

Białaczka kotów w ujęciu molekularnym

BEATA MIZAK, RAFAŁ SAWICKI, ARTUR RZEŻUTKA

Zakład Chorób Zwierząt Mięsożernych i Futerkowych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Mizak B., Sawicki R., Rzeżutka A.

The molecular aspect of Feline leukemia

Summary

Feline Leukemia Virus (FeLV) is widely spread in cat populations all over the world. Frequency of infection is dependent upon conditions in breeding colonies. This paper described the structure of FeLV, its genome organization, and production of viral proteins. Pathogenesis of FeLV infection as well as immune factors responsible for protecting cats against the disease were also demonstrated.

Keywords: virus, feline leukemia, genome, proteins.

Wirus białaczki kotów (FeLV) jest szeroko rozpowszechniony w świecie (4). Częstość występowania zakażeń w poszczególnych krajach jest uzależniona od warunków utrzymania zwierząt (11). Koty mające dużą swobodę są w większym stopniu narażone na zakażenie, w wyniku bezpośredniego kontaktu z innymi chorymi przedstawicielami tego gatunku (2-6, 10, 11). Dużą rolę w transmisji zarazka odgrywa wspólne używanie misek i poidełek oraz wzajemna toaleta zwierząt (4, 10, 11). Rany w postaci ukąszeń i zadrapań, odniesione przez koty podczas walk, stanowią bramę zakażenia, gdyż wirus wydalany jest ze śliną chorych zwierząt. Płody mogą ulegać zakażeniu wewnątrzmacicznemu (2, 4, 6, 10, 11), a młode kocięta zakażają się podczas ssania (4). Możliwa jest też jatrogenna droga infekcji (4, 10) oraz poprzez transfuzję krwi (2).

Na podstawie testu seroneutralizacji FeLV podzielono na podtypy: A, B i C. Różnią się one właściwościami otoczki i chorobotwórczością (3, 7, 10, 14). Badania przeprowadzone wśród populacji zakażonych kotów wykazały, że podtyp A wirusa wywoływał infekcję u 50% chorych zwierząt. Mieszane infekcje podtypami A i B wirusa FeLV występowały u 49% zakażonych kotów, a 1% stanowiła infekcja wywołana przez wirusy podtypów A, B i C. Uważa się, że wirusy podtypów B i C są bardziej zjadliwe, ale mniej inwazyjne i nie mogą same wywołać infekcji. Wirus podtypu A, będąc tzw. wirusem pomocniczym, wspomaga namnażanie się wirusów podtypów B i C (4, 10).

Wirus FeLV, zaliczany do rodziny *Retroviridae*, jest wirusem RNA, kształtu kulistego, o średnicy 110-115 nm. Wirus okrywa lipidowa otoczka, z której wystają na wzór „szpilki” transmembranowe glikoproteiny

p15E połączone mostkami dwusiarczkowymi z powierzchniowymi glikoproteinami gp70 stanowiącymi główny antygen wirusa (4, 6). Glikoproteiny te odpowiedzialne są za łączenie się wirusa z receptorami komórek. Pod otoczką znajduje się dwuwarstwowa membrana lipidowa, której wewnątrz stanowi matrix – białko pozbawione wyraźnej struktury, w którym zakotwiczone jest transmembranowe białko p15E. Rdzeń wirusa jest zbudowany z jednołańcuchowego RNA, a ponadto w jego skład wchodzi: odwrotna transkryптаza, białka p27 i p15C oraz nukleoproteina p10. Rdzeń jest otoczony kapsydem i płaszczem białkowym p12 (4, 9) (ryc. 1).

Schemat organizacji genomu wirusa FeLV przedstawiono na ryc. 2. Bezpośrednio za grupą m7G od końca 5', znajduje się sekwencja oznaczona jako IR – odwrotne powtórzenie. Ta sama sekwencja znajduje się przed poliA – strukturą zabezpieczającą koniec 3' genomowego RNA wirusa przed nukleazami komórkowymi. IR odgrywa ważną rolę w procesie odwrotnej transkrypcji (9).

Za IR znajduje się sekwencja unikalna U5, pierwszy region kopiowany w odwrotnej transkrypcji posiadający sygnał niezbędny do integracji wirusowego DNA z genomem gospodarza.

