

DISTRIBUZIONE DEL DNA PROVIRALE DEL VIRUS VISNA-MAEDI IN POLMONI NATURALMENTE INFETTI

Sanna E., Woodall C.*, Leoni A., Nieddu A.M., Pirino S.

*Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria - Università
di Sassari*

** Department of Veterinary Pathology - Università di Edimburgo*

RIASSUNTO

Allo scopo di rivelare il DNA provirale di Maedi-Visna Virus (MVV) su polmoni ovini con infezione naturale in atto, sono stati utilizzati campioni inclusi in paraffina provenienti da n. 2 pecore positive all'AGID test per Maedi, che presentavano all'esame istologico tipici quadri di polmonite linfoproliferativa interstiziale. Su di essi sono state eseguite prove di ibridazione in situ (i.s.h.) mediante sonda a DNA sintetizzata in PCR, specifica per un segmento di 291 bp del tratto LTR del genoma provirale; la sonda, marcata con digoxigenina, è stata rivelata con sistema antiDIG-AP-NBT.

L'i.s.h. ha consentito di rilevare, in entrambi i casi, segnali forti e regolari localizzati in pneumociti II, epitelii bronchiali e macrofagi. Nei primi i segnali sono stati osservati esclusivamente nel nucleo, mentre i macrofagi hanno manifestato aree positive anche in sede citoplasmatica.

I risultati ottenuti inducono a ritenere che il virus, attraverso l'integrazione della quota provirale in cellule dotate di capacità moltiplicativa, persegua anche una strategia di amplificazione, oltre che di diversificazione genica imputabile all'"infedeltà" della sua trascrittasi inversa

INTRODUZIONE

Nello studio della polmonite lentivirale degli ovini (Maedi), numerosi AA. hanno indagato la presenza e la distribuzione cellulare dell'agente eziologico mediante tecniche di ibridazione in situ atte a rivelare l'RNA virale. Sono state così identificate le cellule-bersaglio dell'infezione e i citotipi primariamente coinvolti nel mantenimento della stessa. Minore interesse è stato invece dedicato al DNA provirale. Il virus Maedi, come gli altri retrovirus, possiede infatti la capacità di "trascrivere" il genoma e di permanere "quiescente" fino a quando le condizioni per la sintesi di proteine transattivanti e per la ricostruzione del virione completo non siano ottimali. Questo particolare meccanismo di "attesa", oltre alla possibilità di mutazioni che interverrebbero nelle complesse fasi trascrizionali e ritrascrizionali, è indubbiamente alla base del lungo decorso della malattie lentivirali e rende ragione della intrinseca pericolosità degli agenti eziologici che, grazie ad esso, riescono anche a costituire una "riserva" inaccessibile alle difese.

Poiché l'entità e l'esatta localizzazione della "pars" trascritta e, conseguentemente, la rilevanza del "serbatoio" polmonare in corso di infezione naturale da MVV non risulta sufficientemente acclarata, ci è parso interessante

procedere a prove specifiche per la rilevazione del DNA provirale su campioni con infezione naturale in atto, nel tentativo di confermarne innanzitutto l'integrazione nucleare e, in secondo luogo, di verificarne la distribuzione cellulare.

MATERIALI E METODI

Scelta dei campioni

Dalla collezione dell'Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria dell'Università di Sassari, venivano prescelti blocchi in paraffina ottenuti da polmoni di n.2 ovini positivi all'AGID test per MVV. All'esame istologico essi presentavano le lesioni caratteristiche della Maedi (linfoproliferazioni nodulari, polmonite interstiziale, iperplasia linfoide peribroncovascolare, iperplasia della muscolatura liscia).

