IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Caratterizzazione proteomica e studio delle proprietà chemiotattiche del *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* – IZSAM 06/08 RC

Massimo Scacchia, Attilio Pini, Ivanka Krasteva, Flavio Sacchini*

Convegno «I risultati della ricerca IZSAM 2012» - CIFIV

Teramo, 23 maggio 2013

Background

- La PPCB rappresenta oggi uno dei più importanti limiti allo sviluppo della zootecnia nell'Africa Sub-sahariana
- Gli strumenti diagnostici e i presidi vaccinali oggi disponibili per il controllo della malattia presentano notevoli limitazioni e nel contesto Africano non sono sufficienti per eradicare la malattia

Principali aree di interesse scientifico sulla PPCB

- Identificazione di "antigeni target del *MmmSC*"
- Nuovi test diagnostici
- Vaccini più efficaci e sicuri

- Comprensione dei meccanismi patogenetici
- Caratterizzazione della risposta immunitaria protettiva

Obiettivi del progetto

- Caratterizzare il proteoma del *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* per l'identificazione di proteine target di membrana e/o citoplasmatiche da impiegare per lo sviluppo di nuovi strumenti diagnostici e vaccinali. (Studi 1 e 2)

- Investigare la capacità del *Mmm*SC di svolgere attività chemiotattica verso i leucociti (granulociti)

Materiali e metodi – studio 1

In una prima fase, è stato condotto uno studio per caratterizzare il proteoma completo di 2 ceppi di *Mmm*SC con diverso grado di patogenicità:

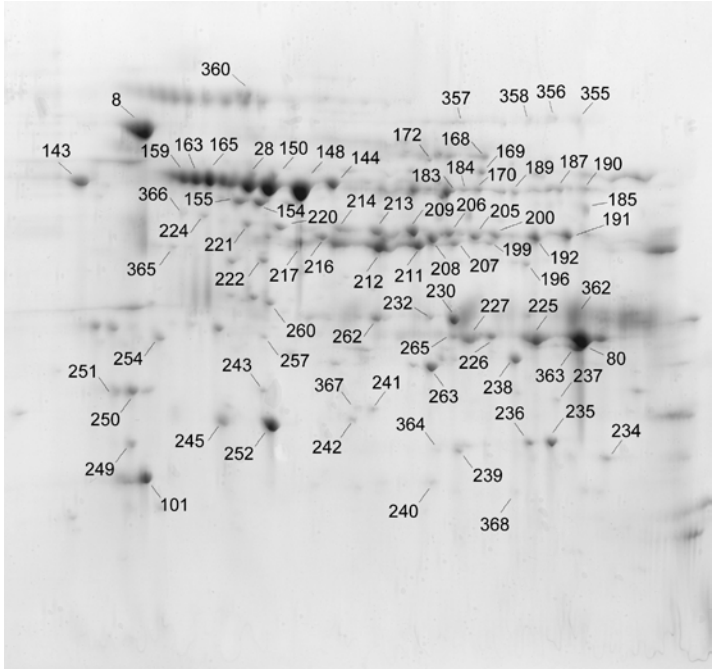
- il ceppo di campo di *Mmm*SC N6 (Botswana), altamente patogeno
- il ceppo vaccinale *Mmm*SC KH3J (Sudan)

M&M: elettroforesi bidimensionale (2-DE)

