

Overflateproteinet MSP2(P44) hos *Anaplasma phagocytophilum*; en mulig vaksinekandidat mot sjodogg på sau?

ERIK G. GRANQUIST¹, ANTHONY F. BARBET², KARIN BERGSTRÖM³, OG SNORRE STUEN¹

Norges veterinærhøgskole, seksjon for småfeforskning og husdyrhelse¹, University of Florida, College of Veterinary Medicine, Department of Infectious Diseases and Pathology², Statens Veterinærmedisinska Anstalt, Uppsala³

Innledning

Anaplasma phagocytophilum er en obligat intracellulær bakterie som overføres med vektoren *Ixodes ricinus* (skogflått) (4). Den forårsaker blant annet sykdommen sjodogg på sau og HGA (human granulocytic anaplasmosis) på menneske (10). I Norge smittes rundt 300.000 lam på beite hvert år og dette gir store økonomiske og dyrevelferdsmessige utfordringer (9). Sykdommen har vært kjent i Norge i over 200 år og vi har i de seinere år sett en øket forekomst av flått og flåttbårne sykdommer. Dette kan settes i sammenheng med klimatiske forandringer, økende bestand av hjortevilt og endret sauehold (8). Det antas at flåttbårne sykdommer og særlig anaplasrose er underdiagnostisert i veterinær – og human medisin (7, 9). *A. phagocytophilum* kan overføres fra flåttens nymfe og voksent stadium.

Ved infeksjoner produserer lymfocytene antistoffer mot overflateproteiner eller andre komponenter (e.g. lipo-polysakkarider eller peptidoglykan) på bakteriens cellemembran. *A. phagocytophilum* har gjennom evolusjonen mistet alle gener som koder for lipo-polysakkarider og de fleste gener som koder for syntesen av peptidoglykan (murein) noe som tyder på at bakteriens overflateproteiner er viktige elementer i kommunikasjonen mellom bakterie og vertscelle (6). Lymfocytene gjenkjenner individuelle deler av antigener (epitoper) ved hjelp av antistoffer eller T-cellereseporer. De fleste proteiner og patogener uttrykker rikelig med B – og T celle epitoper slik at immunforsvaret har en rimelig god sjanse til å oppdage inntrengere. For at *A. phagocytophilum* skal kunne formere seg og være tilgjengelig for overføring til flått har de utviklet mekanismer for å persistere og unngå eliminasjon av kroppens immunforsvar. Ved hjelp av antigenvariasjon kan bakterien uttrykke variable proteiner på overflaten og dermed gjøre seg ugjenkjennelige for immunsystemet (2).

Antigenvariasjon i to overflateproteiner, MSP2 og MSP3 antas å være hovedmekanismene bak persistens hos den nært beslektede bakterien, *A. marginale* (3) og *A. phagocytophilum* deler en rekke genetiske strukturer og patogenetiske egenskaper med denne bakterien (5). De deler også et ”ortologt”

overflateprotein kjent som MSP2(P44). Et nylig studie avdekket både global diversitet i dette overflateproteinet fra varianter samlet fra ulike geografiske områder og identifiserte et ”syntenisk” ekspresjonssete fra samtlige varianter av *A. phagocytophilum* (1). Dette immundominante proteinet har i lengre tid vært i fokus som kandidat for fremtidig vaksineproduksjon mot *A. phagocytophilum*. Overflateproteinet kodes for av en ”multigen” familie med ett ekspresjonssete og omtrent 100 ”paraloge” sekvenser (”pseudogener”) fordelt i bakteriens genom (1). Hele eller deler av disse ”pseudogenene” kan settes inn i ekspresjonssetet slik at nye varianter uttrykkes på overflaten. Studier utført ved Norges veterinærhøgskole har vist at sykklisk rikettsemi (i blodet) forekommer ved persistent infeksjon hos lam samtidig med at det foregår antigenvariasjon i dette overflateproteinet. Proteinene er et adhesin og er nødvendig for at bakterien skal kunne feste seg til vertsceller. Ekspresjonssetet til msp2(p44) består av konserverte 5’ og 3’ ender og en sentral hypervariabel del karakterisert ved substitusjoner, insersjoner og delesjoner (3). Ved PCR, kloning og sekvensering av ekspresjonssetet samt serologiske undersøkelser har vi fulgt infeksjonen i to dyr over 15 uker.

Materiale og Metoder

To lam ble smittet ved eksperimentell poding med en norsk 16S rRNA variant av *A. phagocytophilum* (GenBank accession number M73220). To lam ble holdt som negative kontroller. EDTA blod ble tatt fra *V. jugularis* annen hver dag og serum hver uke gjennom hele infeksjonen. Rektal temperatur og klinisk status ble dokumentert hver morgen.

DNA ble isolert fra EDTA blod og amplifisering av en 77bp sekvens fra den konserverte ”amino-terminalen” av msp2 med tilhørende ”pseudogener” ble utført med sanntids PCR for relativ kvantitering av infeksjonen. Senere ble det 2-kb ekspresjonssetet for MSP2(P44) amplifisert med konvensjonell PCR. ”Amplikonet” ble påvist med gelelektroforese og isolert fra agarosegel. Deretter ble produktet klonet i *E.coli* bakterier for isolering av uttrykte varianter fra hver av infeksjonstoppene. Påvisning av vellykket kloning ble utført ved enzymatisk behandling med EcoRI for frigjøring av klonete sekvenser og elektroforese for å bestemme størrelsen på disse. Senere ble genfragmentene behandlet enzymatisk med EcoRI og RsaI for RFLP (”Restriction Fragment Length Polymorphism”) analyse. DNA fra varianter uttrykt i de ulike infeksjonstoppene ble videre sekvensert.

