

ESPRESSIONE E CARATTERIZZAZIONE ANTIGENICA DELLA PROTEINA DEL CAPSIDE (VP1) DEL CALICIVIRUS FELINO MEDIANTE BACULOVIRUS RICOMBINANTE

EXPRESSION AND ANTIGENIC CHARACTERIZATION OF FELINE CALICIVIRUS CAPSID PROTEIN (VP1) USING RECOMBINANT BACULOVIRUS

BARBARA DI MARTINO, ILARIA MERIDIANI, FULVIO MARSILIO

Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Università degli Studi di Teramo, Piazza Aldo Moro, 45 - 64100 - Teramo

Riassunto

Nonostante l'impiego su larga scala della vaccinazione nei confronti del Calicivirus felino (FCV), l'infezione sostenuta da questo virus risulta tuttora molto diffusa. Ne consegue quindi la necessità di ricorrere ad una nuova strategia immunizzante efficace e sicura. Nel presente lavoro particelle virus-like (VLPs) sono state prodotte mediante infezione delle cellule di insetto con un baculovirus ricombinante contenente il gene che codifica la proteina capsidica VP1 di FCV. Le VLPs-FCV appaiono morfologicamente e antigenicamente simili alla particella virale infettante e risultano costituite dalla proteina capsidica di FCV di peso molecolare di 60 kDa immunoreattiva in WB e in IFI con un siero policlonale anti-FCV. Sulla base dei risultati da noi ottenuti, la VLP-FCV si prospetta come un'alternativa ai vaccini comunemente impiegati per la profilassi nei confronti della calicivirosi felina.

Summary

Despite widespread use of the vaccination against Feline calicivirus (FCV) infection, FCV still represents a major cause of feline respiratory tract disease. Therefore, a new vaccination strategy is required. In this study, virus-like particles (VLPs) were produced in insect cells infected with a recombinant baculovirus containing the capsid gene of FCV. The FCV VLPs were morphologically similar to the native virus and contained FCV capsid protein (VP1) with a molecular weight of approximately 60 kDa that reacted with a rabbit hyperimmune sera to FCV in Western blotting and IFA test. FCV recombinant protein expressed in the baculovirus system may be used as immunogen against feline calicivirosis could be utilized as immunogen for the recombinant vaccine.

INTRODUZIONE

Il calicivirus felino (FCV), appartenente alla famiglia *Caliciviridae* genere *Vesivirus*, è un virus sprovvisto di *envelope* del diametro approssimativo di 35 nm. Il genoma completo è costituito da un RNA monocatenario poliadenilato di 7960 bp e possiede tre *open reading frames* (ORF): ORF1, codificante per sei proteine non strutturali p5.6, p32, p39, p30, VPg e Pro-pol¹; ORF2, codificante per il precursore della proteina capsidica del peso molecolare di 75 kDa (preVP1) dal quale in seguito a clivaggio proteolitico origina la proteina matura del capsido di 60 kDa (VP1)²; ORF3, situato all'estremità 3' dell'RNA genomico e codificante per una piccola proteina strutturale di 8,5 kDa (VP2) essenziale per la produzione della particella infettante virale³.

FCV rappresenta uno dei patogeni più comunemente associati al complesso delle infezioni delle prime vie respiratorie del gatto (URTD: *Upper Respiratory Tract Disease*), soprattutto per gli animali che vivono in colonie. I soggetti guariti clinicamente possono rimanere eliminatori persistenti anche per anni e dunque costituire una pericolosa fonte di infezione per gli animali recettivi⁴. Nonostante l'impiego su larga scala di vaccini vivi attenuati allestiti con il ceppo F9, FCV risulta tuttora molto diffuso, anche tra i soggetti immunizzati⁴. Ciò potrebbe essere attribuibile alla scarsa cross-protezione che i vaccini comunemente impiegati sono in grado di indurre nei confronti dei ceppi FCV di strada, poiché il virus muta il suo profilo antigenico durante l'infezione portando alla selezione di ceppi antigenicamente diversi dallo stipite vaccinale^{5,6}. Tuttavia, non è da escludere il coinvolgimento dello stesso virus vaccinale attenuato, in quanto è stato anche osservato che FCV F9 è in grado di persistere nelle colonie feline e mu-