10 <------- pH -------> 3

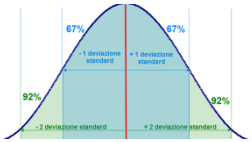
KH3J

N6

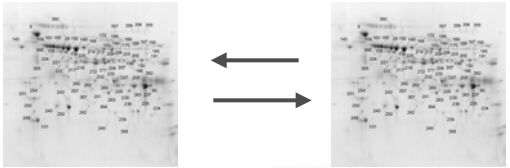


M
W

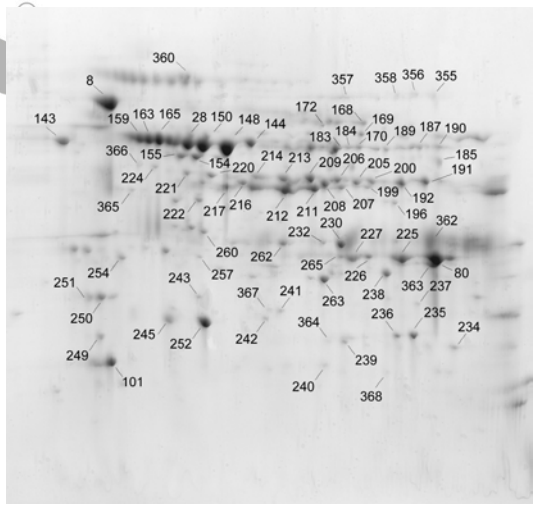
Analisi immagini - Phoretix sftw



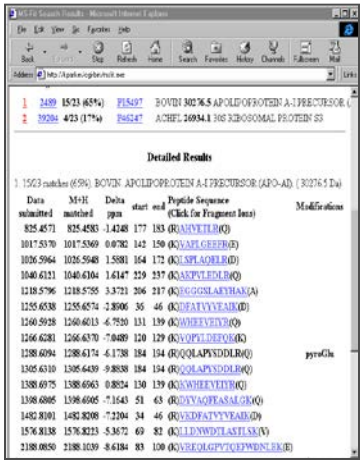
Analisi statistiche



M&M: MALDI-TOF MS/MS

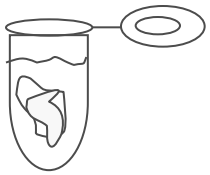


MALDI - ToF



Database search

Run gel, stain



Excise spot; wash; digest

Mmm Gladysdale (Wise *et al.*, 2006)

Mmm PG1 (Westberg *et al.*, 2004)

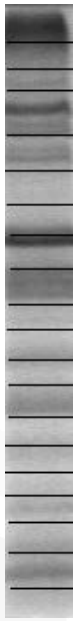
Genome sequencing

M&M: SDS-PAGE e LC-ESI-MS/MS

- Proteine con peso molecolare e punto isoelettrico estremi difficili da analizzare con 2-DE

- Ulteriori analisi per la caratterizzazione del proteoma dei due ceppi di mycoplasma sono state condotte impiegando SDS-PAGE in combinazione con LC-ESI-MS/MS

M&M: SDS-PAGE e LC-ESI-MS/MS



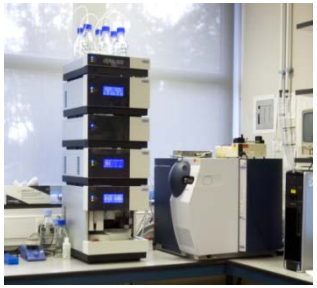
SDS-PAGE gel

Single lane excised from SDS-PAGE gel

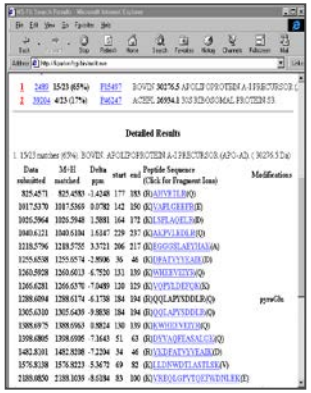
Gel slices (2.5mm)

Immunoblotting

reduction
alkylation
trypsinolysis



LC-ESI-MS/MS



Database search

Risultati – studio 1

	Proteine identificate							
Ceppi *Mmm* SC	Totali	Comuni	Uniche	Totali SDS + LC-MS/MS	Totali 2-DE + Maldi	Esclusive con 2-DE + Maldi	Totali SDS & LC-MS/MS + 2-DE & MALDI	Immuno-geniche
N6	292	239	53	315	52 (49 identificate con SDS + LC-MS/MS)	3	318	18
KH3J	265		26					

- 2-DE e MALDI-TOF ha identificato 52 proteine, principalmente appartenenti a proteine citoplasmatiche
- SDS-PAGE con LC-ESI-MS/MS ha permesso di individuare 315 proteine, includendo molte proteine di membrana e 49/52 proteine identificate con 2-DE + Maldi

Analisi di 9 ceppi *Mmm*SC – studio 2

- Analisi ripetute solo sulle proteine di membrana, purificate mediante frazionamento di fase con Triton X-114, di 9 ceppi di *Mmm*SC (ceppo di riferimento, vaccinale, africani e europei)

- Le proteine così ottenute sono state separate mediante SDS-PAGE e analizzate mediante spettrometria di massa (LC-ESI-MS/MS) come descritto in precedenza

