



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
DELLA SARDEGNA "G. Pegreffi"**

DIPARTIMENTO *PRODUZIONI*  
LABORATORIO di **RICERCA e SVILUPPO**

## **Ricerca Corrente IZS SA 01/03: Relazione finale**

*“Agalassia contagiosa: valutazione della risposta anticorpale in seguito alla somministrazione di vaccini a DNA”*

**Responsabile: Dott.ssa Sebastiana Tola**

Gli obiettivi indicati nel progetto erano i seguenti:

1. Produrre un vaccino a DNA inserendo in un vettore plasmidico i geni o porzioni di geni codificanti per proteine immunodominanti di *Mycoplasma agalactiae*
2. Somministrare il vaccino a DNA ad un gruppo di pecore
3. Analizzare la risposta anticorpale

### ***Premessa***

Il *Mycoplasma agalactiae* è l'agente responsabile dell'agalassia contagiosa nei piccoli ruminanti, patologia che oramai da circa 5 lustri rappresenta un grave problema per l'allevamento ovino e caprino sardo. Tale problema è ingigantito soprattutto dal fatto che l' economia zootecnica sarda ruota intorno alla produzione lattea.

L'emergenza agalassia è stata affrontata dai servizi veterinari e dal sistema sanitario nel suo complesso con risultati alterni. Il problema principale è che tutte le contromisure adottate non hanno bloccato la diffusione della malattia, sia nelle fasi iniziali dell'emergenza che tuttora, dove la malattia si presenta in maniera intermittente o assumendo caratteri di vera e propria epidemia in alcune aree a forte densità ovinicola. La rapida diffusione della malattia trova spiegazione in una serie di fattori: 1) l'elevata densità dei capi per km<sup>2</sup>; 2) le caratteristiche degli allevamenti sardi, con aziende quasi sempre frammentate in diversi appezzamenti che impongono lo spostamento degli animali durante le fasi del ciclo produttivo annuale per ottimizzare la disponibilità foraggera dei pascoli; 3) l'abitudine di prestare animali, in modo particolare i maschi da rimonta e infine 4) lo spostamento degli addetti alla mungitura da un allevamento all'altro (Contini et al., 1988, Leori et al., 1998).

Il momento tipico del contagio è appunto la mungitura quando l'operatore, imbrattandosi le mani con i soggetti malati o asintomatici ma eliminatori, trasmette la malattia ai soggetti ancora sani. Tale meccanismo non è scongiurato, anzi addirittura aggravato dalla mungitura meccanica, pratica oramai introdotta nella quasi totalità delle aziende sarde: le tettarelle sporche

con latte infetto possono veicolare l'agente eziologico ai soggetti sani. Da una fase iniziale di gestione dell'emergenza si è passati a approfondire lo studio riguardante il genoma e il proteoma del batterio. Alcuni risultati ottenuti si sono rivelati utili da una parte per lo sviluppo di sistemi diagnostici biotecnologici (Tola et al., 1994; 1996;1997) e, dall'altra, per la produzione di vaccini da utilizzare nella profilassi immunitaria (Tola et al., 1999). In modo particolare, è stato importante rilevare che nelle regioni a ovinicoltura, circola un solo ceppo di *Mycoplasma agalactiae* (Tola et al., 1996). Dall'analisi dei sieri provenienti da pecore infette naturalmente, si è arrivati a identificare e caratterizzare le proteine della membrana esterna coinvolte nella risposta immunitaria (Tola et al., 1997). Alcune di queste sono proteine stabili come la P80, P48 e P30 (Tola et al., 2001; Rosati et al., 1999; Fleury et al., 2001), altre appartengono alla famiglia delle lipoproteine variabili di superficie (vsp, variable surface lipoproteins) caratterizzate da un'alta frequenza di variazione di fase e di grandezza (Glew et al., 2000; Santona et al., 2002), mentre una di queste, la P40, gioca un ruolo importante nell'adesione dei batteri alla cellula ospite (Fleury et al., 2002).

Scopo di questa ricerca è stato quello di produrre vaccini a DNA utilizzando il vettore plasmidico VAX e i geni codificanti le P80 e P55 e sperimentare il loro utilizzo per scopi vaccinali.

### *Ceppi e condizioni colturali*

I ceppi di *M. agalactiae* sono stati isolati da campioni di latte provenienti da diversi focolai di agalassia contagiosa della Sardegna (NU-658, NU-2697, SS-440 e OR-352). I ceppi sono stati clonati e identificati mediante PCR (Tola *et al.*, 1996).

I ceppi di *M. agalactiae* sono stati seminati in 1000 ml di brodo di Hayflick modificato contenente 2mg/ml di rosso fenolo e 8% di siero equino e fatto crescere a 37 °C fino alla fase logaritmica di crescita. Il numero delle cellule vitali è stato determinato dall'ultima diluizione positiva in una coltura liquida seriale, in accordo con il metodo standard di Rodwell e Whitcomb (1983). I micoplasmi sono stati pellettati a 12,000 rpm per 30 min, lavati 2 volte con phosphate buffer saline (PBS, 0.1 M phosphate, 0.33 M NaCl, pH 7.4) e infine risospesi nei corrispettivi originali volumi. La concentrazione delle proteine totali delle sospensioni lavate è stata determinata utilizzando il Kit DC protein assay reagent (Bio-Rad, Richmond, CA) secondo il protocollo della casa produttrice.

La sospensione contenente il pool di micoplasmi (costituita da  $10^{10}$  CCU/ml) è stata aliquotata e conservata a -20°C .

### *SDS-PAGE*

La separazione delle proteine totali del pool di micoplasmi è stata effettuata mediante corsa elettroforetica in SDS-PAGE.

L'SDS-PAGE è stato effettuato secondo la metodica descritta da Laemmli (1970, Nature 227). Le corse elettroforetiche sono state eseguite utilizzando l'apparecchio Mini Protean II Cell (Bio-Rad). I gels sono stati preparati in

modo da avere un "separating gel" ad una concentrazione finale di acrylamide/bisacrylamide (Bio-Rad, 37.5: 1) al 12% e uno "stacking gel" al 4%. 20 µg di proteine, provenienti dai ceppi di micoplasmi (Nu-658, Nu-2697, SS-440 e OR-352) sono stati solubilizzati in 20 µl di loading buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerolo e 0.01% Bromophenol Blue), bolliti per 5 min e raffreddati a 20 °C.

I campioni sono stati fatti correre in un Vertical Stab Gel Apparatus (Bio-Rad) contenente 800 ml di running buffer (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS; pH 8.3) a 200 Volts per 1 ora. La mobilità elettroforetica delle proteine dei campioni è stata valutata in relazione alla mobilità elettroforetica degli standards molecolari utilizzati, costituiti da una miscela di proteine con peso molecolare compreso tra 14.4 e 97.4 kDa (Promega). Le proteine, dopo la corsa elettroforetica, sono state colorate con una soluzione allo 0.25% di Blue Comassie R 250 (Sigma) in 25% di isopropanolo (Sigma) e 10% di acido acetico (Carlo Erba) o processate per l'immunoblotting.

#### *Purificazione e concentrazione delle lipoproteine di membrana.*

Le bande proteiche corrispondenti alle lipoproteine di membrana P80 e P55 sono state tagliate dal gel di SDS-PAGE in seguito ad una corsa elettroforetica di proteine totali di *M. agalactiae*. Le singole proteine sono state elettroeluite e concentrate utilizzando i Microcon 30 (Amicon) secondo le istruzioni della casa produttrice (Figura 1).