Produzione e marcatura della sonda

Il DNA (MVV str. WLC-1) veniva estratto in fenolo-cloroformio e precipitazione in etanolo. Veniva prescelta una coppia di primers adatta all'amplificazione di un segmento breve (291 bp) ma altamente specifico della regione "Long Terminal Repeats" del genoma del virus:

Sense (8989)5' *TGACACAGCAAATGTAACCGCAAG - 3'*
Antisense (176) 5' *CCACGTTGGGCGCCAGCTGCGAGA - 3'*

Al fine di marcare le sonde, la PCR era eseguita in presenza di un rapporto di concentrazione tra dTTP e DIG-16-dUTP di 3:1 (150 µM:50µM) come descritto da Dennis Lo et al. (1). Alla miscela di amplificazione, preparata seguendo i protocolli usuali, venivano aggiunti 5 µl di DNA target provirale. Le provettine contenenti la miscela completa venivano quindi sottoposte a 35 cicli di PCR, comprendenti una fase di denaturazione a 94°C per 60", una fase di annealing a 50°C per 60" ed una fase di allungamento o replicazione a 72°C per 2'.

Il successo della marcatura veniva controllato mediante elettroforesi in gel di agarosio di 4µl del prodotto di amplificazione. Questo veniva quindi blottato su membrana di nylon caricata positivamente con metodo di trasferimento alcalino (tampone NaOH 0,4M). Il DNA era fissato alla membrana incubandola per 30' a 120°C. La marcatura delle sonde veniva confermata incubando la membrana in presenza di un anticorpo monoclonale anti-digoxigenina (Boheringer Mannheim) coniugato con fosfatasi alcalina ed utilizzando NBT ed X-fosfato per la rilevazione della attività enzimatica. Le sonde erano purificate mediante cromatografia a scambio ionico (QIAGEN PCR purification spin Kit), concentrate con precipitazione in isopropanolo e risospese in 50µl di TE. Esse venivano infine denaturate a 95° C per 5' ed immediatamente raffreddate in bagno ghiacciato.

Ibridazione in situ

Tutta la procedura veniva eseguita per capillarità con sistema Microprobe (Biomed) (2, 3, 4.). Le sezioni, rapidamente sparaffinate in xilolo e alcool assoluto, venivano reidratate e trattate con HCl 0,2 N x 15' (RT),

Triton X-100 0,3% x 15' (RT), Protease K (+2mM CaCl²) 10 mg/ml x 10' a 37°C, Tris-HCl 10mM pH 8,3 x 5' (2 volte) RT; i campioni venivano sottoposti quindi a post-fissazione in paraformaldeide 4% x 2' RT e trattamento con cocktail pre-ibridazione (2xSSPE/50% di formamide) 1h RT. La sonda marcata con digoxigenina veniva diluita 1:100 in buffer di ibridazione standard (Tris 1mM a pH 6,7, Denhardtts 1x, SSPE 2x, formamide 50%, SDS 0,5%, DNA di sperma di salmone 0,25 mg/ml) e il cocktail veniva quindi aspirato sui vetrini. A questo punto si effettuava la denaturazione termica previa incubazione a 100°C per 15' e quindi l'ibridazione (overnight a 37°C). I lavaggi venivano condotti come segue: SSPE 4X 5' RT; SSPE 2X 30' x 2 RT; SSPE 1X 10' RT; SSPE 1 X 30' 50°C; SSPE 1 X 20' RT. La reazione proseguiva quindi con un primo passaggio "blocker", eseguito mediante trattamento per 30' con una soluzione contenente 0,2 ml di Normal Rat Serum, 30 µl di Triton X-100 e Buffer 1 (Tris 0,1M a pH 7,6 + NaCl 0,15M - pH finale corretto a 7,5) portato a 10 ml totali; seguivano quindi: Buffer 1 x 5' RT, Antisiero anti-Digoxigenina coniugato con Fosfatasi alcalina x 2 h RT (composizione: 20 µl anti-DIG-AP Boehringer, 103 µl NRS, 31 µl Triton X-100, Buffer 1 portato a 10 ml), Buffer 1 x 15' (x 2) RT, Buffer 3 x 5' RT (Tris 0,1M a pH 9,5 + NaCl 0,1M + MgCl² 0,05M con pH finale corretto a 9,5). Veniva quindi eseguita, overnight a temperatura ambiente, la rivelazione dell'attività enzimatica (soluzione contenente 45 µl di cromogeno NBT, 35 µl di X-fosfato, 2,3 mg di Levamisolo, 10 ml di Buffer 3); i vetrini venivano infine lavati in acqua deionizzata, rimossi dal sistema per capillarità e montati in Crystal mount Biomeda.