Risultati - studio 2

Ceppi *Mmm*SC	n. Proteine identificate	Proteine uniche	Proteine comuni	Totali	Immunogeniche (B cell Ags)
170 (It)	112	0	67	258	28
PG1 (Rif.)	128	3			
57/13 (It)	132	1			
T1/44 (Vacc.)	190	18			
Afadé (Afr.)	145	6			
Caprivi (Afr.)	122	6			
95 (It)	136	1			
PB90 (Pg)	137	20			
B17 (Afr.)	176	0			

Proteine ricombinanti del *Mmm*SC

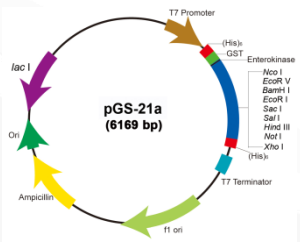
- Il lavoro di caratterizzazione delle proteine del mycoplasma è stato poi completato con lo sviluppo di un protocollo per la sintesi di un pannello di 28 proteine ricombinanti del *Mmm*SC, identificate come immunogene nel bovino

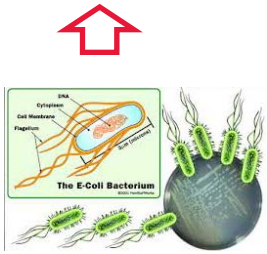
- Le proteine sono state espresse in *E. Coli*, usando protocolli descritti in letteratura (Sambrook e Russell, 2001)

Proteine ricombinanti *MmmSC*

- **Produzione di un pannello di 28 proteine ricombinanti del *MmmSC*, identificate come immunogene nel bovino**

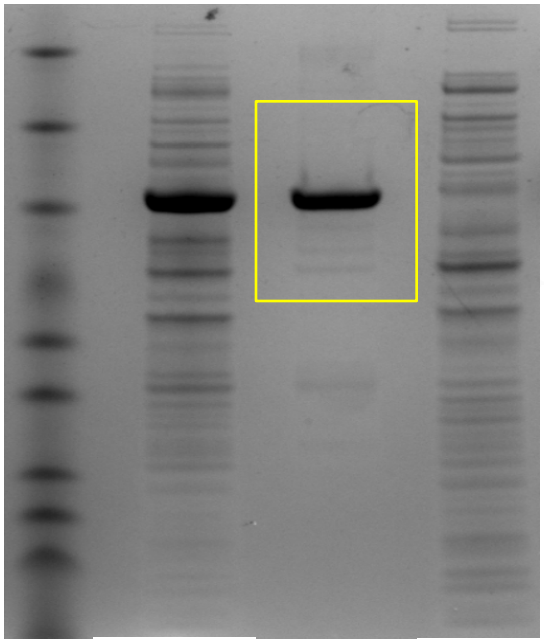
Sequenza genomica proteina *MmmSC*





E. Coli BL 21*

Coltura di E. Coli BL 21*



ST | Non-purificato | Purificato | Non indotte

Analisi delle proprietà chemiotattiche del *Mmm*SC – M&M

- Per le prove sono stati impiegati i surnatanti di colture di 3 ceppi *Mmm*SC: il ceppo patogeno di campo N6, il ceppo vaccinale KH3J e il ceppo di riferimento PG1