Badania nad mięsakiem limfatycznym wywodzącym się z limfocytów T wykazały istnienie kilku miejsc szczególnie częstych insercji wirusa i miejsc częstych rearanżacji genów będących efektem zakażenia wirusem FeLV. Najczęściej uszkodzonym genem jest c-myc, kodujący jądrową fosfoproteinę zaliczaną do rodziny czynników transkrypcyjnych. Ulega on ekspresji w proliferujących komórkach różnych linii. Utrata kontroli nad jego ekspresją predysponuje do powstawania

guzów o różnym pochodzeniu tkanowym, w tym rozrostowych zmian nowotworowych w węzłach chłonnych.

Obok *c-myc*, częstym miejscem insercji prowirusa wykrywanym w guzach indukowanych przez FeLV jest gen *flvi 2* – koci homolog proto-onkogenu *bmi-1*, który jest często aktywowany u myszy transgenicznym przez Moloney murine leukemia virus (1).

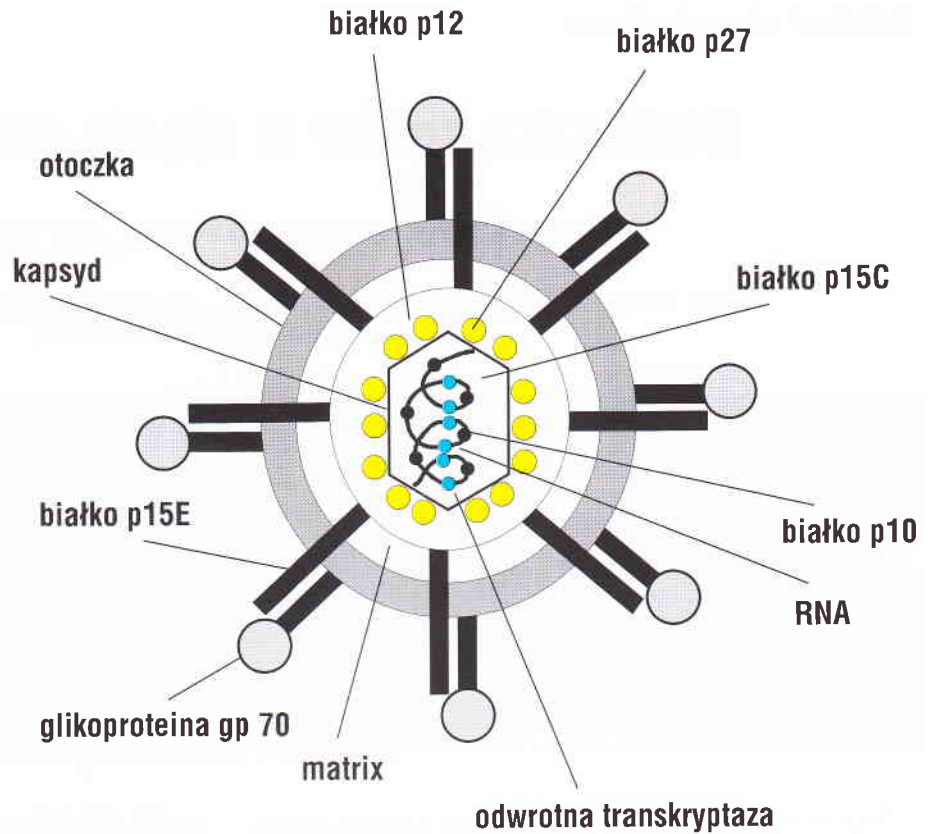
Kolejnym miejscem lokalizacji prowirusa FeLV jest gen *pim-1* kodujący onkogen – cytoplazmatyczną kinazę, zlokalizowany na kocim chromosomie B2. Wykazano, że każde z wymienionych miejsc insercji może prowadzić do proliferacji nowotworowej (17).

Bezpośrednio za regionem U5 znajduje się miejsce wiązania primera tRNA – PBS (primer binding site), za którym rozpoczyna się region kodujący białka strukturalne i regulacyjne wirusa. Podobnie jak u wszystkich reowirusów, region ten złożony jest z trzech genów: *gag*, *pol* i *env* (9, 12).

