

Human cytomegalovírus izolátumok IL-8 indukciója és szaporodásuk epithelsejtekben

Kovács Ida Juszta¹, Hegedűs Katalin¹, Pál Attila², Pusztai Rozália¹

¹Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet, ²Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, SZTE, Szeged

Inducerea producerii de IL-8 și replicarea virusului citomegalic uman în celulele epiteliale

Celula epitelială este ținta *in vivo* a infecției cu virusul citomegalic uman (HCMV). Conform studiilor noastre anterioare, numărul celulelor ce exprimă genele foarte timpurii ale virusului în culturi celulare de sincitiotrofoblasti (ST) infectați cu HCMV depinde de cantitatea de IL-8 formată. Știind, că IL-8 intensifică replicarea virală în numeroase tipuri de celule, este probabilă existența unei corelații între capacitatea inducerii producerii de IL-8 și replicarea virală în culturi ST, eventual și în alte celule epiteliale. Pentru a verifica această ipoteză, am examinat capacitatea inducerii producerii de IL-8 de către izolate HCMV și replicarea virală într-o altă celulă epitelială, în celula A549. Am determinat relația dintre cantitatea de citokine produsă, frecvența expresării genelor foarte timpurii și încărcătura virală. S-a constatat, că izolatele HCMV au capacitate diferită în inducerea producerii de IL-8 în celulele epiteliale A549 și că numărul celulelor care exprimă gene foarte timpurii și încărcătura virală depind de cantitatea de IL-8 produsă. Se poate presupune că evoluția infecției HCMV *in vitro* în celulele epiteliale este determinată primar de diferențele în tropism ale tulpinilor virale, unul dintre factorii acestuia fiind capacitatea inducerii producerii de IL-8.

Human cytomegalovirus strains elicit different levels of IL-8 and permissiveness in epithelial cells

Epithelial cells are targets of permissive infection by human cytomegalovirus (HCMV) *in vivo* during acute disease. We observed that syncytiotrophoblast (ST) cells infected with HCMV strains isolated from congenital infections induced different amount of interleukin-8 (IL-8) and immediate-early (IE) viral gene expression. This suggests that interstrain differences in HCMV-epithelial cell tropism may determine the outcome of HCMV infection. To test this hypothesis and to establish whether the permissiveness of HCMV infection in epithelial cells depends primarily on the IL-8-inducing capacity of the strain, A549 cells were infected with HCMV isolates of different origins. The data revealed that the IL-8-inducing capacities of various HCMV isolates differed in the A549 cell cultures, and the IE gene expression and the virus production were IL-8 dose-dependent.

Orvostudományi Értesítő, 2007, 80 (1): 43-45

www.emeogysz.ro

A humán cytomegalovírus (HCMV) a Herpesviridae család ubikviter előfordulása tagja. A többi herpesvírushoz hasonlóan immunkompetens egyénben tünetmentes, vagy esetleg enyhe tünetekkel járó akut fertőzést okoz. Ezt követően klinikai tünetek nélkül perzisztál a szervezetben és reaktiválódva újra aktív fertőzést okoz. A vírus okozhat különböző súlyosságú klinikai tünetekkel járó megbetegedéseket is, ha a szervezet immundeficiens állapotba kerül. Ez bekövetkezhet természetes úton (veleszületett vagy szerzett immundeficiens állapot) vagy immunszuppresszió következtében, így a szerv vagy csontvelő transzplantáltakban, kemoterápiás kezelésben részesülő daganatos betegekben. A betegség lefolyása rendszerint kedvezőbb, ha az újra fertőződés CMV-specifikus immunállapot jelenlétében történik [1].

In vivo a HCMV különböző sejt típusokat, így epithelsejteket is fertőz. Immunkompetens egyénben az epithelsejtek központi szerepet játszanak a HCMV terjedésében és a perzisztenciában [1]. A HCMV *in vitro*, epithelsejtekben történő szaporodásának mértékével kapcsolatos eredmények ellentmondóak [2]. A HCMV epithelsejt tropizmusának elemzése során a legtöbb esetben laboratóriumi törzseket alkalmaztak és nem vették figyelembe a törzsek közötti különbségeket. Kevésbé ismertek a HCMV epithelsejt tropizmusát meghatározó virális faktorkok. Korábbi vizsgálataink szerint a HCMV izolátumokkal fertőzött syncytiotrophoblast (ST) tenyészetekben a képződött IL-8 mennyiségétől függ a vírus igen korai gén (IE)-jét kifejező sejtek száma [3]. Ismerve, hogy az IL-8 számos sejtféleségekben fokozza a HCMV szaporodását [4], valószínű, hogy az izolátumok IL-8 indukáló képessége össze-

függ szaporodásuk mértékével a ST-okban és esetleg egyéb epithelsejtekben is. Feltételezésünk alátámasztására vizsgáltuk egy másik epithelsejtben, az A549 sejtben a különböző HCMV izolátumok IL-8-at indukáló képessége és a fertőzés kimenetele közötti összefüggést. Meghatároztuk a képződött citokin mennyisége, az IE gén kifejeződésének gyakorisága és az infektív vírushozam közötti kapcsolatot.

