

Charakterystyka molekularna genu wirusowej interleukiny 8 (vIL8) krajowych szczepów wirusa choroby Mareka

KATARZYNA KRÓL, ELŻBIETA SAMOREK-SALAMONOWICZ, WOJCIECH KOZDRUŃ

Zakład Chorób Wirusowych Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Król K., Samorek-Salamonowicz E., Kozdruń W.

Molecular characteristics of the vIL8 gene of Polish MDV strains

Summary

The aim of the foregoing experiment was the determination and comparison of the nucleotide and amino acid sequences of the vIL-8 gene of Polish MDV strains. Twenty three samples isolated from field cases of Marek's disease virus during the years 1976 – 2005 were used in the experiment. The presence of the gene was confirmed in all examined samples. No changes in the vIL8 sequence were stated, except of the three following strains, where singular nucleotide changes were observed: 16/05 (25 C→T; 243 C→T; 281 G→A), PZ /95 (25 C→T; 184 A→G; 243 C→T; 281G→A), 5/01 (168 C→T; 220 T→C), 11/02 (464 T→A), 23/99 (665 T→A), 14/05 (551 T→A, deletion of 680 base). These changes were reflected in amino acid sequences of the three isolates, as point and random changes: 16/05, PZ/95 (4 S→L, 31 G→D), and 14/05 (88 F→L). It appears that these changes did not show any pattern displaying association with the degree of the pathogenicity of the virus, and that the gene encoding vIL8 in most cases did not change within 30 years.

Keywords: MDV, vIL-8, sequencing

Choroba Mareka jest nowotworową chorobą drobiu grzebiącego. Jej czynnikiem etiologicznym jest herpeswirus zwany wirusem choroby Mareka (MDV), należący do rodziny *Herpesviridae*. Wyróżnia się trzy serotypy tego wirusa. Do serotypu 1 należą szczepy onkogenne oraz ich atenuowane formy, służące do produkcji szczepionek, do serotypu 2 – szczepy naturalnie apatogenne występujące u kur, natomiast serotyp 3 stanowią apatogenne herpeswirusy izolowane od indyków (12).

W obrębie serotypu 1 wyróżnia się nieodróżnialne serologicznie cztery patotypy: mMDV (middle strains) – szczepy klasyczne, vMDV (virulent strains) – zjadliwe, indukujące nowotworzenie, vvMDV (very virulent strains) – bardzo zjadliwe, o podwyższonej onkogenności, vv+MDV (very virulent + strains) – bardzo wirulentne, o wysokiej zjadliwości i onkogenności, przełamujące odporność poszczepienną (12).

Struktura genomu poszczególnych serotypów jest charakterystyczna dla α -herpesvirusów. Genom MDV koduje więcej niż 100 genów, które zostały podzielone na trzy główne kategorie: wspólne dla wszystkich α -herpesvirusów, geny charakterystyczne jedynie dla MDV oraz trzecią, określającą geny charakterystyczne dla serotypu 1 wirusa MD (12).

Do tej ostatniej zaliczany jest gen kodujący wirusową interleukinę 8 (vIL8), która jest homologiem interleukiny kurzej. Produkt tego genu odgrywa ważną rolę w czasie infekcji, pełniąc funkcję chemoatraktantu dla komórek limfocytów T i naśladowanie komórkowej interleukiny 8. Pro-

wadzi to do uaktywnienia kaskady kinazowej, co sprzyja produkcji czynników transkrypcyjnych jun/fos niezbędnych dla pełnej aktywności głównej onkoproteiny wirusowej – białka Meq (3, 5, 7). Możliwe, że vIL8 stymuluje także zakażenie limfocytów B, co prowadzi do podtrzymywania wstępnej infekcji cytolitycznej (9, 11, 13). Ekspresja genu vIL8 może prowadzić do zintensyfikowania zakażenia i zwiększenia prawdopodobieństwa wystąpienia zmian nowotworowych. Co więcej, ostatnie badania wskazują, że ze wzrostem poziomu jej ekspresji, wiąże się wzrost poziomu zjadliwości wirusa (2, 6).