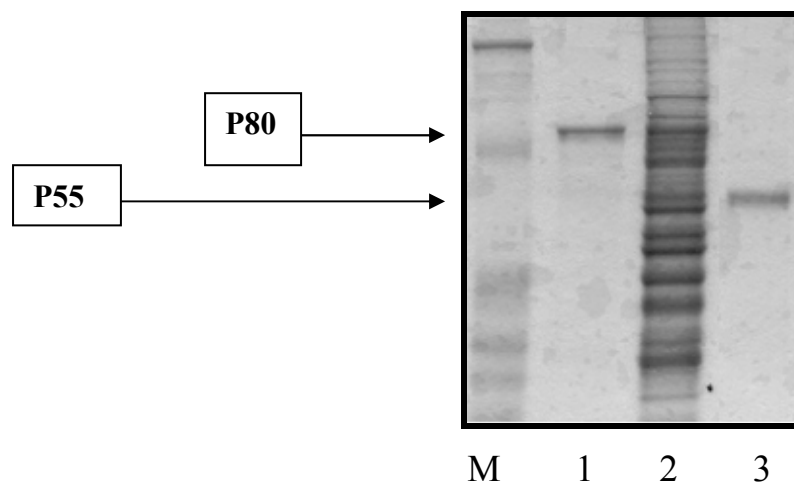


Figura 1- Corsa elettroforetica in SDS-PAGE delle proteine P80 e P55 di *Mycoplasma agalactiae* purificate e concentrate. M, marker caleidoscopico (Bio-Rad), Linea 1, proteina P80; linea 2, Micoplasmata totali; Linea 3, proteina P55.

## **B) Produzione di anticorpi contro due lipoproteine di membrana.**

Le proteine P80 e P55 elettroeluite e concentrate sono state inoculate in agnelli per ottenere sieri policlonali monospecifici. Nel progetto abbiamo utilizzato 2 agnelli di razza *sarda* di età compresa tra i 30 e i 40 giorni. I due agnelli sono stati sottoposti a visita clinica preliminare per escludere patologie in atto o pregresse mentre per escludere qualsiasi contatto con micoplasmata abbiamo analizzato campioni di siero mediante immunoblotting. Prima di iniziare il protocollo di immunizzazione, ciascun animale è stato sottoposto a trattamento antiparassitario e ad un periodo di

acclimatemento di 15 giorni. Durante le fase di acclimatemento e immunizzazione gli agnelli sono stati tabulati presso i paddocks della Facoltà di Medicina Veterinaria di Sassari. I paddocks e le attrezzature ivi inserite rispondevano al DLgs 116 del 27/gennaio 97 riguardante "Attuazione della direttiva n° 86/609/CEE in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali od altri fini scientifici".

### *Protocollo di immunizzazione*

Il protocollo di immunizzazione è stato così articolato:

- un inoculo sottocute di 0.4 ml di antigene (proteina purificata emulsionata in rapporto 1:1 con adiuvante completo di Freund);
- un inoculo sottocute, dopo tre settimane, di 0.4 ml di antigene (proteina purificata emulsionata in rapporto 1:1 con adiuvante incompleto di Freund);
- un inoculo intramuscolo, dopo otto giorni, di 0.2 ml di antigene (solo proteina purificata).

Dopo una settimana dall'ultimo inoculo si è proceduto a salassare gli agnelli. Il sangue è stato sierato ed il siero stoccato a -20°C.

I sieri sono stati testati mediante immunoblotting.

### *Immunoblotting*

I gels, dopo la corsa elettroforetica, sono stati tenuti per 15 min in 300 ml di transfer buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicina, 20% metanolo) e successivamente le proteine trasferite su membrane di

nitrocellulosa da 0.45  $\mu\text{m}$  (Sigma) mediante un SemiDry Apparatus (Bio-Rad) a 15 Volts per 1 ora. Ogni membrana di nitrocellulosa sono state incubate per un' ora a temperatura ambiente (t.a.) in PBS pH 7.4 contenente 2% di skim milk (Difco, Detroit, USA).

Le nitrocellulose sono state poi messe ad incubare a 37 °C per 1 ora con siero iperimmune di agnello diluiti 1:1500 in PBS-2% skim milk. Dopo 4 lavaggi di 10 min ciascuno con PBS-2% skim milk a t.a. ed in leggera agitazione, le membrane sono state incubate a 37°C per 1 ora con immunoglobuline anti-IgG di pecora coniugate con fosfatasi (Sigma) diluite in PBS-2% skim milk. Dopo 4 ulteriori lavaggi di 10 min ciascuno in PBS-2% skim milk, le membrane sono state messe a contatto con il substrato di sviluppo della fosfatasi contenente BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indolo fosfato/nitro-blu-tetrazolio). Dopo lo sviluppo del colore, le nitrocellulose sono state lavate con H<sub>2</sub>O distillata e asciugate all'aria (Figura 2)

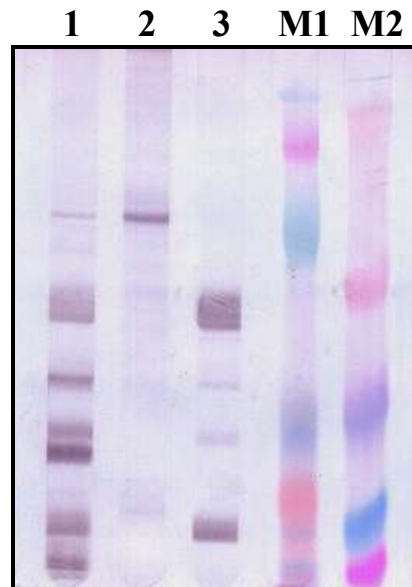


Figura 2- Immunoblotting ottenuto utilizzando i sieri policlonali specifici versus proteine totali di *M. agalactiae*. Lane 1, controllo positivo con siero proveniente da una pecora malata naturalmente; Lane 2, siero anti-P80; Lane 3, siero anti-P55; M1 e M2, marker caleidoscopico (Bio-Rad)

### *Analisi schematica del gene P80 e P55*

Il gene della P80 è stato registrato in banca dati (GenBank) sotto il numero di accesso X95628 ed è schematizzato nella Figura 3.

Il gene della P55 è stato registrato in banca dati sotto il numero di accesso AF248865 ed è siglato con *VpmaU*. L'Open Reading Frame (ORF) è schematizzato nella Figura 4.

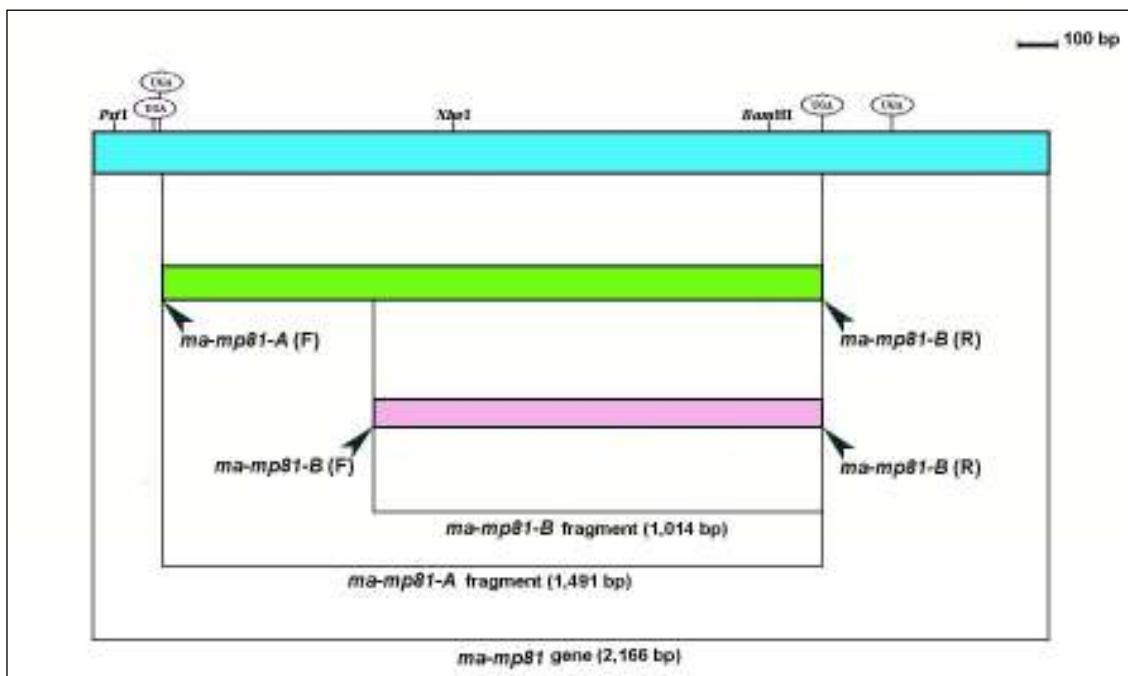


Figura 3- Rappresentazione schematica del gene della proteina P80 e di due frammenti da 1491 e 1041 privi di TGA (codone che in *E.coli* codifica per lo stop mentre nei micoplasmi per il triptofano).

