studio dell'espressione ed immunogenicità delle proteine del Myxoma virus secrete da cellule infette: possono essere usate per sviluppare nuovi test diagnostici?