Celem badań było określenie i porównanie sekwencji nukleotydowej genu kodującego wirusową interleukinę 8 (vIL8) polskich szczepów wirusa choroby Mareka.

Materiały i metody

Szczepy wirusa MD. Do badań użyto dwudziestu trzech izolatów wirusowych wyosobnionych w latach 1976-2005 od ptaków, u których na podstawie badań histopatologicznych, serologicznych i wirusologicznych stwierdzono chorobę Mareka. Izolaty te namnażano w hodowli fibroblastów zarodka kurzego (CEF). Zakażone komórki fibroblastów uzyskane z III pasażu przechowywano w płynnym azocie (temperatura -196°C). Ponadto użyto namnożonego w hodowli CEF zjadliwego szczepu standardowego HPRS₁₆.

Hodowle komórkowe. Hodowle komórek fibroblastów zarodka kurzego (CEF) zakładano wg powszechnie stosowanych procedur, z 9-11-dniowych zarodków kurzych SPF (Lohmann – Niemcy).

Izolacja całkowitego, komórkowego DNA. Całkowite, komórkowe DNA izolowano z komórek fibroblastów kurzych zakażonych badanymi terenowymi szczepami. Użyto zestawu komercyjnego QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen), stężenie materiału genetycznego w poszczególnych próbkach mierzono spektrofotometrycznie (Biometra).

Jako kontrolę dodatnią zastosowano całkowite DNA, wyizolowane z hodowli komórkowych CEF zakażonych szczepem HPRS₁₆, kontrolę ujemną stanowił całkowity materiał genetyczny wyizolowany z hodowli niezakażonej.

Standardowa reakcja amplifikacji dla genu vIL8. PCR przeprowadzono przy użyciu starterów specyficznych dla genu vIL8: vIL8 Uni 5' TGG GGC GGC AAA AAT G3', vIL8 Rev 5' TCA AAG ACA GAT ATG GGA ACC 3'. Reakcję przeprowadzono w 50 µl mieszaniny reakcyjnej o następującym składzie: 5 µl buforu PCR (500 mM KCl, 100 µM Tris-HCl, 15 µM Triton X-100), 2 µl totalnego, komórkowego DNA (1 µg/ml), 2 µl każdego z primerów, 2 µl of dNTP (0,2 µM), 1 µl termostabilnej polimerazy DNA i 34 µl wody dejonizowanej. Zastosowano następujące parametry reakcji: 35 cykli, 94°C – 2 min. (denaturacja wstępna), 94°C – 1 min. (denaturacja właściwa), 58°C – 1 min. (przyłączanie starterów), 72°C – 1 min. (wydłużanie łańcucha), 72°C – 10 min. (wydłużanie końcowe).

Touchdown PCR. Zastosowano następujące warunki: 13 cykli, 95°C – 2 min. (denaturacja wstępna), 95°C – 2 min. (denaturacja właściwa), 68-55°C – 1 min. (przyłączanie starterów), 72°C – 1 min. (wydłużanie łańcucha), 72°C – 10 min. (wydłużanie końcowe); 30 cykli, 95°C – 2 min. (denaturacja), 58°C – 1 min. (przyłączanie starterów), 72°C – 1 min. (wydłużanie łańcucha), 72°C – 10 min. (wydłużanie końcowe).

Standardowa reakcja amplifikacji dla genu Meq. Warunki reakcji były podobne jak w reakcji amplifikacji dla genu vIL8. Optymalna temperatura przyłączania starterów: MeqF 5' GCA CTC TAG AGG TGT AAA GAG ATG TCT CAG 3', MeqR 5' TAA CTC GAG GAG AAG AAA CAT GGG GCA TAG 3' wynosiła 62,5°C.