Ad analogo trattamento venivano sottoposti anche campioni di polmone ovino negativi per MVV e campioni positivi che però, al momento dell'ibridazione, venivano trattati con cocktail privo di sonda o con sonda "irrilevante" (specifica per un segmento di 229 bp della sequenza IS900 di *Mycobacterium paratuberculosis*) (5).

Analisi d'immagine

I vetrini venivano sottoposti ad un'analisi d'immagine semplificata: questa era realizzata sovrapponendo al monitor del videomicroscopio un reticolo a maglie regolari; in esso venivano individuati con metodo random alcuni riquadri di calcolo, al cui interno si procedeva alla conta dei segnali e al calcolo delle percentuali dei differenti citotipi positivi; i dati venivano infine sottoposti al test di confronto fra le medie.

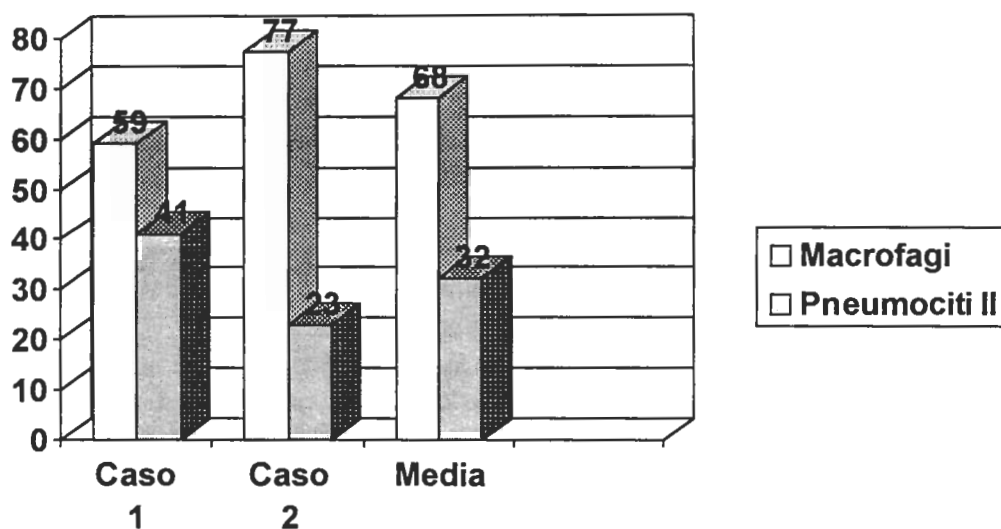
RISULTATI

La produzione e la marcatura della sonda specifica per il segmento di 291 bp della regione LTR veniva confermata dal controllo elettroforetico, che sottolineava una ridotta mobilità del DNA marcato rispetto a quello non marcato.

Positivi riscontri provenivano anche dalle verifiche condotte in Southern blotting mediante sistema Anti-DIG-AP e rivelazione con NBT; in questo caso si osservavano bande distinte corrispondenti all'amplificato marcato con Digoxigenina.

