

## **RIVELAZIONE IN SITU DI mRNA DI SERV (SHEEP ENDOGENOUS RETROVIRUS) SU TESSUTI DI FETO OVINO: RISULTATI PRELIMINARI**

Sanna E., Sanna M.P., Palmarini M.\*, Leoni A., Nieddu A.M, Sharp M.\*\*

*Settore di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria - Università di Sassari - Italy*

*\*Irvine Cancer Center - California University - U.S.A.*

*\*\*Moredun Research Institute - Edinburgh - U.K.*

### **Introduzione**

Una delle caratteristiche più dibattute dell'Adenomatosi polmonare è costituita dalla sua presunta incapacità di indurre fenomeni immunitari e, in particolare, di stimolare la produzione di anticorpi circolanti. (1, 2). Tale fenomeno sarebbe imputabile all'interferenza immunologica fra l'agente causale, il Jaagsiekte Retro-virus (JSRV) con particolari sequenze endogene denominate, per analogia, Sheep Endogenous Retro-Virus (SERV); queste ultime, presenti in numero di 15-20 copie per genoma (3) sono state ritrovate in una larga varietà di tessuti, sia negli animali colpiti da Adenomatosi che in quelli sani. Il virus endogeno ha dimostrato di essere assai simile all'esogeno: le uniche differenze riguardano il tratto LTR e la risposta ad alcuni enzimi di restrizione nel gene Gag. La questione è indubbiamente complicata dalla possibilità che durante la malattia si stabilisca anche un meccanismo di immunodepressione analogo a quello osservato nel corso di infezioni da virus lenti; a parte le osservazioni sulla accresciuta suscettibilità alle polmoniti batteriche (4), vi è qualche evidenza sperimentale che negli animali colpiti si verifichi un decremento nel rapporto fra linfociti CD4+ e CD8+. Su sezioni di linfonodi mediastinici di ovini affetti da Adenomatosi polmonare, tale rapporto è infatti risultato di 0,44 in sede paracorticale e di 0,55 in sede midollare, a fronte del valore medio normale di 1-1,5 (5). L'osservazione è stata confermata anche con studi di citometria a flusso, nel corso dei quali le compagini CD4 e CD8+ si sono peraltro rivelate positive per DNA provirale di JSRV (6).

Appare comunque chiara, al di là dell'insorgenza di meccanismi immunodepressivi, l'importanza di una eventuale capacità trascrittiva di SERV durante la vita intrauterina: la sintesi di proteine JSRV-like potrebbe infatti interagire

negativamente con la produzione di risposte immunitarie nei confronti dell'agente eziologico dell'Adenomatosi polmonare.

Con l'obiettivo di chiarire questo particolare aspetto, abbiamo messo a punto una tecnica di ibridazione in situ atta a rivelare l'RNA di SERV su tessuti di feto e di placenta ovina e di ciò riferiremo nella presente nota.

### **Materiali e metodi**

Sono stati utilizzati tessuti di timo, linfonodi meseraici e polmoni di n. 2 feti ovini a termine e relative placente. I campioni, prelevati sterilmente, venivano fissati in paraformaldeide al 4% per 23 ore e quindi inclusi in paraffina. Le sezioni, tagliate allo spessore di 6 $\mu$ , erano trattate allo scopo di preservare l'RNA e pertanto processate con materiali RNasi-"free"; a tale scopo le soluzioni venivano addizionate con DEPC (dietilpirocarbonato) allo 0,1%. I passaggi venivano eseguiti all'interno di un sistema "capillary gap" (Microprobe Biomeda). I campioni erano montati su vetrini speciali (Biomeda Microprobe Probe-On Plus) e, previo passaggio a 70°C per 10', sparaffinati in Xilolo/ Alcool assoluto e reidratati; essi venivano quindi trattati con HCl 0,2N per 15' (RT), Triton X-100 0,3% per 15' (RT), Protease K 5  $\mu$ g/ml x 5' a 37°C; dopo 3 lavaggi in PBS di 5', veniva effettuata una post-fissazione in paraformaldeide al 4% per 5' (RT). Dopo ulteriori lavaggi in PBS e in acqua sterile, le sezioni venivano trattate con una soluzione acquosa contenente TEA (trietanolamina) 0,1 M ed anidride acetica 0,25% per 10' (RT) e, quindi, ripetutamente lavate in PBS.

A questo punto, al fine di rimuovere il DNA presente nelle sezioni, queste erano incubate con una soluzione contenente 280  $\mu$ l di Dnasi "Rnasi-Free" 10U/ $\mu$ l in 780  $\mu$ l di tampone per Dnasi (20mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> a pH 8 per 25' a 37°C; seguiva la denaturazione dell'enzima realizzata con lavaggi in PBS e passaggio a 80°C per 5'. Le sezioni venivano successivamente trattate con cocktail pre-ibridazione (2x SSPE/formamide 1:1) per 1 h a 37°C.