Analiza produktów amplifikacji. Po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego w 2% żelu agarozowym przez 1 h przy napięciu 10 V/cm długości żelu, barwiono żel w roztworze bromku etydyny (1 µg/ml) i poddano analizie w świetle transiluminatora.

Klonowanie i sekwencjonowanie. Przeprowadzono za pomocą zestawu komercyjnego pGEM®-T Easy Vector, Promega, USA, przy użyciu aparatu Beckman CEQ8000 Sequencer (Beckman). Do analizy uzyskanych wyników zastosowano następujące programy komputerowe: Chromas, Blast 2, Vector NTI, Clustal, BioEdit.

Wyniki i omówienie

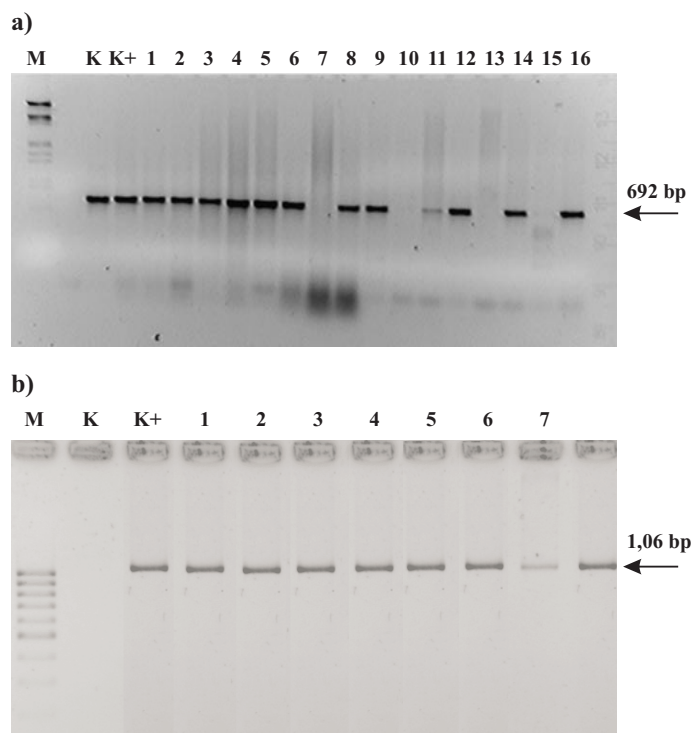
Ekspresja genu vIL8 może prowadzić do zintensyfikowania infekcji i zwiększenia prawdopodobieństwa wystąpienia zmian nowotworowych u kurcząt zakażonych wirusem MD (2, 6). Poziom ekspresji genu vIL8 jest znacznie większy w przypadku szczepów bardziej zjadliwych (vvMDV) w porównaniu do szczepów o mniejszej wirulencji (mMDV i vMDV). Cortes i wsp. (1) oraz Jarosinski i wsp. (3) na podstawie badań przeprowadzonych przy użyciu techniki real-time PCR przypuszczają, że poziom ekspresji genu vIL8 jest proporcjonalny do stopnia zjadliwości wirusa (13).

W doświadczeniach własnych analizie poddano materiał genetyczny dwudziestu trzech terenowych izolatów wirusa choroby Mareka pochodzących z lat 1976-2005, które na podstawie badań wirusologicznych uznane zostały za szczepy zjadliwe. Przeprowadzono test PCR przy użyciu starterów specyficznych dla genu vIL8. W celu wyeliminowania niespecyficznych reakcji zastosowano program

touchdown PCR. We wszystkich badanych materiałach otrzymano produkt PCR o wielkości 692 bp, świadczący o obecności genu vIL8 i przynależności powyższych szczepów do serotypu 1 MDV (ryc. 1a).