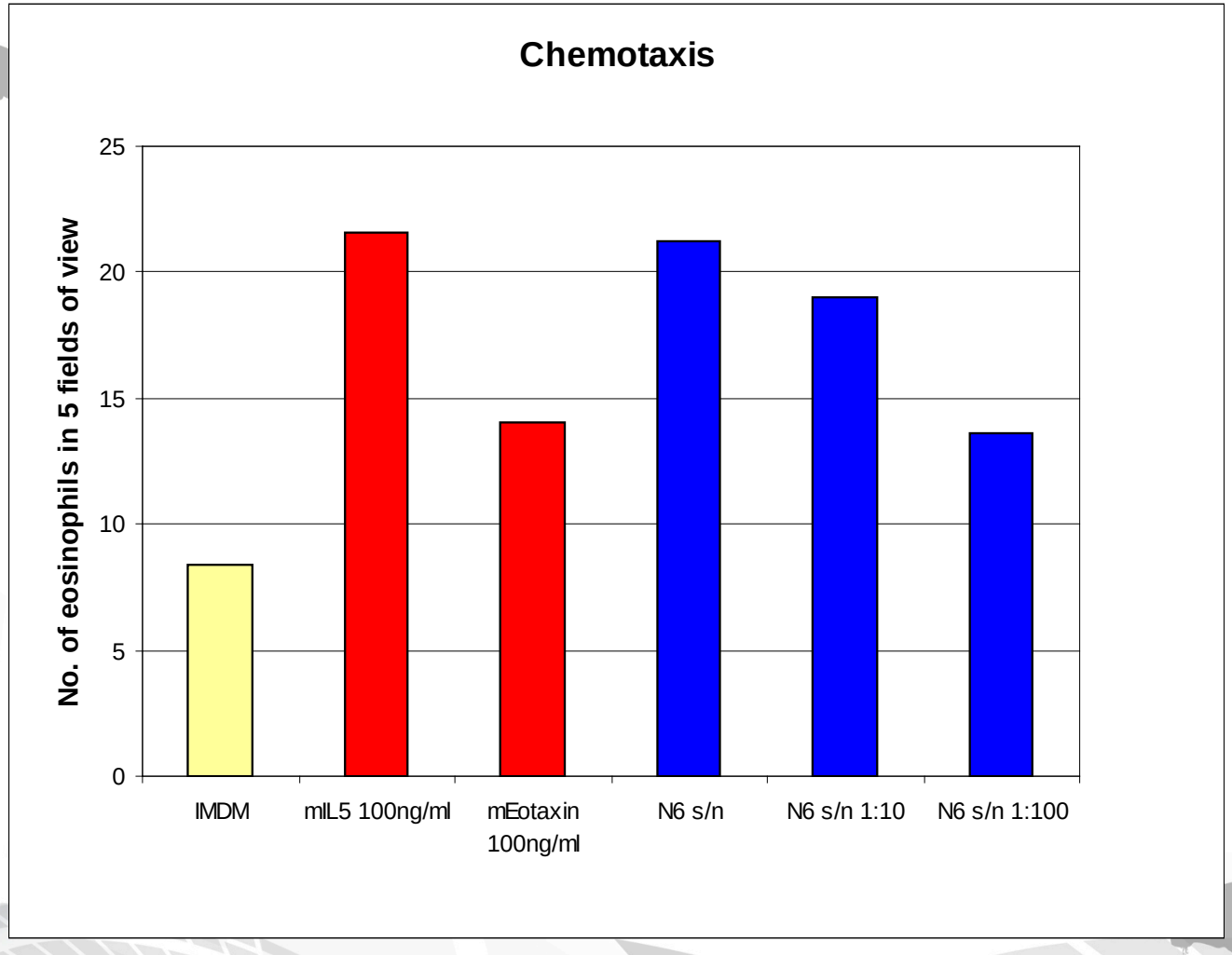
- Gli esperimenti sono stati condotti impiegando eosinofili di ovino e l'attività chemiotattica è stata misurata mediante Boyden blind well chamber

- La migrazione è stata quantificata mediante conta del numero medio di eosinofili per campo ottico osservati sul filtro