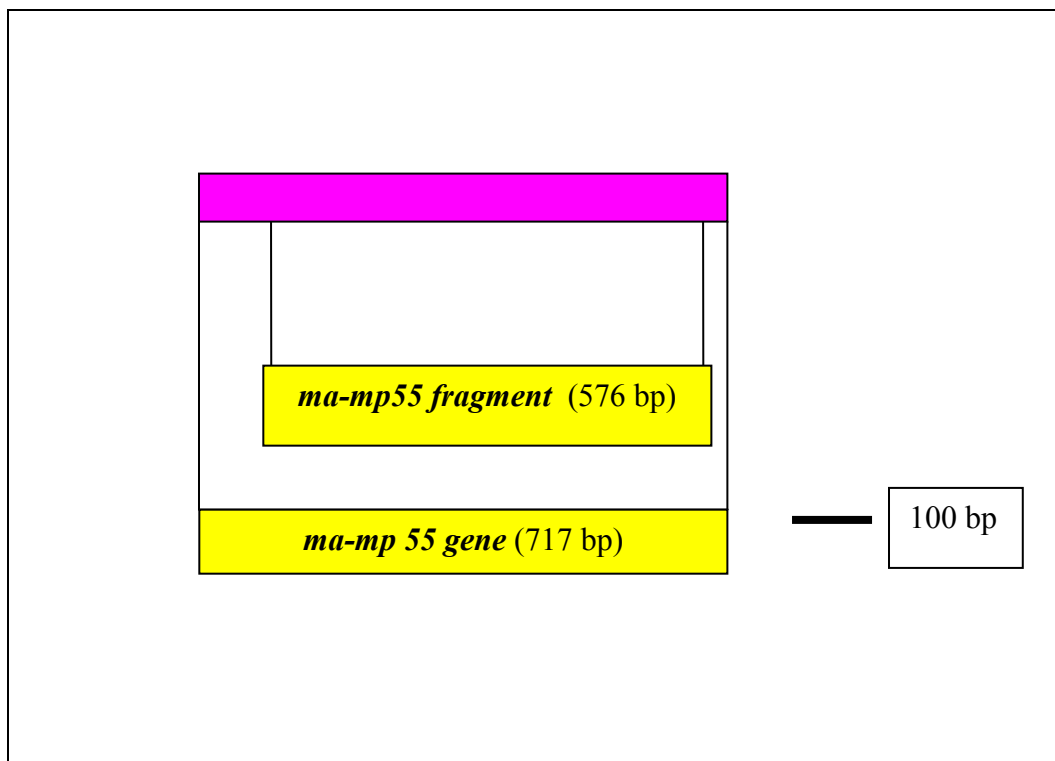


Figura 4- Rappresentazione schematica del gene della proteina P55 (717 bp) e del frammento da 576 bp utilizzato in questa ricerca.

*Clonaggio ed espressione della P80 e P55 in cellule procariotiche mediante il vettore pQE-30 (Qiagen)*

Prima di introdurre le porzioni geniche relative alle proteine P80 e P55 in vettori plasmidici adatti alla vaccinazione, abbiamo verificato che tali frammenti genici producessero proteine ricombinanti in grado di legare gli anticorpi dei sieri policlonali monospecifici. Pertanto, una porzione da 1041 bp del gene della P80 e una da 576 bp del gene della P55 sono state clonate all'interno del vettore di espressione pQE-30 (Qiagen), modificando la sequenza iniziale e finale del gene in modo da inserire due siti di restrizione compatibili con il plasmide (i siti di restrizione inseriti sono stati *HindIII* e *KpnI*).

Per fare questo è stata eseguita una PCR utilizzando due primers modificati contenenti appunto i due siti di restrizione non presenti nella sequenza originale. Gli amplificati da 1041 e 576 bp ottenuti sono stati prima purificati con il Kit CONCERT Gel Extraction System della GIBCO e poi digeriti con gli enzimi *HindIII* e *KpnI*.

Contemporaneamente si è digerito il plasmide con gli stessi enzimi. Dopo una valutazione quantitativa della “*ratio*” tra l’inserito e il vettore si è proceduto con l’aggiunta di un  $\mu$ l di T4-Ligase (Roche) a temperatura ambiente per 10 min. Un’aliquota di 10  $\mu$ l di trasformazione è stata inserita in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  competenti (Invitrogen), contenenti il plasmide modulatore a basso numero di copie denominato pREP4.

Le colonie positive sono state selezionate su piastre di Luria agar contenenti ampicillina (50  $\mu$ g/ml) e Kanamicina (12.5  $\mu$ g/ml). Tra tutte le

colonie positive sono state selezionate 4 colonie per ciascun frammento per le quali si è proceduto all'induzione.

Ogni colonia è stata fatta crescere per 18 ore (o/n) in Luria Broth (LB) contenente gli antibiotici ampicillina e kanamicina. Il giorno successivo si è proceduto al rilancio in 50 ml di brodo LB senza antibiotici fino alla fase logaritmica di crescita di 0.45 O.D.; stimata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 600 nm. Raggiunta tale fase di crescita, sono state prese tre aliquote di 5 ml nelle quali si sono aggiunti 10 µl di IPTG 1M. Le colture sono state ulteriormente incubate a 37°C rispettivamente per 30', 60', 90' e 16 ore. Ultimata la fase di induzione, le colture batteriche sono state centrifugate a 5000 rpm per 10 min a 4°C e risospese in 314 µl di PBS pH 7.2. Un' aliquota di 6 µl è stata fatta bollire per 5 min in loading buffer (2% SDS, 5% 2-β-mercaptoetanol, 10% glicerolo, 62.5 mM Tris), fatta correre in un gel di polyacrilamide al 12 % ed infine analizzata mediante immunoblotting. Le colonie, con la migliore produzione di proteina ricombinante, sono state fatte crescere overnight a 37°C in LB+IPTG. Le brodocolture sono state poi centrifugate a 5000 rpm per 15 min ed i rispettivi pellet risospesi in 1ml di lysis buffer B (8 M urea, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 M Tris-HCl; pH 8.0). Questa soluzione è stata incubata per 1 h a temperatura ambiente in leggera agitazione. Subito dopo è stata centrifugata a 12.000 rpm e il surnatante è stato passato attraverso colonne di affinità al nickel (Ni-NTA Spin, Qiagen).

Le proteine di fusione con le 6 istidine così estratte, sono state poi saggiate con gli anticorpi monospecifici policlonali prodotti in agnello. La concentrazione delle proteine ricombinanti è stata determinata mediante

lettura spettrofotometrica a 750 nm con l'utilizzo del Kit DC-protein assay della Bio-Rad.

Il risultato è visualizzato nella Figura 5.

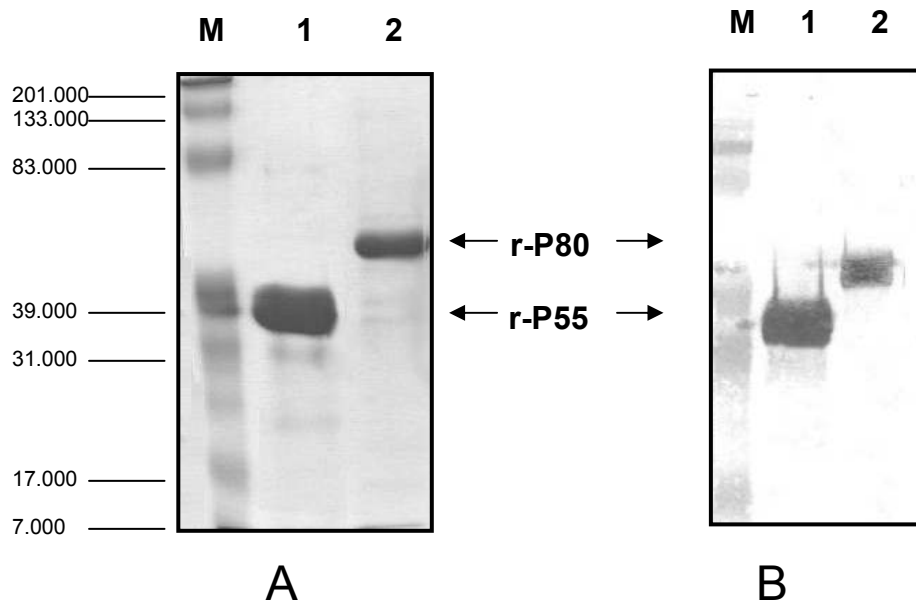


Figura 5. Purificazione e caratterizzazione dell'antigenicità delle proteine ricombinanti rP80 e rP55. (A) gel di SDS-PAGE colorato con Coomassie blue contenente la proteina rP55 (linea 1) e la rP80 (linea 2) purificate dall' *E.coli* DH5 $\alpha$ . Linea M, marker caleidoscopico (Bio-Rad). (B) determinazione dell'antigenicità delle proteine purificate rP55 (linea 1) e rP55 (linea 2) mediante Western blot con un pool di sieri provenienti da pecore infette naturalmente e con sintomi clinici.