Come sonde rivelatrici dell'RNA di SERV venivano impiegate le seguenti sequenze oligonucleotidiche marcate con digoxigenina (Sarda Bioanalysis, Cagliari):

1) *endltr 428 AGCAAGAGTGCACCTGCACAGGGAAGAG*

2) *endltr 360 ATGGGGTTGAGAGGGATCAGCCCAAAT*

3) *endltr 152 GACAGGTTGCAGGAACTGGACATCTTGAAG*

4) *endltr 113* GATAAAATTCTTGAGGGGGGGCAGGACAGG

5) *endgag 91* CAATGCCTTGCATGTAGGAGGGTCCAATGTC

6) *endgag 160* TCTTGTTCCGGGCTTGCTGCTGGAAAAGTAC

Le sonde venivano diluite in buffer di ibridazione (1x Denhardtts, 5x SSPE, 0,1 mg/ml di DNA di sperma di salmone, 50% di formamide) fino ad una concentrazione di 0,5 ng/μl ciascuna. Il cocktail veniva diffuso attraverso gli spazi capillari dei vetrini e, a questo punto, si effettuava la denaturazione a 80°C per 3' seguita dall'ibridazione (overnight) a 37°C.

I lavaggi venivano condotti come segue: SSPE 6X/45% di formamide per 15' a 42°C x 2; SSPE 2X 5' (RT) x 2; SSPE 0,2X 5' a 50°C x 2; buffer 1 (0,1 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,5) 1' (RT). La reazione proseguiva con il trattamento per 30' con una soluzione contenente 20 μl di Normal Rat Serum, 3 μl di Triton X-100 0,3% e Buffer 1 portato ad un ml totale; scopo di tale passaggio era quello di bloccare le fosfatasi alcaline endogene; seguivano quindi: antisiero anti-digoxigenina coniugato con fosfatasi alcalina per 2 h (RT) al buio (10,3 ml NRS, 3,1 μl Triton X-100 0,3%, 2 μl Anti-Dig/AP Boehringer, Buffer 1 portato a 1 ml), Buffer 1 per 15' (RT) x 2, Buffer 3 2' (RT) (0,1M Tris, 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl<sub>2</sub> pH 9,5). Veniva quindi eseguita, a 37°C x 5 ore, la rivelazione dell'attività enzimatica [soluzione contenente NBT/BCIP: 20 μl di stock solution (Kit Boehringer "Dig Nucleic Acid Detection"), 1 ml di Buffer 3]; i vetrini venivano infine lavati in acqua deionizzata, rimossi dal sistema per capillarità e montati in medium acquoso.

I medesimi campioni venivano inoltre trattati omettendo il passaggio in Dnasi.

Come controlli venivano infine utilizzati sicuri negativi (reni di coniglio).

Sezioni parallele di timo, linfonodi e polmoni fetali, oltrechè di placenti, venivano infine colorate con Ematossilina-Eosina per il controllo istologico.

## **Risultati**

I tests rivelavano segnali intracitoplasmatici in linfonodi mediastinici, timo e polmoni fetali, oltrechè in cellule dell'emiplacenta materna.

Nel feto, particolarmente interessante appariva il quadro osservato nel linfonodo: dopo trattamento Dnasico, si apprezzava infatti un consistente numero di segnali nella

midollare (foto n. 1), perlopiù localizzati nel citoplasma di linfociti di piccole e medie dimensioni (foto n. 2)

Per quanto riguarda il timo, le aree di positività si attestavano nella pars midollare dei lobuli (foto n. 3), coinvolgendo voluminosi elementi reticolo-epiteliali rigonfi oltrechè un limitato numero di linfociti (foto n. 4).

Il polmone, per contro, risultava pressochè negativo, eccezion fatta per qualche cellula epiteliale bronchiolare, che manifestava piccole marcature puntiformi intracitoplasmatiche (foto n. 5).

Riguardo alla placenta, nei cotiledoni si osservavano, dopo trattamento Dnasico, aree di positività a carico di cellule diverse (foto n. 6), con chiare zone di marcatura citoplasmatica nel sinciziotrofoblasto (foto n. 7), che confermavano anche in questo organo la presenza di RNA di SERV.

## **Discussione**

Alla luce dei risultati ottenuti, è possibile proporre alcune riflessioni, sia di metodo che di sostanza.