Ukentlige serumprøver fra de to lammene ble analysert med blant annet western blot og IFAT. I tillegg ble syntetiske peptider fra uttrykte varianter i den sykliske infeksjonen produsert og testet for spesifikk serumrespons mot disse med ”dot blot” analyse.

Resultater

Undersøkelser med PCR av isolert DNA fra EDTA blod avslørte henholdsvis fire og fem perioder med rickettsemi i de to lammene.

RFLP undersøkelse av klonene fra ekspresjonssetet fra varianter uttrykt i de ulike ”rickettsemitoppene” avslørte stor variasjon i *msp2(p44)* genet fra den akutte perioden i begge lammene. Deretter ble det kun funnet én eller svært få uttrykte varianter i påfølgende ”rickettsemitopper”.

Sekvensanalysene av disse klonene viste av den største variasjonen forekommer i den hypervariable regionen av MSP2(P44), mens områdene utenfor disse er relativt godt konserverte. Sekvensanalysene viste også at variasjon forekommer i ekspresjonssetet mellom ”rickettsemitopene” og at variasjonen var størst i den akutte fasen og mer uniform i de senere toppene.

Undersøkelser av serum reaksjonen mot spesifikke peptider fra de ulike HVR viste at lammene serokonverterte omtrent to uker etter poding og at reaksjonen var nokså spesifikk for hver av de uttrykte variantene. Disse immunreaksjonene avtok raskt etter at hver variant ble uttrykt.

Den totale serumresponsen ble analysert ved hjelp av western blot. Som antigen ble det benyttet en kjent human variant av *A. phagocytophilum* (NY 18). Analysen viste at lammene serokonverterte to uker etter poding og responsen var sterkest etter tre uker og deretter avtagende selv om periodisk rickettsemi fortsatt forekom. I tillegg viste analysen at det er kryssreaksjon mellom norske varianter funnet i sau og amerikanske varianter isolert fra menneske.

Konklusjon

Dette studiet viser at antigenvariasjon forekommer hos lam infisert med en norsk 16S rRNA variant av *A. phagocytophilum*. Bakterien uttrykker stor variasjon i overflateproteinet MSP2(P44) i akutt fase av infeksjonen og mindre variasjon i persistent fase. Lammene responderer på variasjonen ved produksjon av spesifikke antistoffer mot hver av disse variantene som dokumentert ved hjelp av syntetiske peptider.

På grunn av stor variasjon i overflateproteinet MSP2(P44) og kortvarig beskyttende immunitet stilles det spørsmålsteget om hvorvidt dette overflateproteinet er godt egnet som vaksinekandidat mot infeksjon med *A. phagocytophilum*.

Referanser

I. Barbet, A. F., A. M. Lundgren, A. R. Alleman, S. Stuen, A. Bjoersdorff, R. N. Brown, N. L. Drzenovich, and J. E. Foley. 2006. Structure of the expression site reveals global

diversity in MSP2 (P44) variants in *Anaplasma phagocytophilum*. *Infection and immunity* 74:6429-6437.

2. Barbet, A. F., P. F. Meeus, M. Belanger, M. V. Bowie, J. Yi, A. M. Lundgren, A. R. Alleman, S. J. Wong, F. K. Chu, U. G. Munderloh, and S. D. Jauron. 2003. Expression of multiple outer membrane protein sequence variants from a single genomic locus of *Anaplasma phagocytophilum*. *Infection and immunity* 71:1706-1718.

3. Brayton, K. A., D. P. Knowles, T. C. McGuire, and G. H. Palmer. 2001. Efficient use of a small genome to generate antigenic diversity in tick-borne ehrlichial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:4130-4135.

4. Carlyon, J. A., and E. Fikrig. 2003. Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell Microbiol* 5:743-754.

5. Granquist, E. G., S. Stuen, A. M. Lundgren, M. Braten, and A. F. Barbet. 2008. Outer membrane protein sequence variation in lambs experimentally infected with *Anaplasma phagocytophilum*. *Infection and immunity* 76:120-126.

6. Lin, M., and Y. Rikihisa. 2003. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infection and immunity* 71:5324-5331.

7. S., S., and K. Bergström. 2008. Human anaplasmosis - en skjult sykdom i Norge? *Tidsskrift for Den norske legeforening* 128:2579-2581.

8. Stuen, S. 2007. *Anaplasma phagocytophilum* - the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Veterinary research communications* 31 Suppl 1:79-84.

9. Stuen, S., and K. Bergstrom. 2001. Serological investigation of granulocytic *Ehrlichia* infection in sheep in Norway. *Acta veterinaria Scandinavica* 42:331-338.

10. Stuen, S., K. Bergstrom, M. Petrovec, I. Van de Pol, and L. M. Schouls. 2003. Differences in clinical manifestations and hematological and serological responses after experimental infection with genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in sheep. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 10:692-695.