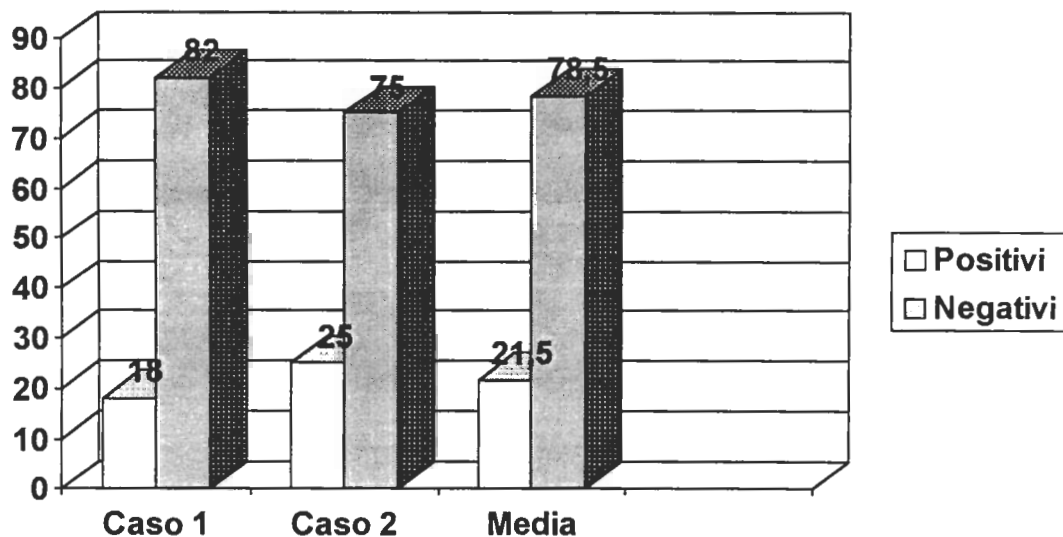
L'ibridazione in situ consentiva di rilevare segnali forti e regolari, in n° medio di $13,5 \times 0,01\text{mm}^2$ nel 1° caso e di $26,25 \times 0,01 \text{ mm}^2$ nel secondo; il confronto fra le medie rilevate su campi diversi dello stesso preparato, consentiva di stabilire che le differenze erano statisticamente non significative ($p>0,5$); la significatività statistica risultava invece elevata per le differenze registrate fra i due diversi casi esaminati. Per quanto riguarda la localizzazione dei segnali, essi venivano osservati all'interno di macrofagi interstiziali (anche in noduli linfoidi), di pneumociti II e di epitelii bronchiali. Nella tabella n.1 vengono riportati i rapporti percentuali fra segnali ottenuti da macrofagi e da pneumociti. Nella tabella 2 è invece schematizzata la percentuale di positività/negatività negli epitelii bronchiali.

Tab. n.1: DNA provirale in macrofagi e pneumociti II. Rapporti percentuali



Riguardo alla percentuale di cellule positive, i dati apparivano piuttosto omogenei; l'attendibilità statistica di tali valori veniva confermata dai risultati del test di confronto fra le medie. Essi sono riportati nella tabella n.2.

Tab. n.2: DNA provirale in epiteli bronchiali



Nei pneumociti II e negli epiteli bronchiali i segnali risultavano prevalentemente localizzati nel nucleo, mentre nel caso dei macrofagi, essi

venivano reperiti alternativamente in sede nucleare e citoplasmatica. Questi ultimi erano presenti tanto nell'interstizio infiammato quanto all'interno delle caratteristiche formazioni nodulari linfoidi.

I preparati controllo risultavano invece costantemente negativi.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

L'esperienza da noi condotta in ordine alla produzione della sonda specifica per la regione LTR, conferma che essa, oltre ad essere di relativa semplicità di allestimento, è anche di soddisfacente riproducibilità.

Le prove di i.s.h. hanno consentito di rilevare forti segnali, oltre che nei macrofagi, anche all'interno dei pneumociti II e degli epitelii bronchiali (in cui il DNA provirale si è presentato spesso in sede endonucleare).

La presenza del DNA provirale in citotipi notevolmente differenti per specializzazione funzionale e addirittura per origine embriologica, farebbe supporre il possesso, da parte del virus, di un *passé-partout* molecolare in grado di garantire l'adesione e la penetrazione in cellule diverse; resta da chiarire il "minimo comun denominatore" che lega tutti i menzionati citotipi all'MVV.

Dal complesso dei dati emersi nel corso dello studio, scaturisce anche un'altra riflessione: l'integrazione nel genoma di cellule suscettibili di intraprendere attività mitotiche (macrofagi, epitelii e pneumociti II) potrebbe condurre a un aumento del contingente di DNA provirale. In altre parole, il virus perseguirebbe, attraverso la "pars" trascritta, una precisa strategia di amplificazione del suo contingente; quest'ultima costituirebbe un ulteriore importante elemento nella patogenesi dell'infezione, unitamente alla diversificazione genica attribuibile alla nota "infedeltà" della sua transcriptasi inversa ($1/10^4$ di frequenza di errore vs. $1/10^9$ delle polimerasi cellulari).