*Clonaggio dei frammenti genici della P80 e P55 nel vettore plasmidico pVAX (Invitrogen).*

La scelta del vettore plasmidico da utilizzare per il vaccino a DNA è caduta sul pVAX prodotto dall'Invitrogen. Il pVAX (Figura 6) è un vettore plasmidico di 3.0 kb costruito per lo sviluppo di vaccini a DNA, infatti risponde alle caratteristiche imposte dal Food and Drug Administration (FDA) americano ed elencate nel documento “ *Points to consider on plasmid DNA vaccines for preventive infectious disease indications*” pubblicato il 22 dicembre 1996 (Docket n° 96N-0400).

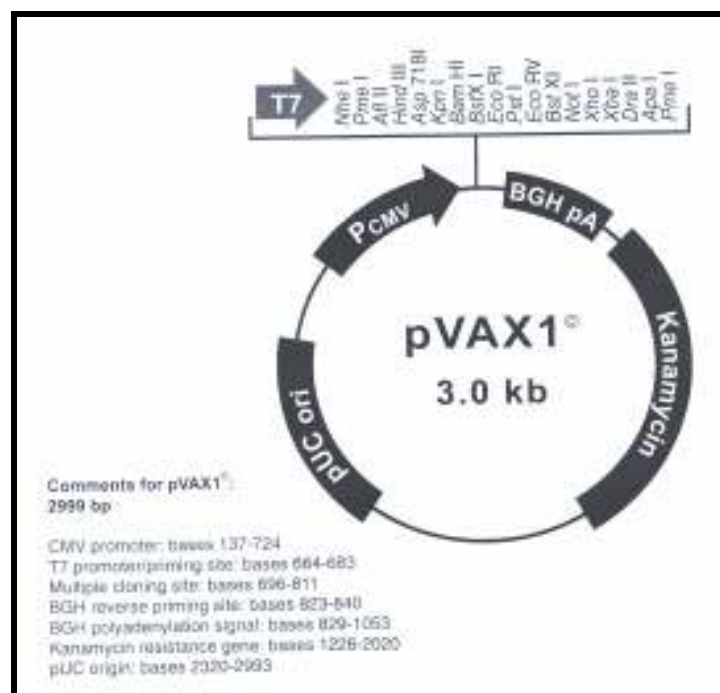


Figura 6. Il vettore pVAX utilizzato in questa ricerca

Il vettore contiene i seguenti elementi:

- un promotore derivato dal citomegalovirus umano per un alto livello di espressione in un ampio range di cellule di mammiferi
- un segnale di poliadenilazione (ormone di sviluppo bovino, BGH) per un efficiente termine e poliadenilazione del mRNA
- il gene per la resistenza alla kanamicina necessario per la selezione in *E.coli*.

La propagazione del vettore pVAX è stata fatta in *E.coli* TOP10 con deficienza in ricombinazione (*recA*<sup>1</sup>) e in endonuclease A (*endA*).

Il pVAX è un vettore di non-fusione; pertanto per inserire i frammenti genici utilizzati con successo nella produzione di proteine ricombinate, abbiamo fatto sintetizzare dalla Ditta Invitrogen dei primers particolari. Per rispettare la direzionalità e l'Open Reading Frame (ORF) abbiamo inserito nel primer forward il sito di restrizione *KpnI* e nel reverse il sito *XbaI*. Nel primer forward, oltre al sito *KpnI* abbiamo aggiunto anche la sequenza di Kozak (translation and initiation) e il codone d'inizio ATG.

Era possibile inserire anche altre sequenze di consenso, importante era rispettare la presenza di una A in posizione -3 e di una G in posizione +4 rispetto al codone d'inizio ATG, come illustrato sotto:

ANNATGG

Nel primer reverse abbiamo inoltre aggiunto un codone stop (TAG).

La PCR è stata impostata in modo da permettere un iniziale attacco dei primers molto lunghi e successivamente l'amplificazione dei frammenti di nostro interesse. L'amplicone del gene codificante la P80 è visualizzato nella Figura 7.

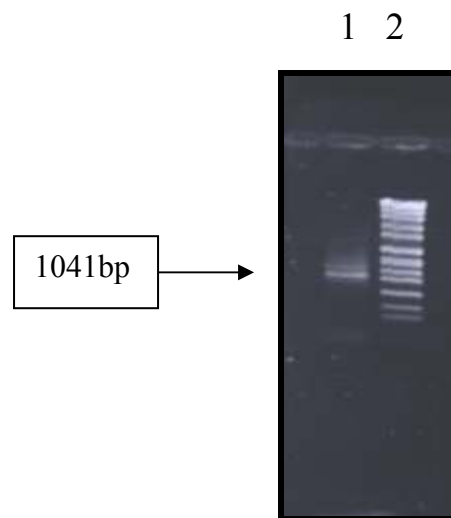


Figura 7- PCR del frammento codificante la P80. Linea 1, amplificato.  
Linea 2, marker VII (Roche)

Il frammento così ottenuto è stato digerito con gli enzimi *KpnI* e *XbaI* in modo da rendere le estremità “appiccicose” con quelle del vettore plasmidico pVAX, digerito con gli stessi enzimi (Figura 8)

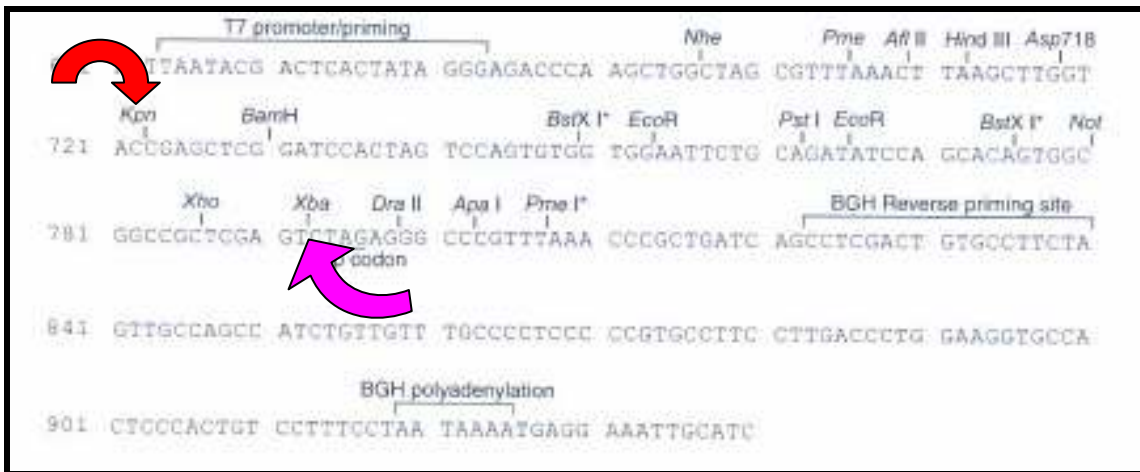


Figura 8. Siti di taglio degli enzimi *KpnI* (freccia rossa) e *XbaI* (freccia fucsia) all'interno del polylinker del plasmide pVAX.

La "ligation" è stato fatta mettendo a contatto 3  $\mu$ l di frammento digerito con 1  $\mu$ l di vettore digerito in presenza di 1  $\mu$ l di T4 ligase (Amersham, 2,5U/ $\mu$ l) a temperatura ambiente per 1 ora. La mistura è stata inserita all'interno degli *E. coli* TOP10 resi competenti con cloruro di calcio ( $\text{CaCl}_2$ ). La selezione dei trasformanti è stata fatta in piastre in Luria broth (LB) contenenti 50 $\mu$ g/ml di kanamicina e 12.5 $\mu$ g/ml di tetraciclina . Dopo un'incubazione a 37° C per 18 ore, le colonie cresciute in LB+ kanamicina+tetracicline sono state prelevate e messe a crescere in 5 ml di LB brodo con antibiotici sempre a 37°C o/n. Dalle colture sono stati estratti i plasmidi mediante il kit "mini prep" della Qiagen (Figura 9).