Dal punto di vista strettamente tecnico, la tecnica da noi prescelta presentava alcune difficoltà obiettive, derivanti soprattutto dalla necessità di conservare l'RNA target e di evitare ibridazioni con il DNA provirale integrato. Il primo aspetto veniva risolto con l'adozione di un protocollo mirato a preservare la sterilità dei campioni per tutta la durata della reazione e con l'impiego di materiali RNAsi-"free". L'uso della cappa a flusso laminare e di reagenti addizionati con DEPC (Dietilpirocarbonato) si dimostrava, in tal senso, irrinunciabile. Quanto alla "pulitura" del segnale da ibridi con il DNA, questa era realizzata in due modi: da un lato "forzando" la stringenza dei lavaggi, nella consapevolezza che gli ibridi RNA-DNA sono termicamente più stabili di quelli DNA-DNA; dall'altro procedendo a trattamenti con DNAsi prima dell'ibridazione. In teoria, si sarebbe potuta percorrere anche un'altra strada: quella di effettuare controlli "in negativo": o eliminando RNA presente con pre-trattamenti a base di RNAsi Dnasi "free", o demolendo gli ibridi marcati dopo l'ibridazione mediante RNAsi H. La procedura adottata, alla luce della esclusiva localizzazione intracitoplasmatica dei segnali, si è dimostrata tuttavia sufficientemente affidabile.

Quanto ai risultati ottenuti, essi rappresentano sicuramente una novità. Finora la comprensione dei meccanismi di infezione e diffusione della Adenomatosi polmonare

era stata affidata principalmente alle tecniche di PCR in fase liquida. Queste ultime, sebbene altamente sensibili e specifiche, non sono in grado di identificare SERV e JSRV nei tessuti, lasciando irrisolto il problema delle cellule permissive nei confronti dei due retrovirus. Ciò, va da sé, non consente di chiarire appieno la patogenesi della malattia. La tecnica da noi impiegata ha invece consentito di fare luce su un aspetto, a nostro avviso, di importanza cruciale: i citotipi interessanti dalla presenza di SERV durante la vita fetale. Si ricorderà come, nell'introduzione, si richiamasse la discordanza di opinioni presente nella comunità scientifica circa il ruolo e l'importanza delle sequenze endogene. La loro eventuale attività trascrizionale, ove presente durante la vita fetale, potrebbe in teoria indurre le difese a considerare "self" alcuni antigeni di provenienza esogena, con il risultato che l'animale adulto, quando colpito dalla malattia, non riuscirebbe a produrre una risposta immunitaria completa e/o efficace.

La nostra esperienza dimostra che nel feto ovino è in realtà presente RNA retrovirale endogeno. Quest'ultimo si attesta in organi, come il timo, assolutamente cruciali sul piano immunologico. Oltretutto, le sequenze di SERV risultano espresse da diverse cellule, quali i voluminosi elementi di probabile derivazione reticolo-epiteliale e i linfociti; questi ultimi, per quanto in misura limitata, sono positivi anche nei linfonodi; per contro, il segnale nei polmoni appare scarsissimo. Rimarchevole appare invece la marcatura riscontrata nel sincizio-trofoblasto.

In definitiva, sulla base dei risultati ottenuti, si può affermare che la presenza di attività trascrittive da parte di SERV durante la vita fetale risulta confermata. Le posizioni di coloro che invocano un'insufficienza di risposte immunitarie in corso di Adenomatosi, trovano in effetti conforto nei dati testè riportati. Naturalmente, prima di trarre conclusioni definitive, è necessario estendere le osservazioni a un numero più ampio di casi.

## **Bibliografia**

- 1) SHARP, J. M. & MARTIN, W. B.: "Chronic respiratory virus infections". In *Diseases of Sheep*, pp. I2-I7. Edited by W. B. Martin. Oxford: *Blackwell Scientific Publications*. 1983
- 2) VERWOERD, D. W.: "Jaagsiekte (ovine pulmonary adenomatosis) virus". In *Virus Infections of Ruminants*, pp. 453-463. Edited by Z. Dinter & B. Morein. New York: Elsevier Science Publishers, 1990

- 3) J. MIKE SHARP: "Contagious neoplasms of small ruminants: past, present and future issues", 3rd. European Workshop on Ovine and Caprine Retroviruses Jaca, Spain. 2nd-5th March, 1997.
- 4) ROSADIO, R. & SHARP, J. M.: "Leukocyte frequency alterations in sheep with naturally and experimentally induced lung cancer". *Medicina Veterinaria*, **9**, 49-51, 1992.
- 5) SANNA E. , MASALA G., LEONI A., NIEDDU A.M., PITTAU G., PORCU R.: "Linfoadenite mediastinica in corso di Adenomatosi Polomonare. Studio di Alcune sottopopolazioni linfocitarie ". *Atti S.I.S.Vet.*, **48**, 1019-1022, 1994.
- 6) HOLLAND M.J., PALMARINI M., DALZIEL R.G., SHARP M.: "Jaagsiekte sheep retrovirus proviral burden in lymphocyte subsets isolated from mediastinal lymph nodes of sheep affected by pulmonary adenomatosis", *Proc. 3<sup>rd</sup> European Workshop on Ovine and Caprine Retrovirus*, Jaca, Spain, 37,1997.