¹Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 10/4/2006 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 20/10/2006".

tare nel tempo, fino alla riacquisizione di una parziale virulenza⁷. Inoltre, Pedersen e Hawkins (1995)⁸ hanno dimostrato che tale ceppo risulta sicuro se somministrato per via sottocutanea, ma presenta una certa virulenza residua se somministrato per via oro-nasale. Ne consegue quindi la necessità di ricorrere ad una nuova strategia immunizzante con prodotti vaccinali che non siano in grado di replicare negli animali e non presentino rischi di virulenza residua e ricombinazione.

Tra i vaccini di ultima generazione, le particelle virus-like (VLP) rappresentano una specifica classe di vaccini a subunità che possiedono la caratteristica di mimare la struttura antigenica e morfologica delle particelle virali pur non contenendo materiale genetico infettante⁹.

Le proteine capsidiche di diverse specie di calicivirus umani, quali ad esempio il Norwalk virus (NV) ed il Mexico virus (MxV), sono state espresse in cellule di insetto mediante baculovirus ricombinante^{10,11}. Tali proteine sono in grado di assemblare e generare VLPs antigenicamente e morfologicamente simili alla particella virale infettante, ma sprovviste di acido nucleico e quindi prive di virulenza residua. Inoltre, nell'uomo, gli studi preliminari basati sull'impiego delle NV-VLPs come vaccini hanno confermato la loro totale sicurezza ed immunogenicità⁹.

I baculovirus sono una famiglia di virus patogeni esclusivamente per una grande varietà di artropodi. Tra questi, il *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) e soprattutto l'*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) sono le due specie virali maggiormente impiegate per la produzione di proteine ricombinanti. Nel nucleo delle cellule infettate, questi virus formano corpi inclusi chiamati "poliedri", costituiti per lo più dalla proteina poliedrina, la cui espressione è sotto il controllo del suo stesso promotore. Il gene della poliedrina non è essenziale per la propagazione virale in colture cellulari, e può quindi essere rimpiazzato da un cDNA di interesse, la cui espressione sarà guidata dallo stesso promotore della poliedrina. Il baculovirus ricombinante può essere considerato come uno dei sistemi eucariotici più efficaci e versatili per l'espressione di proteine ricombinanti, garantendo modificazioni post-traduzionali estremamente simili a quelle che avvengono nelle cellule di mammifero.

Scopo del presente lavoro è stato quello di generare particelle calivirus-like impiegando la proteina capsidica VP1 di FCV mediante il sistema di espressione del baculovirus, come prima fase per la produzione di un vaccino ricombinante nei confronti della calicivirus felina.

MATERIALI E METODI

a) Cellule e virus

Per la produzione della VLP è stato utilizzato il ceppo vaccinale F9 di FCV coltivato sulla linea cellulare CrFK (Crandell Feline Kidney) fatta sviluppare in terreno MEM modificato da Dulbecco (D-MEM) arricchito del 10% di siero fetale bovino. Il baculovirus ricombinante basato sul virus poliedrico *Autographa californica* (AcNPV) è stato propagato sulla linea cellulare continua *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*) (Invitrogen) come descritto da King e Possee¹².

b) Costruzione e clonaggio del vettore di trasferimento

L'intero gene codificante la proteina del capsido di FCV-F9 è stato amplificato mediante reverse transcriptase (RT)-PCR impiegando una coppia di primers che includevano all'estremità 5' il sito di restrizione *Bam*H1 (F9 Cp60: 5'-AGA GGA TCC ACC ATG GGG TCA ATC ACA GCA CCC-3'; F9 Cp76: 5'-AGA GGA TCC TCA TAA CTT AGT CAT GGG ACT-3'; [numero di accesso a Genbank: M86379]).