C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29

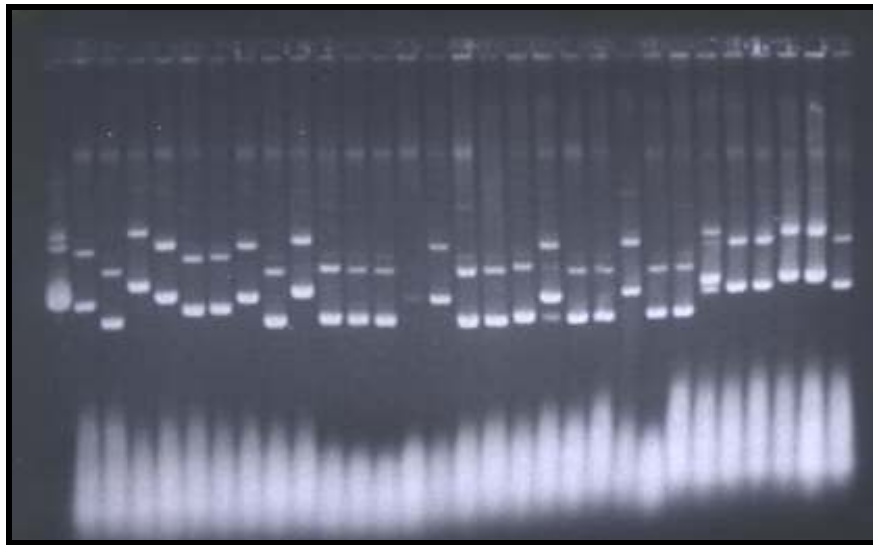


Figura 9. Corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% in TAE 1X. Di 29 plasmidi estratti da altrettante colonie di *E.coli* cresciute in piastre di LB contenenti kanamicina e tetracicline. Linea C, plasmide pVAX non-digerito di controllo.

I plasmidi con diversa mobilità rispetto al pVAX senza inserto sono stati digeriti con *KpnI* e *XbaI* e messi a confronto con l'inserto da 1041bp del *M. agalactiae* (Figura 10).

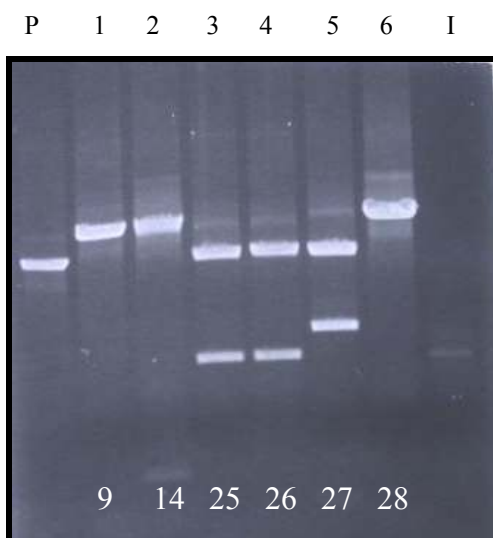


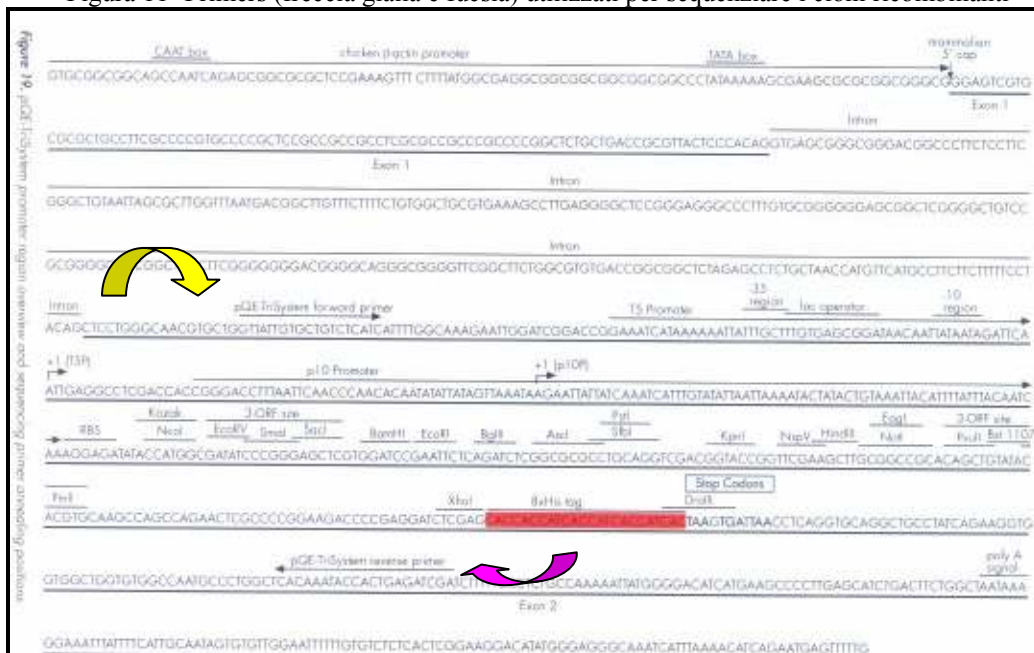
Figura 10. Corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% in TAE 1X dei plasmidi digeriti con *KpnI* e *XbaI*. Linea P, pVAX digerito, Linee 1-6, differenti plasmidi, Linea I, inserto di *M. agalactiae*. I cloni 25 e 26 digeriti presentano un frammento della stessa altezza dell'inserto (freccia)

I cloni 25 e 26, con inserti corrispondenti al frammento di 1041 bp del *M. agalactiae*, sono stati fatti crescere in 2 litri di LB contenente kanamicina e tetraciclina a 37°C per 18 ore. Successivamente la brodocoltura è stata centrifugata a 6,000 rpm per 15 min. Dal pellet è stato estratto il plasmide mediante l'uso del kit EndoFree Plasmid Giga adatto per ridurre efficacemente le endotossine a meno di 0.1 EU/μg DNA. Inizialmente, il plasmide è stato sequenziato per verificare l'inserimento corretto della sequenza di Kozak.

### Sequenziamento dei cloni 25 e 26 in pVAX

La sequenza dei plasmidi è stata effettuata utilizzando il kit Sequenase 2.0 (Amersham) e i primers universali indicati nella Figura 11.

Figura 11- Primers (freccia gialla e fucsia) utilizzati per sequenziare i cloni ricombinanti



Entrambi gli strands dell'inserto incluso in pVAX sono stati sequenziati con il metodo di Sanger di terminazione dideossi della catena. Il sequenziatore utilizzato è stato l'ALFexpress della Ditta Amersham. Le sequenze sono state analizzate e sovrapposte con il programma on-line ALIGN (<http://vega.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>).

### *Trasfezione*

Dopo aver verificato l'inserimento corretto del frammento di *M. agalactiae*, prima della somministrazione del vaccino a DNA agli animali, abbiamo sperimentato la produzione della proteina esogena in cellule eucariote mediante la tecnica di trasfezione. La trasfezione consiste nel trasferimento di molecole di DNA esogeno in cellule riceventi. Il DNA, una volta trasfettato, può essere mantenuto nel citoplasma da molte cellule per un determinato periodo di tempo, in genere 2-3 giorni (trasfezione transiente) oppure, solo in pochi casi, viene integrato nel genoma cellulare (trasfezione stabile).

L'introduzione di geni in cellule di mammifero è in generale un processo inefficiente, perché necessita di una fonte abbondante di cellule di partenza per poter ottenere, al termine dell'esperimento, una quantità utilizzabile di cellule trasfettate. E' solo grazie alla disponibilità di linee cellulari di mammifero capaci di crescere indefinitamente in coltura che gli esperimenti di trasferimento genico sono diventati una pratica comune in laboratorio.