Następnie wykonano reakcję amplifikacji z wykorzystaniem starterów charakterystycznych dla genu Meq MDV, która umożliwia różnicowanie szczepów atenuowanych od zjadliwych w obrębie serotypu 1. Na tej podstawie 19 próbek zakwalifikowano jako szczepy zjadliwe MDV, cztery szczepy, prawdopodobnie na skutek pasażowania ich w hodowlach komórek, uległy częściowej atenuacji (ryc. 1b). Mechanizm atenuacji nie został jeszcze dokładnie poznany, wiadomo jednak, że w jej wyniku dochodzi do zmian w obrębie genomu. Badania innych autorów, w których wykorzystywane były pozbawione genu vIL8 delecyjne mutanty wirusa, wykazały, że po zakażeniu zmutowanym wariantem wirusa lityczna faza infekcji jest znacznie mniej intensywna, w porównaniu z zakażeniem szczepem wyjściowym. W pierwszym przypadku obserwowane zmiany były mniejsze i zdecydowanie mniej inwazyjne, opisane jako mikroguzy, które nie zakłócały normalnej struktury tkanki (1, 6).

W drugim etapie badań własnych wybrano 14 szczepów reprezentujących poszczególne lata: RW/76, BK/85, DB/97, PZ/95, 23/99, 24/00, 5/01, 6/01, 11/02, 43/03, 12/04, 36/04,



Ryc. 1. Obraz elektroforetyczny produktów PCR wybranych szczepów terenowych wirusa choroby Mareka

a) Obraz elektroforetyczny produktów PCR genu vIL-8 – 2% żel agarozowy: M – marker wielkości (80-1031 bp), K – kontrola negatywna (totalne DNA wyizolowane z niezakażonej hodowli CEF SPF), K+ pozytywna (totalne DNA wyizolowane z hodowli CEF SPF zakażonej szczepem HPRS₁₆), 1-16 przykładowe analizowane próbki DNA szczepów terenowych;
b) Obraz elektroforetyczny produktów PCR genu Meq – 2% żel agarozowy: M – marker wielkości (80-1031 bp), K – kontrola negatywna (totalne DNA wyizolowane z niezakażonej hodowli CEF SPF), K+ pozytywna (totalne DNA wyizolowane z hodowli CEF SPF zakażonej szczepem HPRS₁₆), 1-7 przykładowe analizowane próbki DNA szczepów terenowych