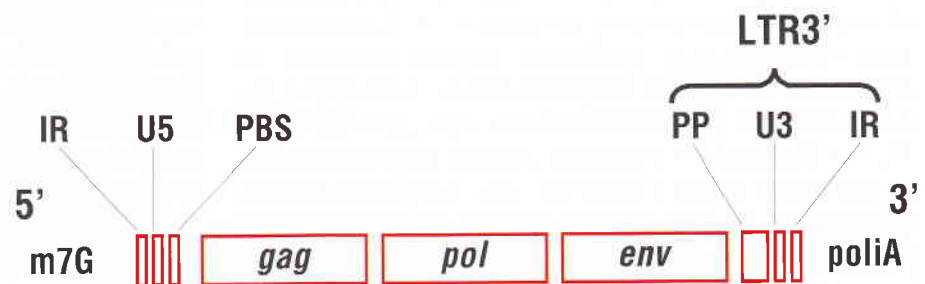
ORF genu *gag* koduje nieglikozylowane białko prekursorowe Pr65^{gag}, które zawiera białko matrix, białka wiążące się z kwasami nukleinowymi oraz białka rdzenia wirionu generowane przez proteolityczne cięcie prekursora, w kolejności: p15, p12, p27 oraz p10 (ryc. 3) (9, 12).

Analiza genu *pol* wykazała, że koduje on trzy białka: proteazę odpowiedzialną za cięcie poliprotein powstających z genów *gag*, *pol* i *env*, odwrotną transkryptazę i integrację niezbędną do wbudowania wirusa w genom zakazanej komórki (ryc. 3).

Gen *env* koduje glikoproteiny otoczkowe, które powstają z dojrzałego subgenomowego mRNA zawierającego sekwencje z 5' końca genomu wirusa i sekwencję kodującą (ORF) genu *env* (7). Retrowirusowe glikoproteiny otoczkowe są syntetyzowane jako pojedyncze łańcuchy prekursorowe, które następnie są trawione na dwie podjednostki powierzchniowe. W przypadku FeLV jest to glikoproteina gp70 i transmembranowe białko p15E. Glikoproteiny powierzchniowe odpowiadają za wiązanie receptora. Podjednostka p15E posiada hydrofobowy peptyd fuzyjny (FP) i domenę transmembranową (TM), które biorą bezpośredni udział w fuzji wirusa i komórki docelowej, po związaniu receptora (ryc. 4) (8).



Ryc. 1. Schemat budowy wirusa białaczki kotów



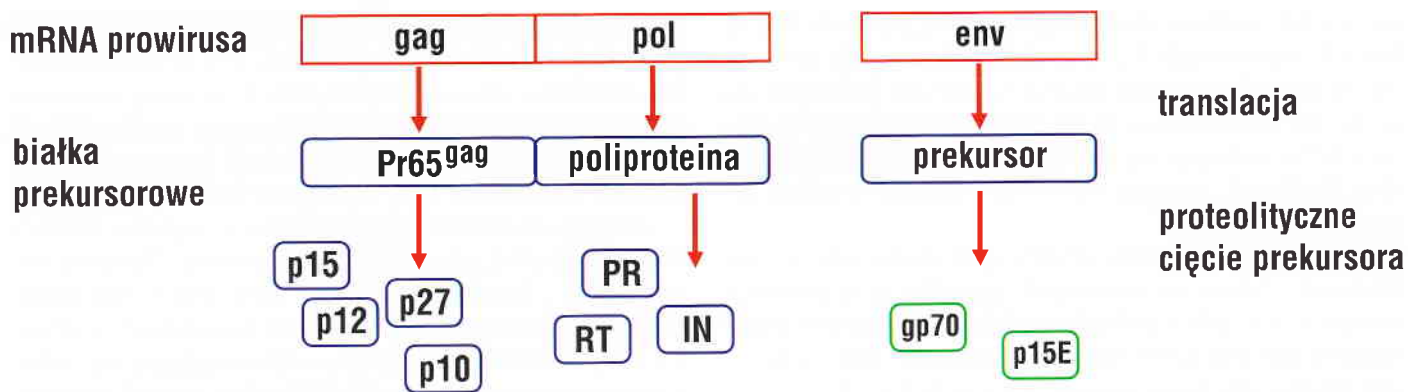
Ryc. 2. Schemat organizacji genomu wirusa FeLV. m7G, poliA – sekwencje zabezpieczające, IR – odwrotne powtórzenia, U5, U3 – sekwencje unikalne, PBS – miejsce wiązania primera, *gag*, *pol*, *env* – geny strukturalne wirusa, PP – polypurine tract (region bogaty w reszty purynowe)

Glikoproteiny powierzchniowe FeLV zawierają miejsca specyficzne dla poszczególnych podtypów wirusa oraz epitopy indukujące produkcję przeciwciał neutralizujących. Determinanty grupowe zlokalizowane są na małym rejonie zmiennym (VR1) przy N końcowej części glikoproteiny gp70.