Le linee cellulari utilizzate in questa ricerca sono state:

- cellule CHO (Chinese Hamster Ovarian);
- cellule HEK 293 (Human Embryonic Kidney);
- cellule COS 1 (Primate - Non Human Kidney);
- cellule HeLa ( human cervix).

Le cellule non sono in grado di captare naturalmente il DNA, quindi l'introduzione di acidi nucleici all'interno di cellule di mammifero può avvenire solamente attraverso metodiche di trasfezione sia fisiche che chimiche. Quelle utilizzate nel nostro laboratorio sono state prevalentemente di tipo chimico: trasfezione mediata da lipidi cationici e coprecipitazione con Fosfato di Calcio.

*Trasfezione transiente con lipidi cationici: LIPOFECTAMINE 2000 E LTX*

La trasfezione mediata da lipidi cationici si inserisce nel campo delle tecniche chimiche di trasferimento genico. La testa cationica del composto lipidico si associa strettamente con la carica negativa dei gruppi fosfato degli acidi nucleici. I complessi lipidi-DNA, legandosi e poi fondendosi con le membrane cellulari, vengono *internalizzati* nella cellula.

Le lipofectamine sono una classe di molecole formate da una coda policationica, a cui si lega il DNA, e da una porzione lipidica, che facilita il passaggio del complesso DNA-lipofectamine attraverso la membrana cellulare.

Nel nostro laboratorio sono state realizzate trasfezioni transienti utilizzando Lipofectamine 2000 e Lipofectamine LTX (Invitrogen). In un primo

momento sono state eseguite delle prove adoperando cellule CHO e le lipofectamine 2000.

Il protocollo utilizzato è stato il seguente:

- Il giorno precedente la trasfezione le cellule sono state divise e piastrate alla concentrazione di  $1 \cdot 10^5$  cell/ml. La conta delle cellule è stata eseguita utilizzando la camera conta-cellule mescolando 1.8 ml di Nigrosina 10X (Sigma) a 200 $\mu$ l di sospensione cellulare.
- Le cellule sono state piastrate in Piastre sterili a 6 pozzetti di 35 mm di diametro, contenenti ciascuna 2 ml di DMEM senza antibiotici, 10% FBS e L-glutamina 2 mM. Un'elevata efficienza di trasfezione richiede che le cellule raggiungano il 50-80% di confluenza.
- Le cellule sono state mantenute in un incubatore termostato a 37°C, umidità relativa controllata e 5% CO<sub>2</sub> per circa 24 ore.
- Per ottimizzare l'efficienza del processo di trasfezione è stato necessario determinare la corretta quantità di DNA e lipofectamine da utilizzare, in relazione alla linea cellulare adoperata. Sono state quindi allestite due prove, modificando il rapporto tra DNA e lipofectamine (ratio 1:2 e ratio 1:3): nella prima si è utilizzato 4 $\mu$ g di DNA e 8 $\mu$ l di lipofectamine (ratio 1:2); nella seconda, 4 $\mu$ g di DNA e 12 $\mu$ l di lipofectamine (ratio 1:3).
- Il giorno della trasfezione, il DNA è stato diluito in CHO-SFM (Gibco) privo di antibiotici e siero: 4 $\mu$ g di DNA in 246 $\mu$ l di CHO-SFM. Questa soluzione è stata tenuta in incubazione per 5 minuti a

temperatura ambiente, in modo da favorire la formazione dei complessi.

- Nel frattempo sono state diluite le lipofectamine, sempre in terreno CHO-SFM (Gibco) privo di siero ed antibiotici: 8 $\mu$ l di lipofectamine in 242 $\mu$ l di CHO-SFM (ratio 1:2) e 12 $\mu$ l di lipofectamine in 238 $\mu$ l di CHO-SFM (ratio 1:3). La soluzione è stata tenuta in incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente.
- Successivamente è stata unita la soluzione contenente le lipofectamine con quella contenente il DNA e la miscela è stata incubata a temperatura ambiente per 20 minuti.
- Prima di aggiungere la soluzione contenente il complesso DNA-lipofectamine, le cellule sono state lavate con terreno CHO-SFM privo di siero ed antibiotici, in modo da togliere eventuali residui di siero che avrebbero potuto compromettere o perlomeno ridurre l'efficienza della trasfezione.
- La soluzione è stata poi portata ad un volume finale pari a 1 ml/pozzetto e il preparato è stato addizionato alle cellule che sono state incubate a 37°C per 5 ore.
- Trascorso questo tempo, sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 2 ml di terreno completo, preparato in modo tale che la concentrazione finale di antibiotici e siero sia quella presente in un normale terreno di crescita (DMEM, 10% FBS, 2mM glutamina, penicillina e streptomina 1X). Le cellule vengono quindi poste in incubazione a 37°C per 24 ore.

- Il giorno successivo, le cellule sono state staccate dai pozzetti utilizzando Tripsina-EDTA 1X, e la sospensione cellulare è stata centrifugata a 1000 rpm per 10 minuti. Il surnatante è stato eliminato e le cellule sono state risospese in 100µl di PBS 1X sterile (PBS, 0.1 M phosphate, 0.33 M NaCl, pH 7.2) e incubate a -20°C overnight;
- A questo punto le cellule sono state testate per verificare l'effettiva produzione delle proteine di interesse, mediante corsa elettroforetica su gel SDS-PAGE e western blotting.

Come controllo positivo si è utilizzato il plasmide pVAX contenente il gene della  $\beta$ -galattosidasi (lacZ) acquistato dalla Ditta Invitrogen. Tale plasmide è stato sottoposto al protocollo descritto prima. Mentre la produzione della proteina P80 è stata testata con l'antisiero specifico, la produzione della  $\beta$ -galattosidasi è stata verificata con il siero anti- $\beta$ -galattosidasi acquistato sempre dall'Invitrogen. I risultati sono visualizzati nella Figura 12.

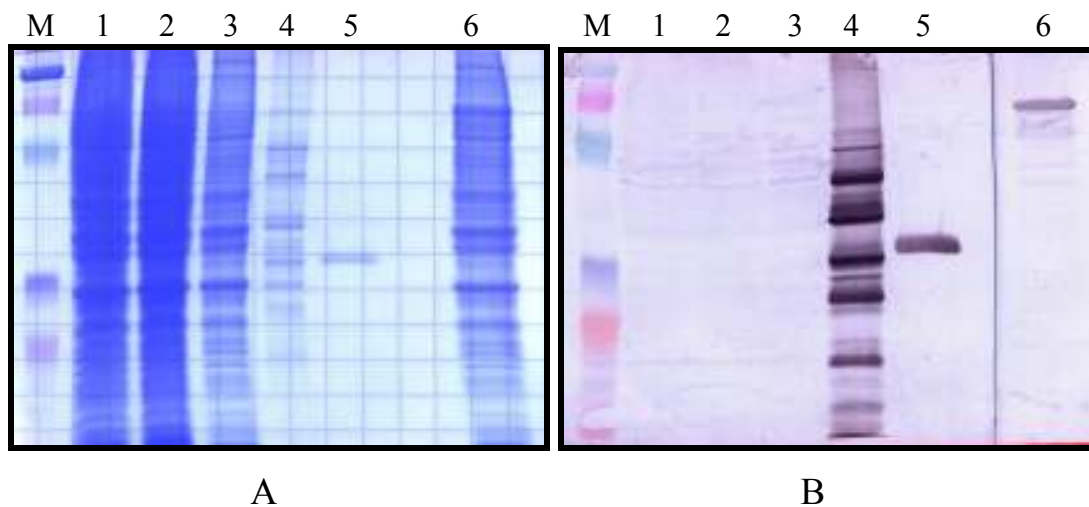


Figura 12. Analisi delle cellule trasfettate con pVAX+P80 e pVAX+LacZ. Riquadro A: SDS-PAGE delle cellule CHO (linea 1) trasfettate con pVAX+P80 e lipofectamine 1:2 (linea 2) e 1:3 (linea 3). Nella linea 4 sono state caricate proteine totali di *M. agalactiae*; nella linea 5, solo la proteina ricombinante P80 mentre nella linea 6, le cellule CHO trasfettate con pVAX+LacZ (1:3). Riquadro B: immunoblotting delle proteine fatte correre nel riquadro A. Le linee 1-5 sono state incubate con un siero proveniente da una pecora malata naturalmente di agalassia contagiosa mentre la linea 6 con il siero anti-LacZ. Linea M, marker caleidoscopico (Bio-Rad).