Proprietà chemiotattiche: risultati

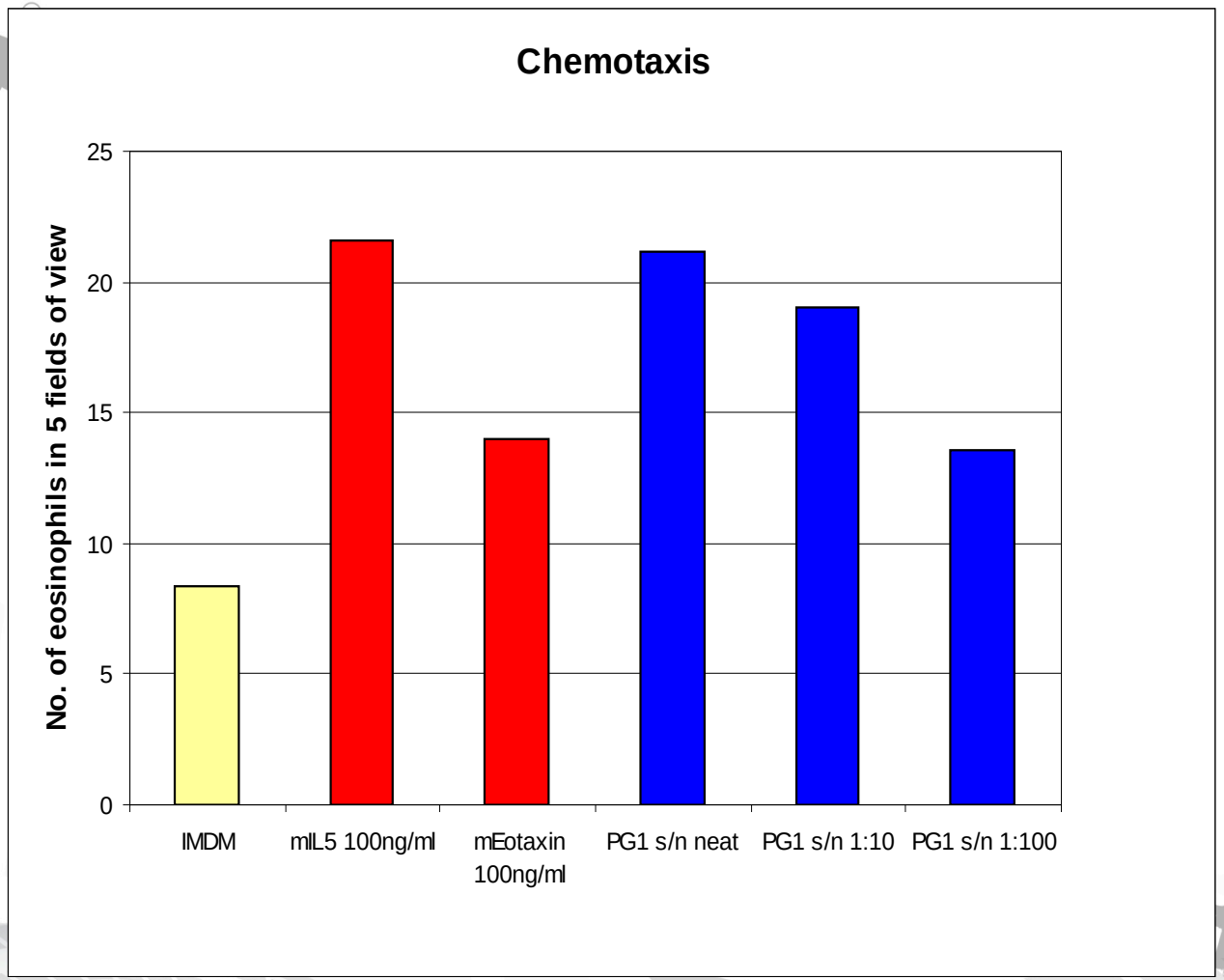
- Gli esperimenti condotti per valutare eventuali attività chemiotattiche promosse dai micoplasmi, mediante rilascio di sostanze nel terreno di crescita, hanno dimostrato che tutti i ceppi *Mmm*SC testati (N6, KH3J e PG1) rilasciano nel terreno di crescita sostanze capaci di attirare gli eosinofili
- I ceppi N6 e PG1 hanno evidenziato proprietà chemiotattiche più accentuate rispetto al ceppo vaccinale attenuato KH3J

