

Wpływ zakażenia końskim herpeswirusem typu 1 (EHV-1) na aktywne struktury szkieletu komórkowego

AGNIESZKA TUROWSKA, ANNA CHMIELEWSKA,
ANNA TUCHOLSKA, MARCIN W. BAŃBURA

Pracownia Wirusologii Zakładu Wirusologii, Mikologii i Immunologii Katedry Nauk Przedklinikcznych
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Turowska A., Chmielewska A., Tucholska A., Bańbura M. W.

Influence of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection on actin cytoskeleton

Summary

The aim of the study was to investigate the influence of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection on actin cytoskeleton in ED (equine dermal). Cells in vitro. ED cells were infected with a strain of Jan-E of EHV-1, fixed and stained for the presence of actin and virus antigen. Results were evaluated by confocal microscopy. The assembly of the actin cytoskeleton was heavily disturbed. In order to affirm whether changes in cytoskeleton of EHV-1 infected cells depend on the type of cells, we infected Vero cell culture with 2 different standard strains of EHV-1 – Rac-H, AIV – and Jan-E isolated from an aborted fetus. Unfortunately, the infection of Vero cells with the strain Jan-E of EHV-1 failed because this strain was not adapted to the heterogeneous cell line. Only strain Rac-H and AIV can replicate in Vero cells, which was determined through the application of PCR.

Keywords: actin, cytoskeleton, EHV-1

Mikrofilamenty, będące jednym z elementów szkieletu komórkowego, zbudowane są z aktyn, które w komórkach niemięśniowych tworzą sieć zlokalizowaną tuż pod błoną komórkową i są konieczne dla ruchu komórki, jej podziałów, a także transportu wewnątrzkomórkowego i przemieszczania się organelli (1, 9, 10).

Cytoskielet odgrywa szczególną rolę podczas zakażenia wirusowego, biorąc np. udział w wewnątrzkomórkowym transporcie wirionów lub ich części składowych. Ponadto, pod wpływem zakażenia wirusowego może dochodzić do polimeryzacji bądź odwrotnie, fragmentacji włókien aktynowych. Możliwa jest również ich rearanżacja, uszkodzenie, a nawet całkowite zniszczenie (5). Do wirusów mających uszkadzający wpływ na cytoskielet należą m.in. herpeswirusy (7, 11, 16), w tym koński herpeswirus typu 1 (wirus zakaźnego ronienia klaczy, EHV-1) (15).

W badaniach przeprowadzonych przez innych autorów wykazano, że zakażenie wirusem Aujeszky'ego (pseudorabies virus, PRV) komórek linii SK-6 (nerki świni) powoduje uszkodzenie włókien aktynowych (16). Natomiast zakażenie końskim herpeswirusem typu 1 komórek linii Vero (nerki małpy) prowadziło do uszkodzeń mikrotubul przy nienaruszonych włóknach aktynowych (17). Nie jest przy tym jasne, czy uszkadzający wpływ różnych herpeswirusów zależy od właściwości samego wirusa, czy też od typu zaka-

żonych komórek – komórki linii SK-6 pochodzą bowiem od świni, która jest naturalnym gospodarzem PRV, podczas gdy komórki linii Vero pochodzą od małpy – gospodarza heterologicznego.

Celem badań było określenie, czy chorobotwórczy dla koni EHV-1 (2, 4, 6) powoduje uszkodzenie aktywnych struktur cytoskieletu w komórkach linii ciągłej ED (skóry konia), pochodzących od naturalnego gospodarza.

Materiał i metody

W doświadczeniach użyto trzech szczepów wirusa zakaźnego ronienia klaczy. Dwa z nich – testowy szczep Jan-E (wyizolowany w 1997 r. z tkanek poronionego płodu) i wzorcowy Rac-H, pochodziły z kolekcji szczepów Pracowni Wirusologii, Zakładu Wirusologii, Mikologii i Immunologii Katedry Nauk Przedklinikcznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW. Trzeci, wzorcowy szczep AIV uzyskano dzięki uprzejmości dr Kerstin Borchers z Freie Universität w Berlinie.