Il gene amplificato (1627 bp) è stato clonato nel sito *Bam*H1 del vettore pAcYM1 sotto il controllo del promotore della poliedrina. Il clonaggio del vettore ingegnerizzato è stato eseguito mediante trasformazione di cellule competenti *E. coli* DH5 α . Il corretto orientamento dell'inserito è stato verificato tramite mappatura con gli enzimi di restrizione e sequenziamento del DNA.

c) Espressione e analisi della proteina ricombinante VP1 in cellule di insetto

Il vettore contenente il gene codificante la proteina del capsido e il DNA linearizzato di AcNPV sono stati impiegati per la co-transfezione della linea cellulare *Sf9*. Il baculovirus ricombinante è stato selezionato e purificato mediante il metodo delle placche sulla base dell'abilità del baculovirus *wild type* in possesso del gene *lacZ* di dare placche di colore blu in presenza del substrato cromogeno X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside).

Al fine di verificare l'avvenuta espressione della proteina ricombinante tutte le placche selezionate sono state dapprima amplificate su cellule *Sf9* e successivamente risospese in buffer di lisi (100 mM Tris-HCl, pH 6.8; 2% sodium dodecyl sulfate [SDS]; 20% glycerol; 0.2% bromophenol blue; 2% β -mercaptoethanol) e analizzate mediante elettroforesi in gel di acrilamide al 10% (SDS-PAGE) e Western blotting (WB) attraverso l'impiego di un siero iperimmune anti-FCV F9 prodotto nel coniglio¹³.

d) Studio della cinetica di espressione della proteina ricombinante VP1

Al fine di determinare la cinetica di produzione della proteina, le cellule *Sf9* infettate con il baculovirus ricombinante ad una densità di crescita di 1×10^6 cellule/ml e con un indice di molteplicità di infezione (MOI) di 3 Unità Formanti Placche (PFU), sono state raccolte quotidianamente dal giorno 1 al giorno 8 post-infezione (PI).

Il surnatante è stato separato dalle cellule mediante centrifugazione a 3000 rpm per 5 minuti. Successivamente i pellets cellulari e i surnatanti sono stati risospesi nel buffer di lisi e sottoposti ad analisi in SDS-PAGE al 10% e WB.

e) Visualizzazione della proteina VP1 mediante test di immunofluorescenza indiretta (IFI)

Per valutare l'espressione di VP1 ricombinante mediante il test IFI, le cellule *Sf9* sono state infettate con il baculovirus ricombinante con MOI di 3 e raccolte a 36 ore PI. Il test è stato eseguito mediante l'impiego di un siero policlonale anti-FCV F9 prodotto nel gatto¹³. La reazione è

stata visualizzata con siero anti-IgG di gatto coniugato con isotiocianato di fluoresceina (*Sigma-Aldrich Co.*).

f) Purificazione e visualizzazione della VLP-FCV

Per la produzione della VLP-FCV, 100 ml di cellule *Sf9* (1×10^6 cellule/ml) sono state infettate con il baculovirus ricombinante con MOI di 3. A 48 ore PI il surnatante è stato separato dalle cellule lisate mediante centrifugazione a 8000 rpm per 20 minuti. La proteina virale è stata quindi concentrata su cuscino di saccarosio al 30% in buffer TEN (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA and 1 M NaCl) mediante centrifugazione a 24000 rpm per 2 ore nel rotore Beckman SW28. Il pellet ottenuto è stato risospeso in una soluzione di cloruro di cesio (CICs) allo 0,42% in buffer TEN e centrifugato over-night a 35000 rpm nel rotore Beckman SW 41. L'espressione della proteina ricombinante è stata valutata sottoponendo n° 13 frazioni purificate a corsa elettroforetica in gel di acrilamide al 10%. L'identità della proteina è stata verificata mediante WB attraverso l'impiego di un siero iperimmune anti-F9 FCV prodotto nel coniglio¹³.