Da ultimo, assai interessante appare l'integrazione a livello bronchiale: essa garantirebbe, a ritrascrizione avvenuta, l'eliminazione dell'agente eziologico per via respiratoria. Oltre che come serbatoio per il mantenimento dell'infezione, il DNA provirale si comporterebbe dunque come riserva anche nei confronti della diffusione della malattia.

BIBLIOGRAFIA

1. Dennis Lo Y.M. et al., in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 1990, Academic Press, 113.
2. Brigati D.J et al., *Virology*, 1983, 126, 32.
3. Montone K.T., *Yale Journ. Biol. and Med.*, 1989, 62, 141.
4. Sanna E. et al., *Proceedings of 12th Europ. Congr. of E.S.V.P.*, 1994, 88.
5. Pittau M., Sanna E. et al. *Proc. 13th Europ. Congr. of E.S.V.P.*, 1995 (in press).
6. Staskus K.A. et al., *Microbial Pathogenesis*, 1991, 11, 67.
7. Haase, A. T., *Nature*, 322, 130, 1986.
8. Haase, A. T., Analysis of viral infections by in situ hybridization, in *In situ Hybridization - Applications to Neurobiology, Symposium Monograph*, Valentino, K. L., Eberwine, J., H., and Barchas, J. D., Eds., Oxford University Press, New York, 1987, 197.
9. Scott J. et al., *Am. J. Path.*, 1995, 146, 1, 250.

Controllo produzione sonda

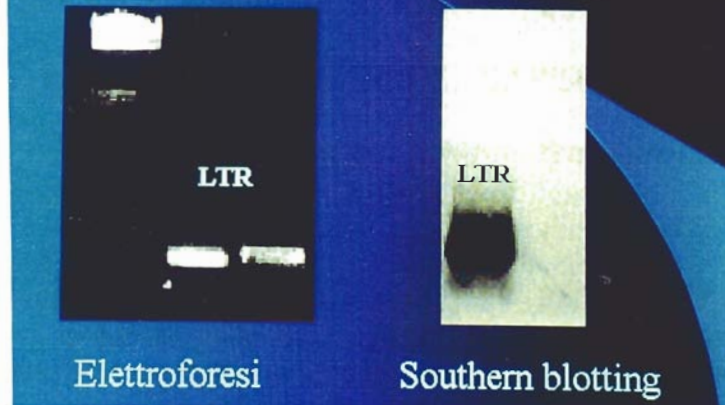


Foto n. 1: controllo della produzione della sonda. A sinistra: elettroforesi su gel di agarosio; mobilità elettroforetica leggermente differente dell'amplificato marcato rispetto a quello non marcato. A destra southern blotting positivo per il prodotto marcato.

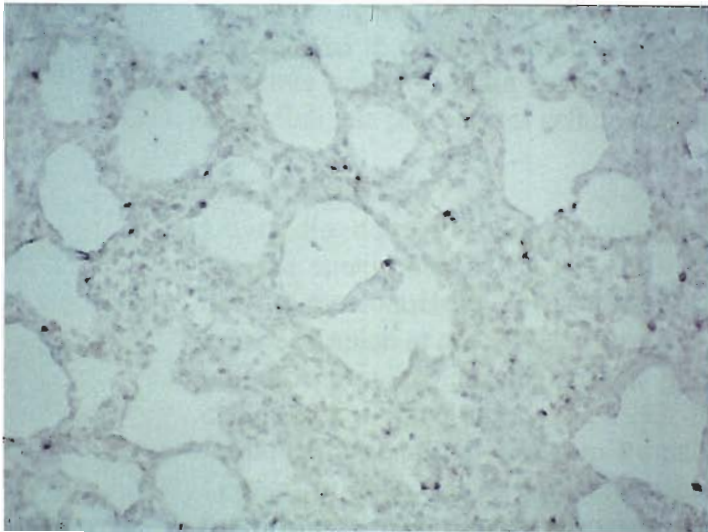


Foto n. 2: segnali di ibridazione nell'interstizio infiammato e a ridosso degli alveoli. NBT, piccolo ingrandimento.