Wszystkie trzy szczepy wirusa namnażano w hodowlach komórek linii ciągłej ED (skóry konia, ATCC Nr CCL57), a uzyskane zawiesiny macierzyste dzielono na porcje i przechowywano w zamrożeniu. Hodowli linii Vero (nerki małpy zielonej, ATCC Nr CRL1587) użyto do próby adaptacji szczepu testowego do heterologicznego gospodarza.

Szkiełkowe hodowle komórek ED zakażano dawką 0,7 CCID₅₀ testowego szczepu Jan-E dobraną tak, aby efekt cytopatyczny pojawiał się po ok. 24 godzinach i nie powo-

dował całkowitego zniszczenia hodowli. Po tym czasie hodowle utrwalano 3,7% roztworem formaldehydu w PBS przez 10 min. w temperaturze pokojowej i po dwukrotnym płukaniu PBS szkiełka przenoszono do płytki Petriego i pokrywano acetonem o temp. -20°C na 10 min. Po dwukrotnym płukaniu w PBS, aktywną w utrwalonych hodowlach barwiono przy pomocy barwnika AlexaFluor 633 (Molecular Probes) zgodnie z zaleceniami producenta, natomiast wirusowy antygen wykrywano techniką immunofluorescencyjną przy pomocy preparatu RPK Gamakon (Mevak) (13). Po zabarwieniu preparaty pokrywano Immuno Fluore Mounting Medium, umieszczano na szkiełkach podstawowych i obserwowano w mikroskopie konfokalnym Olympus FV500 przy długościach fali $\lambda = 632 \text{ nm}$ dla AlexaFluor 633 i $\lambda = 510 \text{ nm}$ dla RPK Gamakon. Obrazy rejestrowano w formie cyfrowej i analizowano przy pomocy programu Fluoview.

W celu porównania wpływu zakażenia EHV-1 na aktywne struktury cytoszkieletu w różnych typach komórek podjęto próbę adaptacji testowego szczepu wirusa do komórek gospodarza heterologicznego. Hodowle komórek linii Vero zakażano szczepem Jan-E i szczepami wzorcowymi Rac-H i AIV i inkubowano 2-4 doby, co 24 godziny wykonując kontrolę mikroskopową. Dodatkowo, replikację wirusa kontrolowano techniką nPCR – po zakończeniu inkubacji z zakażonych hodowli ekstrahowano DNA i wykonywano amplifikację ze starterami specyficznymi dla genu gB EHV-1 (3).

Wyniki i omówienie

W kontrolnych, niezakażonych hodowlach komórek linii ED stwierdzano występowanie gęstej sieci nieuszkodzonych włókien F-aktyny (ryc. 1).

W hodowlach zakażonych stwierdzano występowanie typowego dla EHV-1 efektu cytopatycznego w postaci łysinek. Na ich obrzeżach, w morfologicznie zmienionych komórkach immunofluorescencyjnie stwierdzano obecność antygeny EHV-1 (ryc. 2A), natomiast elementy aktywne barwione AlexaFluor 633 wykazywały wyraźne cechy uszkodzenia – rozrzedzenie i zanik włókien (ryc. 2B). Nałożenie obu obrazów – wybarwionych włókien aktywnych i wirusowego antygeny – pozwoliło na stwierdzenie, iż uszkodzenia utkania aktywnego widoczne były najwyraźniej w miejscach występowania antygeny (ryc. 2D).

W niektórych przypadkach stwierdzano również układanie się antygeny wirusowego wzdłuż włókien aktywnych występujących w zrębowych częściach komórki (ryc. 3). Sporadycznie obserwowano też struktury ziarniste (ryc. 4).

Techniką nPCR wykazano, że oba szczepy wzorcowe AIV i RacH, w odróżnieniu od testowego szczepu JanE, replikowały się w hodowlach komórek Vero. Zaobserwowano przy tym wyraźne różnice w ilości uzyskiwanych produktów amplifikacji, co sugerowało różny stopień ich zaadaptowania do heterologicznego gospodarza.