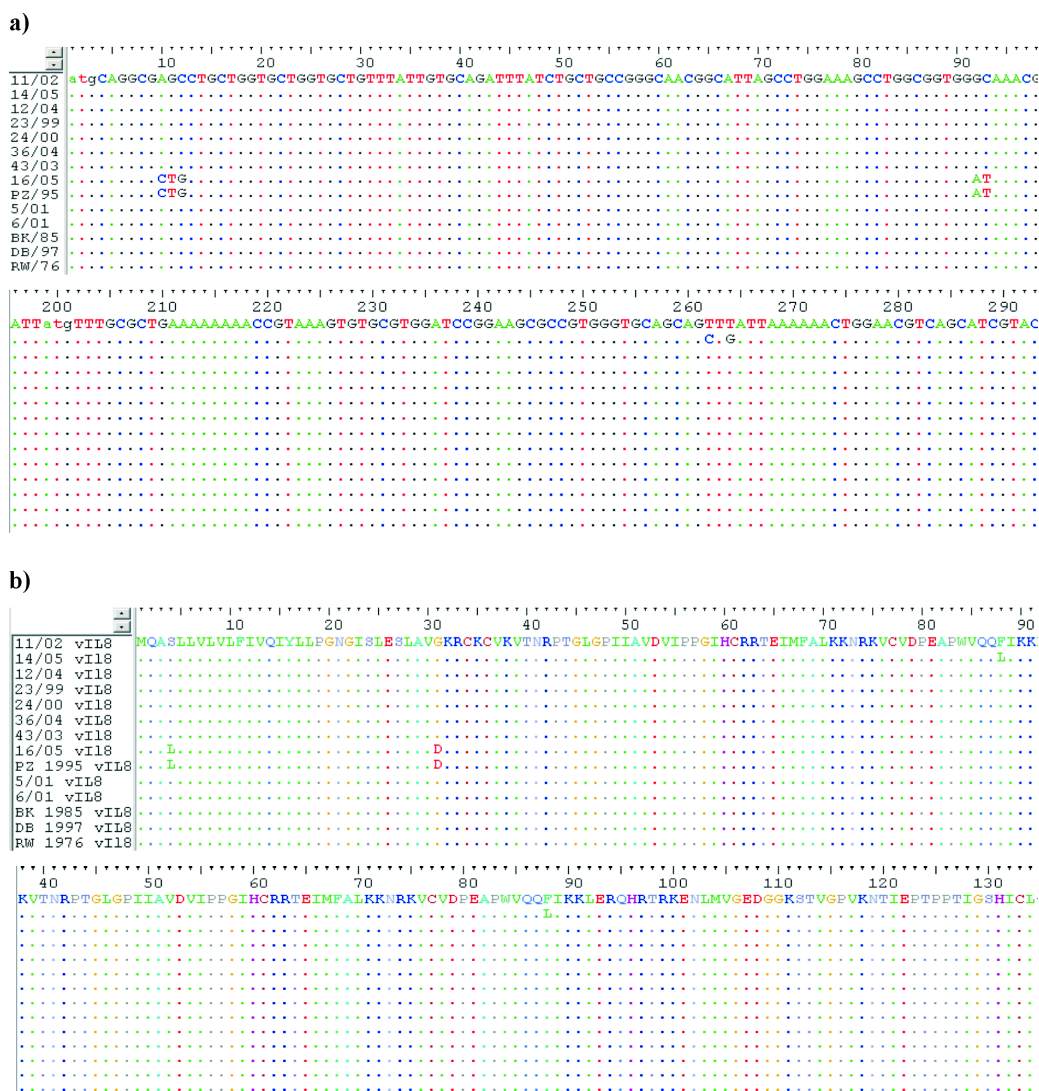
14/05, 16/05 (licznik – oznaczenie szczepu, mianownik – rok izolacji). Ich produkty poddano analizie sekwencyjnej. Wykorzystywano fragment o wielkości 402 bp, który koduje finalną proteinę vIL8 o wielkości 134 aminokwasów. Uzyskane wyniki wykazały brak zmian w sekwencji nukleotydowej vIL8 większości krajowych szczepów MDV. Jedynie w przypadku trzech szczepów są obecne pojedyncze, punktowe zmiany nukleotydowe. Są to zmiany w sekwencji interleukiny szczepu 16/05 (10 A→C, 11 G→T, 12 C→G, 92 G→A, 93 C→T), takie same w interleukinie szczepu PZ/95 (10 A→C, 11 G→T, 12 C→G, 92 G→A, 93 C→T) i nieco inne dla interleukiny 14/05 (262 T→C, 264 T→G) (ryc. 2a). Również w sekwencji aminokwasowej vIL8 tych trzech szczepów były widoczne punktowe zmiany: vIL8 szczepów 16/05 i PZ/95 (4 S→L, 31 G→D) oraz vIL8 szczepu 14/05 (88 F→L) (ryc. 2b).

Wcześniejsze badania wykazały, że patogenność szczepów użytych do obecnej pracy związana jest z okresem izolacji i zwiększa się w ciągu ponad trzydziestu lat występowania choroby Mareka w Polsce. Szczepy występujące w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych zakwalifikowano jako mMDV, natomiast szczepy izolowane począwszy od lat dziewięćdziesiątych XX wieku jako vMDV (4, 8, 10).

W przypadku trzech szczepów (PZ95, 14/05, 16/05) występowanie pojedynczych, punktowych zmian w sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej nie miało odzwierciedlenia w zwiększonej patogenności analizowanych szczepów. Na podstawie wcześniejszych były one zakwalifikowane do szczepów vMDV, podobnie jak inne szczepy izolowane w ciągu ostatnich lat (4, 8).