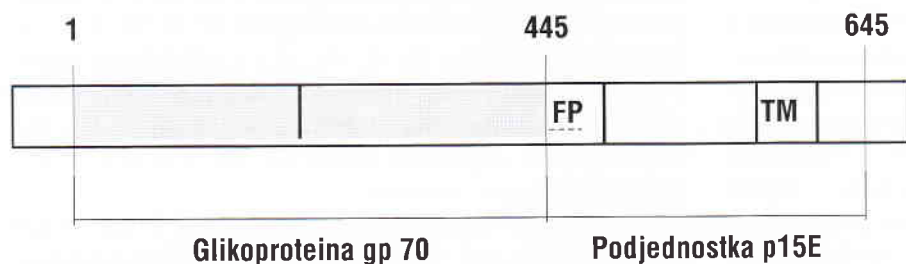
Istnienie trzech podtypów wirusa białaczki do tej pory było kojarzone z obecnością trzech różnych receptorów komórkowych dla każdej z podgrup.

Za częścią kodującą geny *gag*, *pol* i *env* wirusa białaczki znajduje się region bogaty w puryny tzw. polypurine tract (PP). Jest to miejsce, które nie ulega trawieniu przez RNazę H i służy jako primer do syntezy dodatniej nici DNA (9, 12).

Bezpośrednio za PP znajduje się region U3, który tworzy koniec 5' LTR (long terminal repeats) powsta-



Ryc. 3. Schemat powstawania dojrzałych białek wirusa FeLV. p15 i p27 – białka rdzenia, p12 – białko płaszczka, p10 – nukleoproteina, PR – proteaza, RT – odwrotna transkryptaza, IN – integraza, gp70 – glikoproteina powierzchniowa, p15E – białko transmembranowe



Ryc. 4. Organizacja genu kodującego glikoproteinę otoczkową p15E

jący po odwrotnej transkrypcji. LTR tworzy sekwencje regulatorowe ograniczające z obu stron region kodujący prowirusa. Region U3 zawiera elementy promotorowe i enhancery (wzmacniacze) transkrypcji, niezbędne do ekspresji genów (13). Prowirusy FeLV izolowane z chłoniaka grasicy posiadają w tym rejonie podwójne wzmocnienie, natomiast LTR szczepów mało patogennych zawierają jedynie pojedynczą kopię enhancera (16). U kotów z ostrą białaczką limfatyczną znaleziono charakterystyczne, powtarzające się sekwencje tzw. URE (upstream region of the enhancer), w rejonie pomiędzy odwróconym powtórzeniem (IR) i wzmacniaczem. Sekwencje URE posiadają miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych, a ich obecność wpływa na zwiększenie aktywności transkrypcyjnej LTR w niektórych liniach komórkowych. Przypuszcza się, że obecność powtarzających się sekwencji URE powoduje przyspieszenie wystąpienia ostrej białaczki szpikowej (12).

Miejszem wniknięcia zarazka do organizmu jest najczęściej błona śluzowa jamy ustnej i nosa. Początkowo wirus namnaża się w limfocytach i makrofagach migdałków (2, 4, 6, 10), skąd drogą limfatyczną dociera do węzłów chłonnych głowy i szyi, w których dochodzi do jego replikacji. Następnie wirus przedostaje się i namnaża w tkance limfatycznej jelit, szpiku kostnym, tkance limfatycznej grasicy, śledziony i pozostałych węzłów chłonnych (4, 6, 10). W drugim tygodniu trwania zakażenia obecność wirusa można wykazać nie tylko w zakażonych limfocytach i ma-

krofagach, ale także w granulocytach oraz trombocytach krwi obwodowej. Jego obecność można ponadto stwierdzić w błonie śluzowej jamy ustnej, gardła, jelit, pęcherza moczowego i gruczołach ślinowych, skąd jest wydalany w największej koncentracji ze śliną oraz z kałem i moczem (4).

W zależności od zjadliwości wirusa, wielkości dawki zakaźnej i stanu czynnościowego układu odporno-

ściowego kota, możliwe są różne kliniczne formy przebiegu infekcji. U 60% kotów zakażonych naturalnie dochodzi do wytworzenia przeciwciał neutralizujących, które są w stanie wyeliminować wirus z organizmu, co zapobiega rozwojowi choroby. U kotów mających niskie poziomy przeciwciał wirus nie jest całkowicie likwidowany i u takich zwierząt infekcja przechodzi w tzw. stan utajenia. W tym okresie wirus nie namnaża się i nie można go stwierdzić we krwi. Genom wirusowy jest włączony do genomu komórek gospodarza tj. komórek węzłów chłonnych i szpiku kostnego. Na skutek stresu wirus znajdujący się przez wiele miesięcy w stanie latencji może się uaktywnić doprowadzając do wirerii (4).