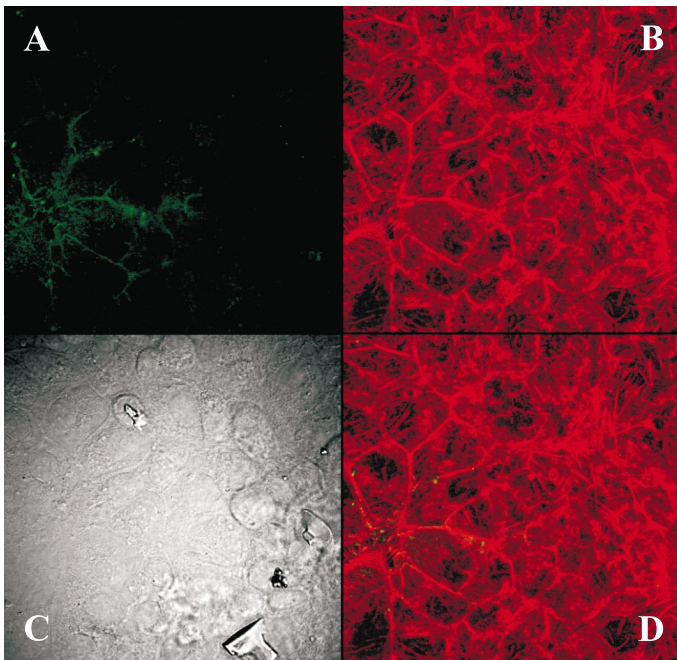
Uszkodzający wpływ końskich herpeswirusów na różne elementy cytoszkieletu zakażonych komórek nie

był, jak dotąd, dokładnie zbadany. Nadzwyczaj skromne dane piśmiennictwa wskazują jedynie na wpływ zakażenia EHV-1 na komórki linii Vero – nerki mały (17). Brak jest natomiast informacji na temat uszkodzeń cytoszkieletu aktywnego w komórkach pochodzących od naturalnego gospodarza EHV-1. Tym ciekawsze zatem wydają się wyniki badań, w których wykazano, iż podczas zakażenia tym wirusem włókna aktywne komórek ED ulegają zniszczeniu.

Z dokumentacji fotograficznej wynika, iż w miejscach nagromadzenia się wirusa występuje rozrzedzenie, a w niektórych przypadkach wręcz zanik włókien aktywnych. Wyraźnie bowiem widać, że barwa zielona (wskazująca lokalizację antygeny wirusowej) i czerwona (uwidaczniająca F-aktynę) nie pokrywają się. Można przy tym zauważyć, że stopień uszkodzenia cytoszkieletu był proporcjonalny do ilości nagromadzonego antygeny.

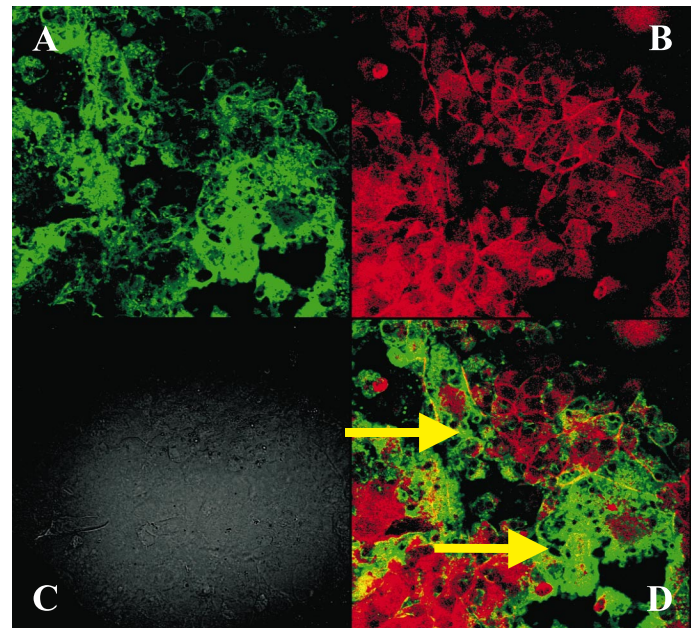
Interesującym spostrzeżeniem było rozmieszczenie antygeny wirusowej wzdłuż włókien aktywnych zlokalizowanych w zrębowych częściach komórki. Można na tej podstawie wysnuć ostrożne przypuszczenie, że cytoszkielet jest wykorzystywany przez EHV-1 w procesie transportu wewnątrzkomórkowego wirionów potomnych (lub ich elementów składowych). Do przyjęcia tej hipotezy skłaniają dane uzyskane przez innych badaczy, wskazujące na udział cytoszkieletu w przemieszczaniu się wirusów w komórce. Dotyczy to m.in. *Paramyxoviridae* i *Poxviridae*, a w szczególności wirusa krowianki (vaccinia virus) (5).