Al fine di studiare la morfologia della VLP, tutte le frazioni contenenti la proteina purificata sono state fissate su retini (400-Mesh) per microscopia elettronica, e dopo colorazione negativa con acido fosfotungstico al 2% (pH 6,5), esaminate al microscopio elettronico a trasmissione (TEM).

RISULTATI

Dopo cotrasfezione delle cellule *Sf9* con il DNA linearizzato di AcNPV e il vettore di trasferimento pAcYM1, il baculovirus ricombinante è stato identificato attraverso il metodo delle placche selezionando soltanto quelle di colore blu.

Le placche ricombinanti sono state quindi prelevate ed utilizzate per infettare le cellule *Sf9* con MOI di 3 PFU. L'analisi mediante elettroforesi in gel di acrilamide al 10% ha rivelato la presenza di una banda del peso molecolare di 60 kDa corrispondente alle dimensioni della proteina capsidica di FCV. L'identità della proteina è stata successivamente confermata mediante WB attraverso l'impiego di un siero iperimmune anti-F9 FCV prodotto nel coniglio (Fig. 1). Al fine di monitorare la cinetica di espressione della proteina ricombinante, le cellule *Sf9* sono state infettate con il baculovirus ricombinante per un tempo complessivo di 8 giorni. L'analisi ha evidenziato una bassa concentrazione della proteina ricombinante nel surnatante al giorno 1 PI; a partire dal giorno 2 la quantità di proteina è aumentata sensibilmente fino a raggiungere il picco di espressione tra il quarto e l'ottavo giorno PI in maniera pressoché simile sia nelle cellule che nei surnatanti. Tuttavia, l'analisi eseguita sulle aliquote collezionate a partire dal giorno 4 PI ha rivelato anche la presenza di due ulteriori bande del peso molecolare approssimativo di 59 e 55 kDa rispettivamente (Fig. 2A), entrambe reattive al siero iperimmune anti-F9 FCV quando analizzate in WB (Fig. 2B).

L'espressione della proteina ricombinate è stata valutata mediante il test IFI che ha evidenziato una fluorescenza citoplasmatica (Fig. 3) analoga a quella che si osserva nelle cellule CrFK durante la replicazione di FCV.

L'osservazione al ME ha permesso di rilevare la presenza delle VLPs nel surnatante a 48 PI. In seguito a purificazione

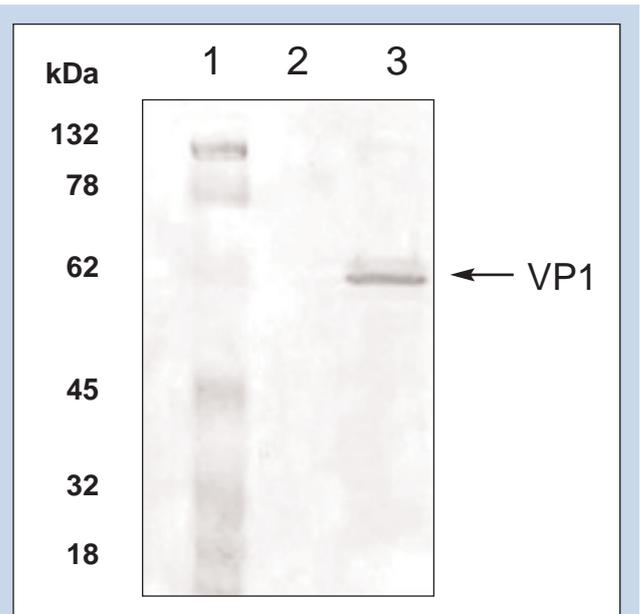


FIGURA 1 - Analisi mediante Western Blotting della proteina capsidica VP1 di FCV espressa in cellule di insetto *Sf9*. Corsia 1: marker molecolare; corsia 2: cellule *Sf9* non infette; corsia 3: proteina VP1 ricombinante espressa in cellule *Sf9* mediante il sistema del baculovirus.

in gradiente di CICs, la maggior parte delle VLPs mostravano un diametro approssimativo di 35 nm, si presentavano vuote perché sprovviste di acido nucleico e morfologicamente simili alla particella virale infettante (Fig. 4A). Un aspetto interessante è quello relativo alla presenza in alcuni campi di osservazione, di particelle VLPs prive delle depressioni a forma di calice tipiche dei calicivirus (Fig. 4B).