Non avendo ottenuto dei buoni risultati con questo metodo, sono state effettuate ulteriori prove che prevedevano l'utilizzo, sia di un diverso tipo di lipofectamine, ritenute meno tossiche, le lipofectamine LTX (Invitrogen), sia di diverse linee cellulari considerate più facilmente trasfettabili: le cellule COS1 e HeLa. Il protocollo di transfezione è stato simile a quello utilizzato per le lipofectamine 2000; l'unica differenza è stata la quantità di DNA e di lipofectamine utilizzate: 2.5µg di DNA e 6.25µl di lipofectamine LTX (Invitrogen) in 500µl di OPTIMEM 1 (Gibco).

Anche in questo caso i nostri costrutti non hanno espresso *in vitro* la proteina corrispondente all'inserto di *M. agalactiae* inserito, a differenza del controllo di trasfezione pVAX+lacZ.

#### *Coprecipitazione con fosfato di calcio*

Un'ulteriore prova eseguita nel nostro laboratorio è stata quella di legare il DNA plasmidico al fosfato di calcio. Le cellule sono in grado di captare in maniera efficiente il DNA sotto forma di precipitato con fosfato di calcio. Il protocollo di base per questo tipo di esperimento, prevede che il DNA venga miscelato con una soluzione accuratamente tamponata contenente fosfato. L'aggiunta di cloruro di calcio forma un fine precipitato di fosfato di calcio e DNA, che si distribuisce su un monostrato di cellule, lasciate poi in incubazione a 37°C per diverse ore (4-6), durante le quali molte di esse *internalizzano* il DNA esogeno. Il precipitato viene poi rimosso dalle cellule, alle quali viene aggiunto terreno di coltura fresco. Le cellule sono poi lasciate in incubazione a 37°C.

Sebbene la trasfezione con Calcio fosfato solitamente si esegua utilizzando le cellule HEK 293, sono state fatte delle prove utilizzando anche altre linee cellulari, quali le COS1 e le HeLa.

Il protocollo utilizzato è stato il seguente:

- Il giorno precedente la trasfezione le cellule sono state divise e piastrate alla concentrazione di  $1 \cdot 10^5$  cell/ml. La conta delle cellule è stata eseguita come descritto sopra.
- Le cellule sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti contenenti 2 ml di DMEM senza antibiotici, 10% FBS e 2 mM glutamica.
- Le cellule sono state mantenute in un incubatore termostato a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  per circa 24 ore;
- Per ottimizzare l'efficienza del processo di trasfezione è stato necessario stabilire la corretta quantità di DNA e di buffer Calcio Fosfato da utilizzare, in relazione alla linea cellulare impiegata. Sono state quindi allestite due prove, modificando la quantità di DNA da aggiungere alla soluzione di calcio fosfato: la prima utilizzando  $80\mu\text{g}$  di DNA; la seconda, utilizzando  $60\mu\text{g}$  di DNA;
- Il giorno della trasfezione, il DNA è stato diluito in  $\text{CaCl}_2$  250mM. Questa soluzione è stata tenuta in incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente. Nella formazione del complesso DNA-Calcio Fosfato, la temperatura rappresenta un importante fattore limitante. Per questo motivo, la soluzione di  $\text{CaCl}_2$  deve essere tenuta a temperatura ambiente per qualche ora prima dell'uso;
- Alla soluzione contenente DNA- $\text{CaCl}_2$ , Sono stati aggiunti  $200\mu\text{l}$  di HBS solution pH 7.05 (50mM HEPES, 1.5mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 140 mM  $\text{NaCl}$ );
- Le soluzioni sono state miscelate e incubate a temperatura ambiente per alcuni minuti, sino alla formazione del precipitato, visibile a occhio nudo. La formazione del complesso DNA-particelle di calcio

fosfato inizia immediatamente dopo aver unito le due soluzioni. Il tempo di incubazione dovrebbe essere compreso tra 1-15 minuti, mentre periodi di incubazione più lunghi, potrebbero portare gradualmente alla formazione di particelle di precipitato sempre più grandi. La velocità di accrescimento delle particelle, è inversamente proporzionale alla dimensione del plasmide;

- Prima di aggiungere la soluzione contenente il complesso DNA-particelle di calcio fosfato, le cellule sono state lavate con terreno DMEM privo di siero ed antibiotici, in modo da togliere eventuali residui di siero che avrebbero potuto compromettere o perlomeno ridurre l'efficienza della trasfezione;
- La soluzione è stata poi portata ad un volume finale pari a 1 ml/pozzetto con terreno completo (DMEM senza antibiotici, 10% FBS, 2 mM glutamina) e il preparato contenente il complesso DNA-Calcio Fosfato è stato poi addizionato alle cellule che sono state incubate a 37°C per 5 ore;
- Trascorso questo periodo, sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 2 ml di terreno completo preparato in modo tale che la concentrazione finale di antibiotici e siero sia quella presente in un normale terreno di crescita (10% FBS, 2mM glutamina, penicillina e streptomina 1X). Le cellule sono state poste in incubazione a 37°C per 24 ore;
- Il giorno successivo, le cellule sono state staccate dai pozzetti utilizzando Tripsina-EDTA 1X, e la sospensione cellulare è stata centrifugata a 1000 rpm per 10 minuti. Il surnatante è stato eliminato e

le cellule sono state risospese in 100µl di PBS 1X pH 7.2 sterile e incubate a -20°C overnight;

A questo punto l'intera sospensione cellulare è stata testata per verificare l'effettiva produzione delle proteine di interesse, mediante corsa elettroforetica su gel SDS-PAGE e western blotting, come descritto prima. Purtroppo anche in questo caso non abbiamo ottenuto risultati incoraggianti.

#### *Somministrazione del vaccino a DNA ad un gruppo di pecore*

Sette pecore di razza *sarda* in lattazione, di circa 4 anni d'età, appartenenti al gregge della Clinica Ostetrica della Facoltà di Veterinaria di Sassari sono state messe a nostra disposizione per valutare la risposta anticorpale in seguito alla somministrazione di vaccino a DNA e proteine ricombinanti (utilizzate come controllo positivo). Prima di iniziare il protocollo vaccinale, le pecore sono state sottoposte a visita clinica preliminare per escludere patologie in atto o pregresse, soprattutto quelle a carico dell'apparato mammario.

Per escludere qualsiasi contatto con micoplasmi, abbiamo analizzato campioni di latte, provenienti dalle mammelle destra e sinistra di ciascuna pecora, e campioni di siero. I campioni di latte sono stati analizzati mediante PCR mentre i sieri mediante immunoblotting, come descritto prima.

Tre pecore sono state vaccinate con il costrutto pVAX+P80 e 1 con il pVAX senza inserto; altre 3 con la proteina ricombinante descritta nella figura 5.

Il protocollo vaccinale utilizzato per il pVAX è stato il seguente:

- un inoculo intramuscolo nel piatto della coscia destra di 100 µg di plasmide diluito in acqua milliQ sterile
- un secondo inoculo intramuscolo, a distanza di un mese, della stessa quantità di plasmide nel piatto della coscia sinistra.
- un terzo inoculo intramuscolo, a distanza di un altro mese, sempre della stessa quantità di plasmide.

Il protocollo vaccinale utilizzato per la proteina ricombinante r-P80 è stato il seguente:

- un inoculo sottocute di 50 µg di ciascuna r-P80 diluita in acqua fino a 500 µl e adiuvata con 500 µl di Montanide ISA 50 (ISA = Incomplete Seppic Adjuvant)
- un secondo inoculo sottocute, a distanza di un mese, della stessa quantità di proteina adiuvata sempre con Montanide ISA 50
- un terzo inoculo sottocute, a distanza di un altro mese, sempre della stessa quantità di proteina adiuvata con Montanide ISA 50.

Durante ogni somministrazione sono stati prelevati da ciascuna delle 6 pecore 10 ml di sangue con e senza EDTA. Il siero è servito per analizzare l'andamento anticorpale durante la somministrazione, il sangue non coagulato doveva servire per l'analisi della risposta cellulo-mediata in Real-time PCR. Mentre è stato possibile seguire l'andamento anticorpale (Figura 13) non è stato possibile dotarsi di un apparecchio per la Real-time.