Piśmiennictwo

- Cortes P. L., Cardona C. J.: Pathogenesis of Marek's disease virus mutant lacking vIL8 in resistant and susceptible chickens. *Avian Dis.* 2004, 48, 50-60.
- Cui X., Lee L. F., Hunt H. D., Reed W. M.: Marek's disease virus vIL8 deletion mutant has attenuated virulence and confers protection against challenge with a very virulent plus strains. *Avian Dis.* 2005, 49, 199-206.
- Jarosinski K. W., O'Connell P. H., Schat K. A.: Multiple alternative splicing of exons II and III of viral interleukin 8 in the Marek's disease virus genome: the importance of vIL8 exon I. *Virus Genes.* 2003, 26, 255-269.
- Kozdrui W.: Charakterystyka krajowych szczepów wirusa choroby Mareka. Praca dokt., Państwowy Instytut Weterynaryjny, Puławy 2002.
- Król K., Samorek-Salamonowicz S., Kozdrui W.: Molekularna charakterystyka genów i białek wirusa choroby Mareka. *Post. Mikrobiol.* 2005, 4, 351-356.



Ryc. 2. Porównanie sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych genu vIL8

a) Bioedit sequence alignment – porównanie fragmentów nukleotydowych sekwencji 402 bp, obrazujących pojedyncze zmiany w jej obrębie. Kolorowe punkty oznaczają odpowiednie zasady. Wyróżnione litery oznaczają miejsca pojedynczych, punktowych zmian nukleotydowych; b) Bioedit sequence – porównanie fragmentów aminokwasowych sekwencji 134aa, obrazujących pojedyncze zmiany w jej obrębie. Kolorowe punkty oznaczają odpowiednie aminokwasy. Wyróżnione litery oznaczają miejsca pojedynczych aminokwasowych zmian punktowych

- Laurent S., Ensault E., Rasschaert D.: Single-nucleotide polymorphisms into a retrospective molecular epidemiology study (1982-1999) in France. *J. Gen. Viro.* 2004, 85, 1387-1392.
- Parcells M. S., Lin S. F., Dienglewicz R. L., Majerciak V.: Marek's disease virus encodes an interleukin 8 homolog: characterization of the vIL8 protein and a vIL8 deletion mutant. *J. Virol.* 2001, 75, 5159-5173.
- Samorek-Salamonowicz E., Kozdrui W.: Izolowanie szczepów wirusa choroby Mareka od kur z przypadków przełamania odporności poszczepiennej. Materiały VIII Sympozjum Drobiarskiego, Wrocław 1997, s. 88.
- Spatz S. J., Silva R. F.: Polymorphism in the repeat long regions of oncogenic and attenuated pathotypes of Marek's disease virus 1. *Virus Genes* 2006, www.pubmed.gov
- Szeleszczuk P., Samorek-Salamonowicz E., Kozdrui W., Król K.: Pierwszy przypadek syndromu Alabama Red Leg u brojlerów w Polsce. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 1391-1394.
- Wu T. F., Sun W., Boussaha M., Southwick R., Coussens P. M.: Cloning and sequence analysis of Marek's disease virus origin binding protein (OBP) reveals strict conservation of structural motifs among OBPs of divergent alphaherpesviruses. *Virus Genes.* 1996, 13, 143-157.
- Witter R. L., Schat K. A.: Marek's disease. *Diseases of Poultry.* XI ed. Iowa State Press, A Blacwell Publishing Company 2003, 407-465.
- Xing Z., Schat K. A.: Expression of cytokine genes in Marek's disease virus-infected chickens and chicken embryo fibroblast cultures. *Immunol.* 2000, 100, 70-76.

Adres autora: mgr Katarzyna Król, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: katarzyna.krol@piwet.pulawy.pl