DISCUSSIONE

Numerosi vaccini per le infezioni virali si basano sull'impiego di virus vivi attenuati. Tuttavia, la possibile riacquisizione di virulenza può portare allo sviluppo della malattia anche in soggetti vaccinati. Tale evenienza interessa soprattutto quei virus caratterizzati da un alto tasso di mutazioni antigeniche, come ad esempio i calicivirus⁹.

La maggior parte dei vaccini nei confronti dell'infezione sostenuta da FCV si basa sull'impiego del ceppo attenuato F9. Sebbene questo stipite vaccinale sia in grado di prevenire lo sviluppo della malattia, sono stati riportati casi di sintomatologia clinica ed isolamento del virus in gatti vaccinati. Il motivo di questi fallimenti vaccinali non è chiaro, anche se è stato dimostrato che il ceppo F9 non solo è in grado di provocare la malattia, ma anche di indurre uno stato di portatore persistente¹⁴. A tal fine, un nuovo tipo di profilassi immunizzante basata sull'utilizzo delle particelle virus-like risulterebbe più efficace e sicura.

Nel presente lavoro la proteina capsidica di FCV è stata prodotta mediante il sistema di espressione del baculovirus ricombinante ed è stato osservato che la stessa è in grado di assemblare in VLPs immunoreattive quando analizzate in IFI e WB.

In questa prima fase della ricerca, è stata valutata la dinamica di espressione della proteina ricombinante in relazione al tempo di infezione ed è stato osservato che al fine di preservare l'integrità della proteina, il tempo ottimale