Risultati: prove chemiotassi – N6



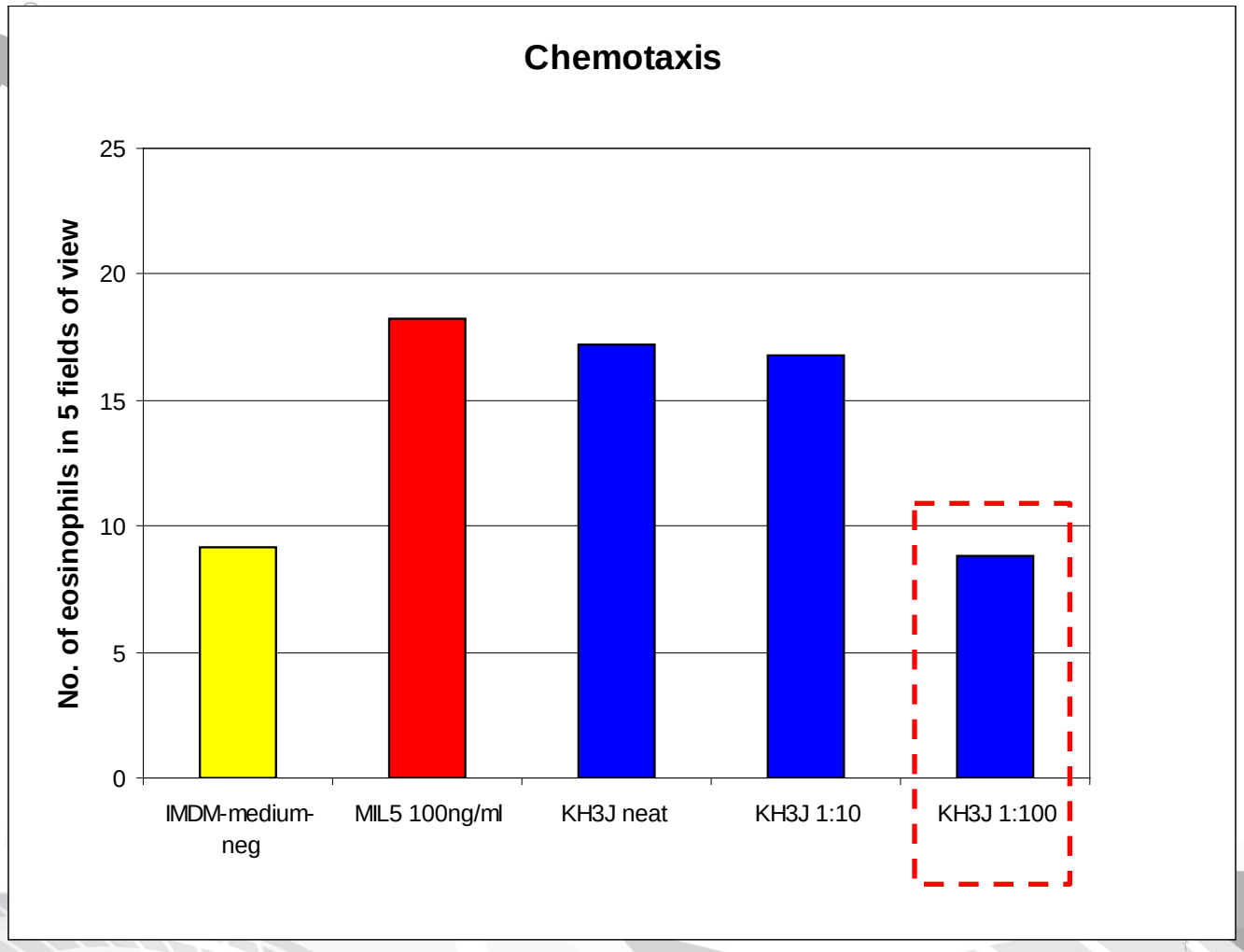
<u>Surnatante</u>
***Mmm*SC N6**
(ceppo di campo africano)

Risultati: prove chemiotassi – PG1



<u>Surnatante</u>
***Mmm*SC PG1**
(ceppo di riferimento)

Risultati: prove chemiotassi – KH3J



<u>Surnatante</u>
***Mmm*SC KH3J (ceppo vaccinale)**

Conclusioni

- Le attività di ricerca svolte rappresentano la più ampia caratterizzazione del proteoma del *Mmm*SC condotta fino ad oggi (11 ceppi)
- La sintesi di proteine ricombinanti offre nuove prospettive per lo sviluppo di nuovi sistemi diagnostici e potenziali vaccini ricombinanti, più sicuri di quelli attualmente impiegati
- Le prove di chemiotassi forniscono il primo dato sulla capacità del *Mmm*SC di promuovere tale attività e aprono ulteriori linee di ricerca sui meccanismi patogenetici (immunità innata) della malattia

Attività future

- Valutazione dell'impiego delle proteine ricombinanti in nuovi sistemi diagnostici (ELISA)
- Studi preliminari per ipotizzare lo sviluppo di un vaccino ricombinante a sub-unità
- Valutazione dell'attività chemiotattica del *Mmm*SC su granulociti neutrofili bovini, frequentemente riscontrati nelle lesioni istopatologiche in corso di PPCB
- Caratterizzazione delle frazioni proteiche con proprietà chemiotattiche

Ringraziamenti

- **Ministero della Salute**
- **Personale IZSAM coinvolto nelle attività PPCB**
- **ILRI**
  - Dr. Joerg Jores
  - Dr. Anne Liljiander
- **Moredun Institute**
  - Dr. John March
  - Dr. David Smith
- **CVRI**
  - Dr. Geoffrey Muuka