Jak wykazano w niniejszej pracy, zakażenie komórek ED wirusem zakaźnego ronienia kłaczy prowadziło do uszkodzeń aktywnych struktur szkieletu komórkowego. Z badań prezentowanych przez innych autorów wynika natomiast, że EHV-1 zakażający komórki linii Vero powoduje degradację mikrotubul (17). Zestawienie tych obserwacji sugeruje, że ten sam wirus może uszkadzać różne elementy cytoszkieletu w zależności od rodzaju komórek, które zakaża. Zaznaczyć przy tym należy, że badania te prowadzone były przy użyciu różnych szczepów wirusa i weryfikacja tej hipotezy wymagałaby zakażenia obu linii komórkowych – ED i Vero – tym samym szczepem EHV-1. Nie było to jednak możliwe, gdyż wybrany szczep Jan-E, w odróżnieniu od szczepów wzorcowych, nie replikował się w linii Vero, przynajmniej na poziomie wykrywalnym techniką PCR. Szczep ten izolowano w komórkach linii ED i do doświadczeń użyto jego niskiego, 5 pasażu. Taki dobór testowego wirusa sprawia, że odzwierciedla on właściwości wirusa występującego w warunkach naturalnych, gdyż wpływ pasażowania *in vitro* jest minimalny. Jest to dość istotny problem, wiadomo bowiem, że wielokrotne pasażowanie EHV-1 *in vitro* prowadzi do znaczących zmian genotypowych i fenotypowych, czego jaskrawym przykładem jest wzorcowy szczep Rac-H (18), który zresztą replikował się w hodowlach Vero bez żadnych specjalnych zabiegów.



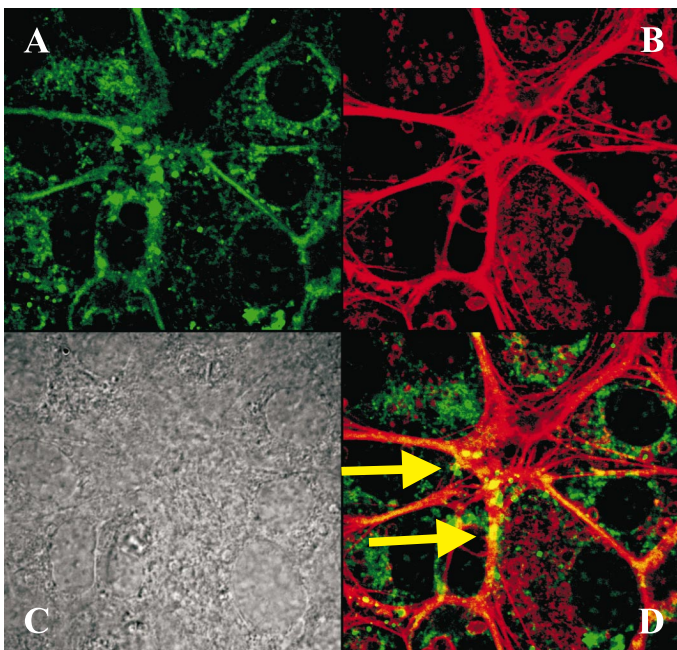
Ryc. 1. Hodowla kontrolna. Niezakażone komórki linii ED wybarwione na obecność włókien aktynowych i wirusowego antygenu. Powiększenie mikroskopu 600 ×

Objaśnienia: A – obraz uzyskany przy długości fali dla RPK Gamakon – brak antygenu; B i D – F-aktyna, kolor czerwony; C – komórki niewybarwione, kontrast Nomarskiego