W trakcie istniejącego zakażenia wirusem białaczki podtypu A u kotów może dojść do ujawnienia się innych jednostek chorobowych (4), głównie: FIP (2, 5, 10, 11), FAIDS (2, 11, 15) oraz wirusowych zakażeń górnych dróg oddechowych (10, 11). Mullins i wsp. (11) udowodnili, że FeLV-A powoduje immunosupresję, podobną do tej, jaką obserwuje się przy zakażeniu wirusem FIV. Immunosupresja i towarzysząca jej limfopenia są wynikiem błędów powstałych w trakcie replikacji wirusa w zakażonych komórkach szpiku kostnego i węzłów chłonnych. Powstałe wadliwe kopie prowirusowego DNA nie mogą zostać wbudowane do genomu komórki gospodarza i gromadzą się w cytoplazmie oddziałując toksycznie na komórkę (4).

Podtyp B wirusa białaczki powoduje u zakażonych zwierząt wystąpienie zmian mieloproliferacyjnych (4),

natomiast zmiany morfologiczne i biochemiczne w kociach limfocytach T₄, charakterystyczne dla apoptozy, są wywołane przez podtyp C wirusa. Indukowana przez niego apoptoza może spowodować atrofię grasicy przyczyniając się do zaburzenia funkcji limfocytów. Podtyp C wirusa wykazuje również tropizm do makrofagów (4).

Wirus mięsaka kotów (FeSV) jest mutantem wirusa białaczki. Może on namnażać się tylko przy pomocy wirusa FeLV, gdyż do budowy białek wirusowych potrzebna jest mu odwrotna transkryptaza, enzym który jest kodowany przez genom wirusa FeLV (4).

W obronie organizmu przed zakażeniem wirusem FeLV biorą udział limfocyty T, B, makrofagi, dopełniacz i interferon. Przeciwciała neutralizujące skierowane przeciwko glikoproteinie gp 70 podtypów A, B i C wirusa białaczki chronią koty przed wiramią i uaktywnieniem się infekcji latentnej (4, 10). Zapobiegają one połączeniu się wirusa z komórką uniemożliwiając w ten sposób jej zakażenie. Innym rodzajem immunoglobulin są przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi związanemu z błoną komórek będących po transformacji nowotworowej (FOCMA – feline oncornavirus – associated cell membrane antigen) (4, 10). Uważa się, że przeciwciała te mają zdolność rozpoznawania antygenów nowotworowych w zmienionych komórkach. Chronią one zwierzęta przed infekcją, ale nie eliminują wirusa z krwi, zapobiegają natomiast wystąpieniu chorób mieloproliferacyjnych, leukemii i mięsaka limfatycznego (2, 4). W badaniach *in vitro* wykazano, że przeciwciała anty-FOCMA, łącznie z komplemtem niszczą zmienione nowotworowo komórki limfatyczne.

Niektóre koty wytwarzają przeciwciała skierowane przeciwko innym niż gp70 białkom wirusowym. Nie zapobiegają one wiramii, lecz tworzą immunokompleksy z antygenem FeLV. Nadmiar antygeny przyczynia się do powstawania małych i średnich kompleksów, które powodują niedobór składników dopełniacza pogłębiając istniejącą immunosupresję (4, 10). W zwalczaniu infekcji bierze udział również interferon. W odróżnieniu od innych chorób wirusowych, gdzie produkcja α i β interferonu zachodzi równolegle do obecności wirusa we krwi (4), w przebiegu białaczki jego obecność była stwierdzana w surowicy zakażonych zwierząt, przed wystąpieniem wiramii.

Dużą rolę w zakażeniach retrowirusowych odgrywa odporność komórkowa. Cytotoksyczne limfocyty T eliminują zakażone komórki szpiku kostnego oraz komórki nowotworowe (4). Również makrofagi biorą udział w eliminacji wirusa we wczesnej fazie infekcji. U większości zakażonych kotów obserwuje się znaczne osłabienie układu odpornościowego wynikające z dysfunkcji limfocytów (4, 6), zakłócenia fagocytozy oraz wtórnego niedoboru składników dopełniacza. To działanie immunosupresyjne jest przypisywane proteinie p15E wirusa FeLV, która jest w stanie hamować funkcje limfocytów T, granulocytów i monocytów (4, 6,

10). Białko p15E wiążąc się z limfocytami CD₄ znosi produkcję interleukiny 2 (IL-2) (6, 17), co zaburza proces różnicowania się limfocytów B, syntezy immunoglobulin oraz funkcji cytotoksycznych limfocytów T, makrofagów i naturalnych komórek bójczych. Także funkcja limfocytów CD₈ wydaje się być zakłócona (17).