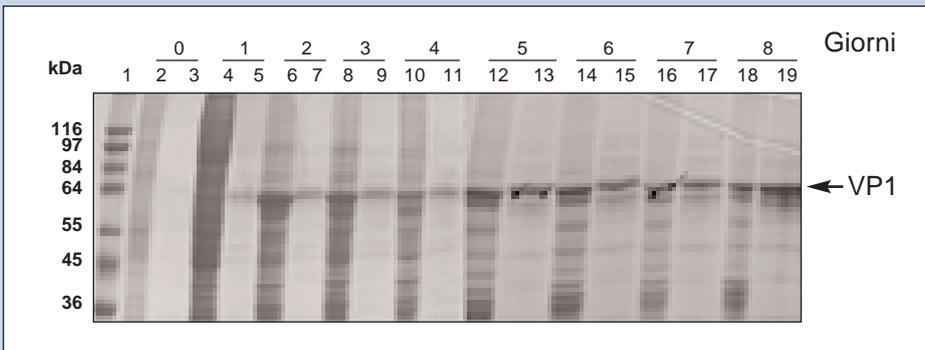


Figura 2A

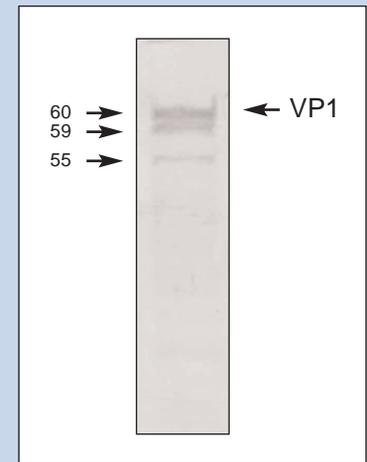


Figura 2B

FIGURA 2 - Studio della cinetica di espressione della proteina ricombinante VP1 di FCV. **A)** Le cellule Sf9 sono state infettate con una MOI di 3 e nei tempi indicati; sia le cellule (corsie 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18) che i rispettivi surnatanti (corsie 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19) sono stati sottoposti a SDS/PAGE al 10% e colorati in blue di Coomassie. Le frecce indicano la posizione della proteina capsidica integra del peso molecolare di 60 kDa e i prodotti di clivaggio di 59 e 55 kDa. **B)** Analisi mediante Western Blotting della proteina VP1 e dei prodotti di clivaggio, tramite l'impiego di un siero iperimmune anti-FCV F9 prodotto nel coniglio.

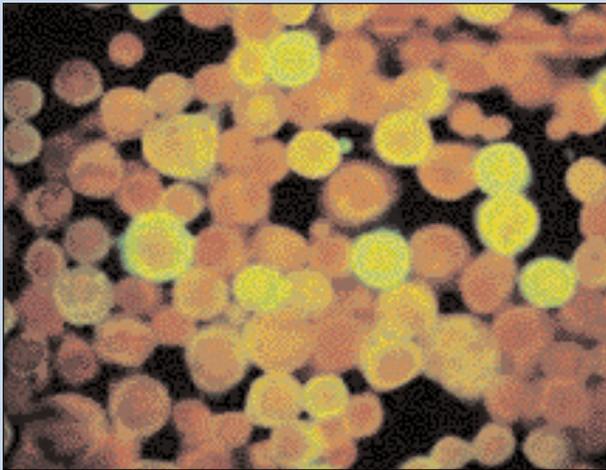


FIGURA 3 - Analisi mediante immunofluorescenza indiretta della proteina capsidica ricombinante VP1 espressa in cellule Sf9, tramite l'impiego di un siero policlonale anti-FCV F9 ottenuto nel gatto. Ingrandimento: 400X.

per la produzione della VLP è a 48 ore PI. A partire dal quarto giorno PI, sia nel surnatante che nelle cellule lisate sono state evidenziate due bande addizionali del peso molecolare di 59 e 55 kDa, entrambe immunoreattive quando analizzate mediante WB. È ipotizzabile che la banda di 60 kDa rappresenti la proteina capsidica nella sua integrità, mentre le due bande di peso molecolare minore siano entrambe prodotti di clivaggio, suggerendo quindi la possibilità che VP1 possa andare incontro a clivaggio proteolitico come precedentemente riportato per altri calicivirus¹⁵.

L'analisi al ME delle frazioni contenenti la proteina ricombinante ha evidenziato la presenza di VLPs sprovviste di acido nucleico e morfologicamente simili alla particella virale infettante. Un dato interessante è quello relativo alla presenza di alcune VLPs prive delle tipiche depressioni a calice (*cup-like depressions*). La natura di tali VLPs non è ancora chiara. Tuttavia ciò potrebbe essere dovuto all'assenza della proteina VP2 la cui azione, sebbene sconosciuta, sembrerebbe essere legata alla capacità di "stabilizzare"

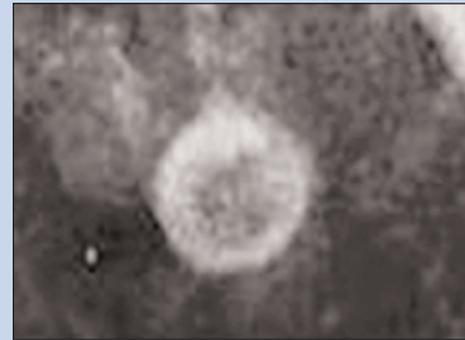


Figura 4A



Figura 4B

FIGURA 4 - Analisi mediante microscopia elettronica della VLP-VP1 di FCV. **A)** La particella VLP presenta dimensioni e caratteristiche morfologiche tipiche delle particelle virali infettanti. **B)** Particella VLP con superficie liscia.