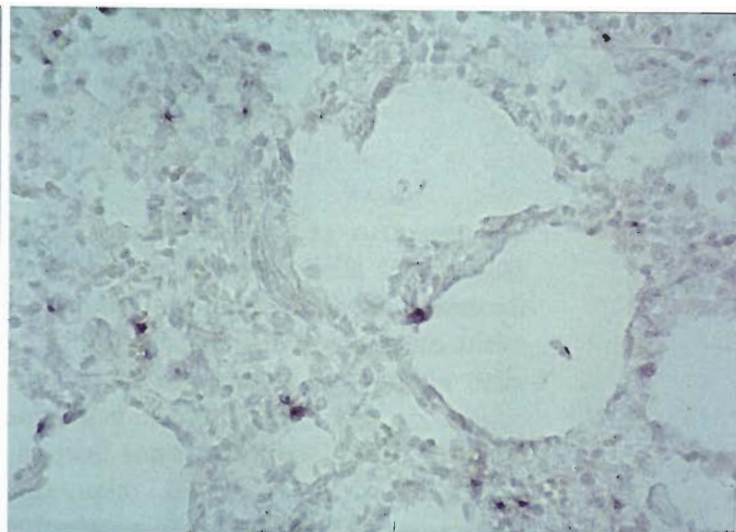


Foto n. 3: segnali in macrofagi interstiziali e in un pneumocito II al centro del campo. NBT, medio ingrandimento.

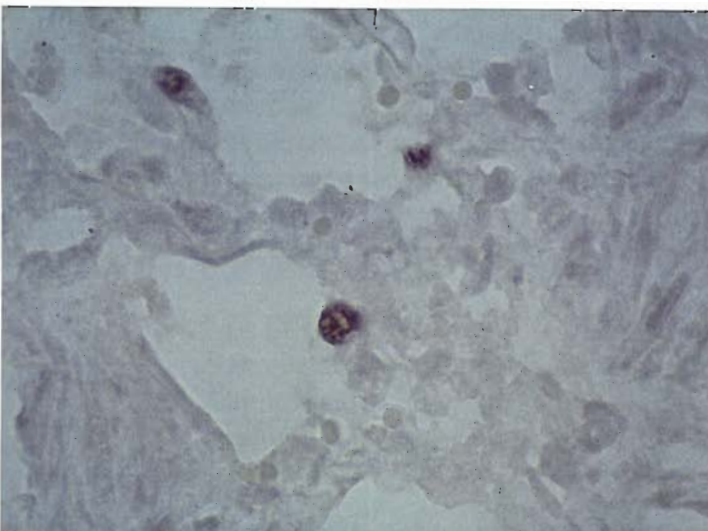


Foto n. 4: in evidenza il nucleo positivo di un pneumocito. NBT, medio ingrandimento.

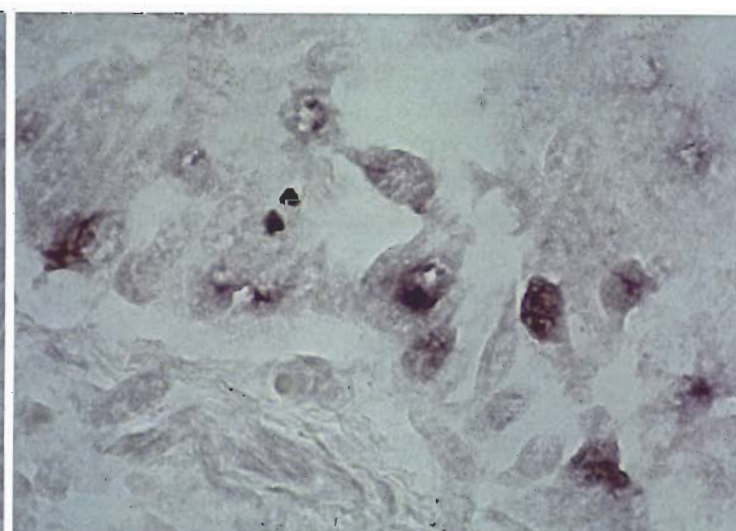


Foto n. 5: segnali di ibridazione all'interno di nuclei di cellule bronchiali. NBT, forte ingrandimento.