Zmiany chorobowe powstające w wyniku infekcji można określić jako pierwotne i wtórne. Dotyczą one narządów i tkanek, do których wirus FeLV ma szczególne powinowactwo. Do chorób powstałych w wyniku bezpośredniego działania wirusa zalicza się: schorzenia nowotworowe (mięsak grasicy, mięsak przewodu pokarmowego, nowotwory skóry, oczu, nerek) (2, 4, 10, 11), nowotwory szpiku kostnego (białaczka limfatyczna, erytrocytowa i megakariocytarna) (2, 6, 10, 11), choroby wynikające z immunosupresji szpiku kostnego (anemia aplastyczna) (2, 5, 6, 10, 11), leukopenia, trombocytopenia, neuropatie (2, 4, 10, 11), zaburzenia płodności (2, 4, 10, 11) i zaburzenia endokrynologiczne (4, 6). Wtórnymi następstwami infekcji są m.in.: zakażenia oportunistyczne (4, 6, 10, 11), kłębuszkowe zapalenie nerek (4, 10, 11) oraz chroniczne zapalenie stawów.

W ostatnich latach dokonano postępu w badaniach genetycznych nad retrowirusami, w tym wirusem białaczki kotów, ułatwiających zrozumienie patogenezy choroby. Nadal jednak nieznanne są funkcje niektórych genów wirusa, co stanowi wyzwanie do prowadzenia dalszych badań.

Piśmiennictwo

1. Alkema M. J., Wiegant J., Raap A. K., Berns A., Lohuizen M. Van: Hum. Mol. Gen. 2, 1597, 1993.
2. Appel J. M.: Virus Infections of Carnivores. Elsevier Sci. Publ. B. V. 1987.
3. Azocar J., Essex M.: J. Natl. Cancer Inst. 63, 1179, 1979.
4. Block A.: Plazebokontrollierte Doppelblindstudie über die Wirksamkeit eines Paramunitätsinducers bei natürlich FeLV – infizierten Katzen. Praca dokt., Die Tierärztliche Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität, München 1995.
5. Cotter M. S., Gilmore E. Ch., Rollins C.: J. Am. Vet. Med. Assoc. 162, 1054, 1973.
6. Daniel A., Górski J.: Medycyna Wet. 47, 197, 1991.
7. Donahue R. P., Hoover A. E., Beltz A. G., Riedel N., Hirsch M. V., Overbaugh J., Mullins I. J.: J. Virol. 62, 722, 1988.
8. Fass D., Davey A. R., Hamson A. Ch., Kim S. P., Cunningham M. J., Berger M. J.: Science 277, 1662, 1997.
9. Fields N. B., Knipe M. D., Howley M. P.: Fields Virology, Lippincott – Raven Publ., Philadelphia 1996.
10. Frymson T.: Choroby zakaźne kotów. Wyd. Medyczne Sanmedia, Warszawa 1997.
11. Neu H.: Prakt. Tierarzt 73, 104, 1993.
12. Nishigaki K., Okuda M., Endo Y., Watari T.: J. Virol. 71, 9823, 1997.
13. Pantiginis J., Beaty M. R., Levy S. L., Lenz J.: J. Virol. 71, 9786, 1997.
14. Sarma S. P., Log Y.: Virology 54, 160, 1973.
15. Shelton H. G., McKim D. K., Cooley L. P., Dice F. P., Russell G. R., Grant K. Ch.: J. Am. Vet. Med. Ass. 194, 249, 1989.
16. Starkey R. C., Lobelle-Rich A. P., Granger S., Brightman K. B., Fan H., Levy S. L.: J. Virol. 72, 1078, 1998.
17. Stiff M. I., Olsen R. G.: J. Clin. Lab. Immunol. 7, 133, 1982.
18. Tsatsanis Ch., Fulton R., Nishigaki K., Tsujimoto H., Levy L., Terry A., Spanidos D., Onions D., Neil C. J.: J. Virol. 68, 8296, 1994.

Adres autora: doc. dr hab. Beata Mizak, ul. Sieroszewskiego 21/27, 24-100 Puławy