VP1 rendendola in grado di formare le tipiche depressioni. A tale proposito, recenti studi sul NV hanno dimostrato che una delle funzioni di VP2 è proprio la regolazione della stabilità di VP1 durante l'espressione di quest'ultima nelle cellule di insetto. Infatti, è stato osservato che le NV-VLPs contenenti VP2 sono più resistenti alla degradazione proteica e mostrano una maggiore integrità ed omogeneità rispet-

to alle VLPs che ne sono prive¹⁵. Esperimenti in tal senso sono tuttora in corso presso i nostri laboratori.

In conclusione, sulla base dei risultati ottenuti e delle ricerche attualmente in itinere, la proteina capsidica di FCV espressa mediante baculovirus ricombinante si prospetta utile come immunogeno per la produzione di un vaccino ricombinante e come modello per lo studio delle proprietà biologiche e molecolari dei calicivirus. Inoltre, tale metodica potrebbe risultare utile per l'allestimento di kits ELISA ricombinanti finalizzati non solo alla diagnosi sierologica dell'infezione sostenuta da FCV, ma anche alla differenziazione tra i diversi membri della famiglia *Caliciviridae*.

Parole chiave

Baculovirus ricombinante, calicivirus felino, particelle virus-like (VLPs).

Key words

Recombinant baculovirus, feline calicivirus, virus-like particles (VLPs).

Bibliografia

1. Sosnovtsev SV, Garfield M, Green KY: Processing map and essential cleavage sites of the non-structural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *J Virol* 76: 7060-7072, 2002.
2. Carter MJ, Milton ID, Turner PC, et al: Identification and sequence determination of the capsid protein gene of feline calicivirus. *Arch Virol* 122: 223-235, 1992.
3. Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang KO, et al: Feline Calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J Virol* 79: 4012-4024, 2005.
4. Marsilio F, Di Martino B, Decaro N, et al: A novel nested PCR for the diagnosis of calicivirus infections in cat. *Vet Microbiol* 105: 1-7, 2005.
5. Geissler K, Schneider K, Platzer G, et al: Genetic and antigenic heterogeneity among feline calicivirus isolates from distinct disease manifestations. *Virus Res* 67: 175-193, 1997.
6. Lauritzen A, Jarrett O, Sabara M: Serological analysis of feline calicivirus isolates from the United States and United Kingdom. *Vet Microbiol* 56: 55-63, 1997.
7. Radford AD, Sommerville L, Ryvar R, et al: Endemic infection of a cat colony with a feline calicivirus closely related to an isolate used in live attenuated vaccines. *Vaccine* 19: 4358-4362, 2001.
8. Pedersen NC, Hawkins KF: Mechanism for persistence of acute and chronic feline calicivirus infections in the face of vaccination. *Vet Microbiol* 47: 141-156, 1995.
9. Noad R, Roy P: Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol* 11: 438-444, 2003.
10. Jiang X, Wang M, Graham Dy, Estes MK: Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 66: 6527-6532, 1992.
11. Jiang X, Matson D, Ruiz-Palacios GM, et al: Expression, self-assembly, and antigenicity of a Snow Mountain agent-like calicivirus capsid protein. *J Clin Microbiol* 33: 1452-1455, 1995.
12. King LA, Possee RD (ed): *The Baculovirus expression system: a laboratory guide*. Chapman and Hall, London, England, 1992.
13. Buonavoglia C, De Palma MG, Camero M, et al: Correlazione sierologica fra gli stipiti di calicivirus felino (FCV) isolati in Italia e lo stipite vaccinale F9. *Veterinaria* 14: 65-68, 2000.
14. Radford AD, Bennett M, McArdle F, et al: The use of sequence analysis of a feline calicivirus (FCV) hypervariable region in the epidemiological investigation of FCV related disease and vaccine failures. *Vaccine* 15: 1451-1458, 1997.
15. Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, et al: The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol* 21: 11603-11615, 2003.