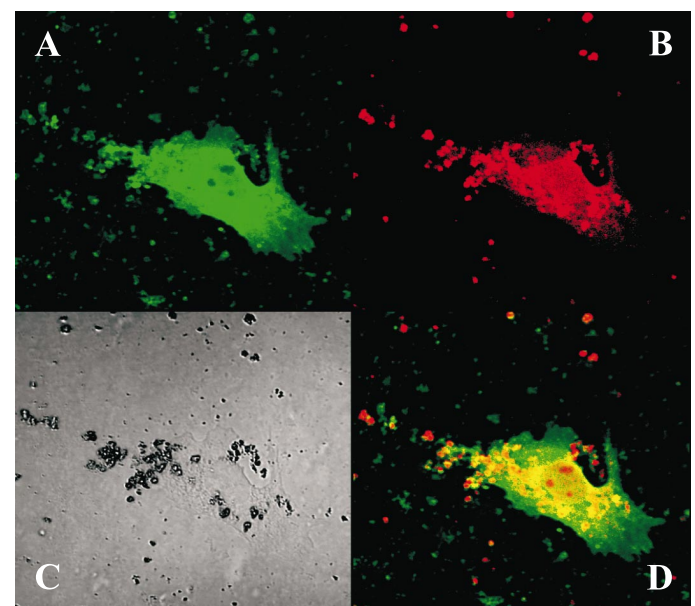
Ryc. 2. Komórki linii ED zakażone EHV-1. Kolor zielony – antygen wirusowy, kolor czerwony – F-aktyna. Widoczny zanik włókien aktynowych w miejscu nagromadzenia EHV-1 (strzałka). Obserwacja w mikroskopie konfokalnym przy powiększeniu mikroskopu 600 ×

Objaśnienia: A – antygen wirusowy, kolor zielony; B – F-aktyna, kolor czerwony; C – komórki niewybarwione, kontrast Nomarskiego; D – nałożenie obrazów A i B



Ryc. 3. Komórki linii ED zakażone EHV-1. Antygen wirusowy rozmieszczony wzdłuż włókien aktynowych (strzałka). Obserwacja w mikroskopie konfokalnym przy powiększeniu mikroskopu 1000 ×

Objaśnienia: A – antygen wirusowy, kolor zielony; B – F-aktyna, kolor czerwony; C – komórki niewybarwione, kontrast Nomarskiego; D – nałożenie obrazów A i B



Ryc. 4. Struktury ziarniste w wybarwionych na obecność F-aktyny (kolor czerwony) i antygenu wirusowego (kolor zielony) komórkach linii ED zakażonych EHV-1. Obserwacja w mikroskopie konfokalnym przy powiększeniu mikroskopu 600 ×

Nie oznacza to oczywiście, że replikacja użytego w doświadczeniach szczepu Jan-E w komórkach Vero nie jest możliwa – być może wirus wymaga dłuższej adaptacji i wykonania w tej linii większej liczby pasa-

ży. Nie można również wykluczyć, że sam proces adaptacji prowadzi do zmian sposobu oddziaływania wirusa na szkielet komórkowy, jednak potwierdzenie lub wykluczenie tych hipotez możliwe jest tylko na drodze doświadczalnej. Dlatego kontynuowane są próby adaptacji szczepu Jan-E do linii Vero oraz podjęto prace

zmierzające do porównania uszkodzeń cytoszkieletu komórek ED i Vero przez szczep Rac-H.

W trakcie badań uzyskano również obrazy ukazujące zakażone komórki prawdopodobnie ulegające apoptozie. Walter i Nowotny nie stwierdzili wprawdzie występowania apoptozy w zakażonych EHV-1 komórkach, jednak badania te dotyczyły komórek linii Vero (17). Z drugiej strony, Kim i Yi (8) stwierdzili, że komórki nerki psa zakażone psim herpeswirusem (canine herpesvirus, CHV) wykazywały wyraźne cechy programowanej śmierci komórki. Wyniki te, w połączeniu z wynikami badań własnych, pozwalają na wysunięcie ostrożnej hipotezy, iż mechanizm uszkodzenia i śmierci komórki wskutek zakażenia EHV-1 zależy od typu komórek. W komórkach pochodzących od naturalnego gospodarza zakażenie prowadzić miałooby do uszkodzeń włókien aktyny i apoptozy, w komórkach heterologicznych natomiast – do uszkodzeń sieci mikrotubul, bez objawów apoptozy. Potwierdzenie tej hipotezy wymaga jednak wykonania eksperymentu polegającego na zakażeniu jednym szczepem wirusa różnych typów hodowli komórkowych i porównania wpływu zakażenia na struktury cytoszkieletu i indukcję apoptozy.