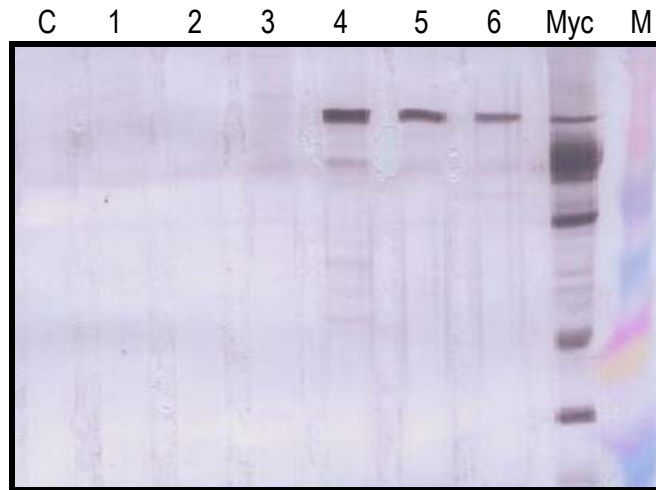
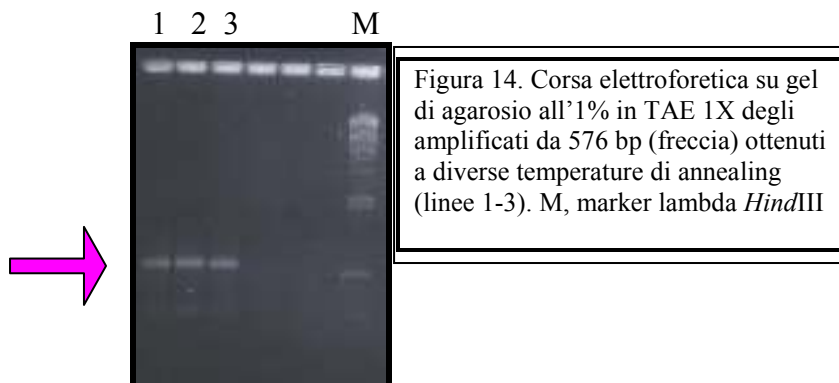


Figura 13. Immunoblotting con i sieri prelevati dalle pecore trattate dopo 15 dal terzo inoculo. Le proteine totali di *Mycoplasma agalactiae* sono state trasferite su nitrocellulosa e successivamente testate con i sieri provenienti dalle pecore inoculate con pVAX+P80 (linee 1, 2 e 3), con PVAX senza inserto (linea C) e con r-P80 (linee 4, 5 e 6). Linea Myc, corrisponde al pool di micoplasmi testati con un siero proveniente da una pecora infetta naturalmente; linea M, marker caleidoscopico (Bio-Rad).

Come si può osservare, il vaccino a DNA non ha indotto nessuna risposta anticorpale, a differenza della proteina ricombinante.

Gli stessi protocolli sono stati applicati per inserire in pVAX un frammento da 576 bp del gene codificante per la P55 (Figura 14).



Anche tale banda è stata inserita in pVAX. I cloni positivi sono stati prima trasfettati in cellule eucariote e successivamente somministrate ad un gruppo di pecore. In parallelo è stata somministrata la proteina ricombinante r-P55.

Purtroppo anche in questo caso non abbiamo ottenuto dal vaccino pVAX+P55 nessuna risposta anticorpale sia *in vitro* che *in vivo* a fronte di un'intensa immunizzazione determinata dalla proteina ricombinante r-P55.

## CONCLUSIONE

Durante la ricerca corrente si sono messe a punto una serie di tecniche atte a inserire frammenti genici in vettori plasmidici adatti alla vaccinazione; nel nostro caso è stato scelto il plasmide pVAX dell'Invitrogen. Due sono stati i frammenti inseriti: uno da 1041bp e un altro da 576 bp. I cloni positivi sono stati sequenziati e successivamente utilizzati per la trasfezione *in vitro*. Contemporaneamente con gli stessi frammenti genici sono state prodotte le proteine ricombinanti r-P80 e r-P55 utilizzando il vettore di espressione pQE (Qiagen). Sia i vaccini a DNA che le proteine ricombinanti sono state somministrate a gruppi di 3 pecore. I vettori pVAX non hanno espresso né *in vitro* né *in vivo*, a differenza delle proteine ricombinanti che hanno indotto una notevole risposta anticorpale.

## BIBLIOGRAFIA

**Ausubel F.M.**, Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith A.A. and Struhl K. (Editors). 1992. Current Protocols in molecular Biology, Vol. I, Wiley Interscience , N.Y.

**Contini A.**, Fadda M., Pittau M., Pintori G..1988. Epidemiologia retrospettiva della Agalassia contagiosa negli ovini in Sardegna 1980-1985. Agric Inform. 3-4.

**Fleury B.**, Bergonier D., Berthelot X., Schlatter Y., Frey J., Vilei EM. 2001. Characterization and analysis of a stable serotype-associated membrane protein (P30) of *Mycoplasma agalactiae*. J. Clin. Microbiol. 39:2814-2822.

**Fleury B.**, Bergonier D., Berthelot X., Peterhans E., Frey J., Vilei E.M. 2002. Characterization of P40, a cytoadhesin of *Mycoplasma agalactiae*. Infect. Immun. 70:5612-5621

**Glew M.D.**, Papazisi L., Poumarat F., Bergonier D., Rosengarten R., Citti C. 2000. Characterization of a multigene family undergoing high-frequency DNA rearrangements and coding for abundant variable surface proteins in *Mycoplasma agalactiae*. Infect. Immun. 68:4539-4548

**Inamine MJ**, Ho KC, Loechel S., Hu PC. 1990. Evidence that UGA is read as a tryptophan codon rather than as a stop codon by *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, and *Mycoplasma gallisepticum*. J. Bacteriol. 172: 504-506

**Laemmli UK**. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

**Leori G.**, Tola S., Carta P., Rocca S., Schianchi G., Crobeddu S., Rolesu S. 1998. Contagious agalactia in Sardinia. In: Leori G., Santini F., Scanziani E., Frey J (eds). *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*. EUR 18018-COST:98-101.

**Rodwell A.W.**, Whitcomb R.F.. 1983. Methods for direct and indirect measurement of mycoplasma growth. *Methods in mycoplasmaology Vol. I*. Academic Press. N.Y.

**Rosati S.**, Pozzi S., Robino P., Montinaro B., Conti A., Fadda M., Pittau M. 1999. P48 major surface antigen of *Mycoplasma agalactiae* is homologous to a *malp* product of *Mycoplasma fermentans* and belongs to a selected family of bacterial lipoprotein. *Infect. Immun.* 67:6213-6216

**Santona A.**, Carta F., Fraghi P., Turrini F. 2002. Mapping antigenic sites of an immunodominant surface lipoprotein of *Mycoplasma agalactiae*, AvgC, with the use of synthetic peptides. *Infect. Immun.* 70: 171-176

**Tola S.**, Rizzu P., Leori G.. 1994. A species-specific DNA probe for the detection of *Mycoplasma agalactiae*. *Vet. Microbiol.* 41: 355-361.

**Tola S.**, Idini G., Manunta D., Galleri G., Angioi A., Rocchigiani AM., Leori G. 1996. Rapid and specific detection of *Mycoplasma agalactiae* by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 51: 77-84.

**Tola S.**, Angioi A., Rocchigiani AM., Idini G., Manunta D., Galleri G., Leori G. 1997. Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 54: 17-22.

**Tola S.**, Manunata D., Cocco M., Turrini F., Rocchigiani AM., Idini G., Angioi A., Leori G. 1997. Characterization of membrane surface proteins of *Mycoplasma agalactiae* during natural infection. FEMS Microbiol. Letters 154: 355-362.

**Tola S.**, Idini G., Rocchigiani A.M., Rocca S., Manunta D., Leori G.. 2001. A physical map of the *Mycoplasma agalactiae* strain PG2 genome. Vet. Microbiol. 80: 121-130.

**Tola S.**, Crobeddu S., Chessa G., Uzzau S., Idini G., Ibba B., Rocca S. 2001. Sequence, cloning, expression and characterization of the 81-kDa surface membrane protein (P80) of *Mycoplasma agalactiae*. FEMS Microbiol. Letters 202: 45-50.