

# SVILUPPO DI UN CLONE INFETTIVO DI *METAPNEUMOVIRUS* AVIARE DELETO DEL GENE SH, CODIFICANTE LA PROTEINA GFP (GREEN FLUORESCENT PROTEIN)

Lupini C.<sup>1\*</sup>, Cecchinato M.<sup>2</sup>, Naylor C.J.<sup>3</sup>, Catelli E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Università di Bologna, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano Emilia (BO), Italy*

<sup>2</sup> *Università di Padova, Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Agripolis - Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy*

<sup>3</sup> *University of Liverpool, Department of Veterinary Pathology, Leahurst, CH64 7TE Neston, United Kingdom*

*\*Corresponding author: Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna. Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano dell'Emilia (BO), Italia – Tel. +39 051 2097074 Email: [caterina.lupini@unibo.it](mailto:caterina.lupini@unibo.it)*

## Introduzione

*Metapneumovirus* aviare (AMPV) è causa nel tacchino di una delle principali patologie di questa specie nota come Rinotracheite del Tacchino (TRT). Negli ultimi anni è stato messo a punto un sistema di *reverse genetics* per AMPV (Naylor *et al.*, 2004), che permette di introdurre mutazioni in punti specifiche del genoma, di ottenere cloni virali infettivi modificati e di valutarne le conseguenze fenotipiche (Naylor *et al.*, 2004). Questo sistema di *reverse genetics* è stato utilizzato per ottenere un virus ricombinante incapace di esprimere il gene SH che ha portato alla produzione su cellule Vero di un effetto citopatico anomalo caratterizzato da sincizi giganti (Naylor *et al.*, 2004; Ling *et al.*, 2008). La ragione di tale fenomeno potrebbe risiedere nel cambiamento nel pattern di trascrizione genomica dovuto alla perdita di un'unità trascrizionale. Allo scopo di approfondire tale ipotesi, in questo lavoro, il gene SH è stato sostituito con il gene che codifica per la Green Fluorescent Protein (GFP) che ha lunghezza simile e la cui espressione può essere facilmente evidenziata al microscopio ai raggi UV per via della fluorescenza del suo prodotto.

## Materiali e metodi

**Preparazione del costrutto plasmidico.** Il plasmide contenente il genoma di AMPV deleto del gene SH ( $\Delta$ SH-AMPV) è stato modificato utilizzando mutagenesi sito-specifica (Quikchange; Stratagene) in modo da inserire un sito di restrizione *SalI* immediatamente dopo il segnale di inizio di trascrizione del gene deleto. Siti di restrizione *XhoI* sono stati aggiunti ai due estremi del gene GFP mediante PCR in grado di copiare il gene del plasmide pEcoli-6xHN-GFPuv (Clonetech), utilizzando oligonucleotidi contenenti il sito di riconoscimento *XhoI*. La ligazione fra  $\Delta$ SH-AMPV tagliato in *SalI* e GFP tagliato in *XhoI*, in presenza degli enzimi *SalI* e *XhoI*, ha portato al costrutto plasmidico finale del genoma di AMPV in cui il gene deleto SH è stato sostituito con il gene GFP ( $\Delta$ SH-AMPV-GFP). Tale costrutto plasmidico è stato selezionato ed amplificato mediante: trasformazione di cellule competenti Stb12, successiva PCR di screening, sequenziamento, ulteriore coltura, purificazione del DNA e screening finale con enzimi di restrizione.

**Clone infettivo.** La trasfezione è stata eseguita su cellule Vero inoculate con virus Fowlpox ri-

combinante esprime la polimerasi T7. Le cellule sono state trasfettate, utilizzando Lipofetamina 2000, con il costrutto plasmatico  $\Delta$ SH-AMPV-GFP dell'intero genoma virale ed altri plasmidi in grado di esprimere i geni N (nucleocapside), P (fosfoproteina), M2 (matrice 2<sup>a</sup>) e L (polimerasi). Dopo incubazione per 12 ore a 37°C, il terreno di trasfezione è stato rimosso dal tappeto cellulare e sostituito con terreno di mantenimento. Come controllo è stata eseguita, con metodo analogo, anche la trasfezione di cellule Vero con il costrutto plasmidico iniziale deleto del gene SH ( $\Delta$ SH-AMPV). Le colture cellulari venivano osservate quotidianamente per verificare la presenza di effetto citopatico e monitorate al microscopio a fluorescenza per evidenziare l'espressione di GFP. Sono stati eseguiti tre passaggi seriali.

### **Risultati**

Fluorescenza verde, segno dell'espressione di GFP, è stata osservata nelle cellule trasfettate con il costrutto  $\Delta$ SH-AMPV-GFP, due giorni dopo la trasfezione. Negative alla fluorescenza sono risultate le colture trasfettate con  $\Delta$ SH-AMPV. L'effetto citopatico, in entrambi i casi, è iniziato con sparsi aggregate di cellule che poi confluivano in sincizi giganti. I sincizi indotti dai due virus erano indistinguibili. La fluorescenza è stata mantenuta fino al terzo passaggio mostrando che il gene GFP ha continuato ad essere stabilmente espresso. I virus ricombinanti hanno mostrato proprietà di crescita in coltura simili a quelle del ceppo d'origine selvaggio e l'inserzione di un gene estraneo non ha modificato sostanzialmente le caratteristiche di replicazione *in vitro* di  $\Delta$ SH-AMPV.

### **Discussione**

La simile dimensione della sequenza nucleotidica dei geni SH e GFP indica che l'alterazione dell'effetto citopatico causato dalla delezione del gene SH non è frutto della rimozione di un'unità trascrizionale e del conseguente effetto che ciò può avere sulla trascrizione e/o la traduzione a valle dei geni codificanti per le proteine di adesione e polimerasi. La proteina SH è quindi direttamente responsabile del mantenimento dell'effetto citopatico classico, comunemente osservato a seguito di infezione di cellule Vero con AMPV. Poiché è noto che il titolo virale ottenuto in colture Vero dopo infezione con virus deleto del gene SH sia circa 100 volte inferiore a quello ottenuto con il virus integro (Naylor *et al.*, 2004) si può ipotizzare che la proteina SH sia coinvolta in meccanismi sviluppati dal virus per aumentare l'efficacia della replicazione e quindi la quantità di virus eliminato dall'ospite.

Lo studio inoltre mostra che AMPV è in grado di accettare, esprimere e mantenere fino ad almeno tre passaggi su colture cellulari un gene estraneo. Virus ricombinanti di questo tipo, in grado cioè di esprimere geni eterologhi, possono trovare numerose applicazioni pratiche. Di particolare e promettente interesse l'espressione di proteine eterologhe immunogene di altri virus respiratori aviari, che ne aprirebbe l'utilizzo quale vaccino ricombinate sia per il tacchino che per il pollo. Inoltre per le sue proprietà fluorescenti, AMPV in grado di esprimere la proteina GFP può rivelarsi molto utile in studi di patogenesi.

### **Bibliografia**

Ling R, Sinkovic S, Toquin D, Guionie O, Eterradossi N, Easton AJ (2008). Deletion of the SH gene from avian metapneumovirus has a greater impact on virus production and immunogenicity in turkeys than deletion of the G gene or M2-2 open reading frame. *Journal of General Virology*, 89, 525-533.

Naylor C.J., Brown P.A., Edworthy N., Ling R., Jones R. C., Savage C. E., Easton A. J. (2004) Development of a reverse-genetics system for *Avian pneumovirus* demonstrates that the small hydrophobic (SH) and attachment (G) genes are not essential for virus viability. *Journal of General Virology*, 85, 3219-3227.