Opisane w niniejszej pracy badania nie dotyczyły samej apoptozy, w niektórych przypadkach zaobserwowano jedynie cechy znamienne dla tego zjawiska – charakterystyczną fragmentację komórek z powstawaniem struktur ziarnistych. Celem jednoznacznego stwierdzenia występowania i częstości apoptozy w zakażonych EHV-1 komórkach ED, należałoby przeprowadzić specjalistyczne testy i porównać odsetek komórek ulegających programowanej śmierci w komórkach zakażonych i kontrolnych.

Piśmiennictwo

1. *Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.*: Molecular Biology of the Cell. Garland Science, New York 2002, 907-982.

2. *Allen G. P., Bryans J. T.*: Molecular Epizootiology, Pathogenesis and Prophylaxis of Equine Herpesvirus-1 Infections. Progress Vet. Microbiol. Immunol. 1986, 2, 78-114.
3. *Borchers K., Slater J.*: A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4: Short communication: J. Virol. Methods. 1993, 45, 331-336.
4. *Bryans J. T., Allen G. P.*: Herpesviral Diseases of the Horse, [w:] Wittman G. (red.): Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs. Kluwer Academic Publishers, Boston-Dodrecht-London 1989, 176-229.
5. *Cudmore S., Reckmann I., Way M.*: Viral manipulations of the actin cytoskeleton. Trends Microbiol. 1994, 5, 142-148.
6. *Henry B. E., Robinson R. A., Dauenhauer A. S., Altherton S. S., Hayward G. S., O'Callaghan D. J.*: Structure of the Genome of equine herpesvirus type 1. Virology 1981, 115, 97-114.
7. *Jones N. L., Lewis J. C., Kilpatrick B. A.*: Cytoskeletal disruption during human cytomegalovirus infection of human lung fibroblasts. Europ. J. Cell Biol. 1986, 41, 304-312.
8. *Kim O., Yi S. Y.*: The replication of canine herpesvirus (CHV) induces apoptosis in canine kidney cell line: Short communication. Acta Vet. Hung. 2005, 53, 147-151.
9. *Korohoda W.*: Cytoszkielet, [w:] Leyko W. (red.): Biofizyka dla biologów. PWN, Warszawa 1997.
10. *Marewicz E.*: Wpływ patogennych drobnoustrojów i ich toksyn na organizację cytoszkieletu komórek. Post. Mikrobiol. 1996, 35, 79-96.
11. *Melamed I., Stein L., Roifman C. M.*: Epstein-Barr virus induces actin polymerization in human B cells. J. Immunol. 1994, 153, 1998-2003.
12. *Nowak D., Malicka-Blaszkiewicz M.*: Izoforymy aktyny – różnicowanie funkcji, zmiany w stanach patologicznych. Post. Biochemii 1999, 45, 261-269.
13. *Rola J., Zmudzinski J.*: Herpeswirus koński typ 1 (EHV-1) przyczyną poronień u kłaczy w Polsce. Medycyna Wet. 1997, 53, 268-269.
14. *Strauss W. M.*: Preparation of genomic DNA from Mammalian tissue, [w:] Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (red.): Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York 1992, 221-223.
15. *Szczygieł A., Chmielewska A., Tucholska A., Bańbura M.*: Wpływ zakażenia końskim herpeswirusem typu 1 (EHV-1) na aktynowe struktury cytoszkieletu in vitro. Mat. VII Konf. Biologii Molekularnej, Warszawa 2004, s. 144-146.
16. *Minnebruggen G. Van, Favoreel H. W., Jacobs L., Nauwynck H. J.*: Pseudorabies virus US3 kinase mediates actin stress fiber breakdown. J. Virology 2003, 77, 9074-9080.
17. *Walter I., Nowotny N.*: Equine herpes virus type 1 (EHV-1) infection induces alterations in the cytoskeleton of Vero cells but not apoptosis. Arch. Virology 1999, 144, 1827-1836.
18. *Wojciechowska S.*: Adaptacja krajowego wirusa zakaźnego ronienia kłaczy szczep Rac-Heraldia do chomików syryjskich. Med. Dośw. Mikrobiol. 1996, 2, 255-263.

Adres autora: mgr inż. Agnieszka Turowska, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: aturowska@alpha.sggw.waw.pl