Anyag és módszer

Vírus. Vizsgálatainkhoz AD169 és Towne laboratóriumi törzset, valamint HCMV izolátumokat használtunk. Az E33, S és 128V jelű klinikai izolátumok kongenitálisan fertőzött csecsemő vizeletéből, az E5 jelű felnőtt beteg vizeletéből, a 74 és 20 jelű pedig vesetranszplantált beteg véréből származott. Az S jelű izolátumot Dr. Schirm J. (Regional Public Health Laboratory, Groningen, Hollandia), a 74 és 20 jelű izolátumot Bruggeman C. professzor (Department of Medical Microbiology, University Hospital Maastrich, Hollandia) bocsátotta rendelkezésünkre. A többi HCMV törzset laboratóriumunkban izoláltuk MRC-5 sejten. Az infektív vírus mennyiségének meghatározása MRC-5 sejtenyészetben plakk módszerrel történt.

Sejtenyésztés. A humán alveoláris sejt karcinómából származó A549 tüdő epithelsejteket 24 vályulatú tenyésztőlemezben 37°C-on 5% CO₂-ot tartalmazó, 100%-os relatív páratartalmú termosztátban inkubáltuk. A vályulatokba 2×10⁵ sejtet mértünk 1ml tápfolyadékban [Dulbecco Minimal Essential Medium (MEM), 10% fetal borjúsavó (FBS) és antibiotikumok (penicillin, gentamycin és mycostatin)].

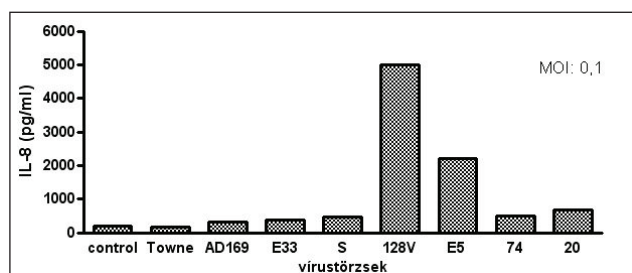
Izolátumok IL-8 indukáló képességének vizsgálata. A 24 órás A549 sejtenyészeteket egyszer mostuk FBS mentes Dulbecco MEM-mel és fertőztük HCMV-vel. A vírus/sejt arány, azaz a multiplicity of infection (MOI) 0,1 vagy 1 plakk-formáló egységnyi (PFE) vírus/sejt volt. A kontroll (álfertőzött) és fertőzött sejteket 25°C-on 750 x g-vel 60 percig centrifugáltuk majd 2 órán át termosztátban inkubáltuk. Az inkubációt követően a vírus inoculomot eltávolítottuk, a sejteket ötször mostuk FBS mentes Dulbecco MEM-mel. A fertőzött sejtek további inkubációja 1% FBS-t és antibiotikumokat tartalmazó Dulbecco MEM-ben, termosztátban a fenti körülmények között történt. A sejtenyészetek felülúszóit a fertőzést követő különböző időpontokban összegyűjtöttük, centrifugáltuk és -70 °C-on tároltuk. A felülúszókban található IL-8 értékmérése ELISA kittel történt (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN).

Immunfluoreszcens módszer. A fertőzést követő 48 óra múlva a sejtenyszetet fixáltuk -20 °C-on acetone: etanol 1:1 arányú keverékével. A HCMV-sal fertőzött sejtek magjában az IE antigént indirekt immunfluoreszcens módszerrel mutattuk ki. Első ellenanyagként egérben termelt IE specifikus monoklonális ellenanyagot (MAB810) (Chemicon International Inc., Temecula, CA USA), második ellenanyagként fluoreszcein izotiocianát (FITC)-konjugált, egér immunoglobulinra specifikus nyúlsvót használtunk (Sigma). A sejtek magját 4',6-diamino-2-fenilindollal (DAPI) festettük. Az UV-mikroszkópban megszámláltuk a DAPI-val festett sejtmagok és az IE antigén pozitív sejtek számát 30-30 látótérben. A fertőzés hatásosságát a 400 sejtre vonatkoztatott IE-t kifejező sejtek számának átlagával $\pm$ standard deviáció értékével adtuk meg.

Vírushozam meghatározása. Az izolátumukkal fertőzött sejtekben képződött vírus extracelluláris mennyiségét MRC-5 sejtekben plakk módszerrel határoztuk meg.

Eredmények

Munkánk során vizsgáltuk különböző HCMV izolátumok IL-8-at indukáló képessége és a fertőzés kimenetele közötti összefüggést az A549 epithelsejtben. Az in vivo viszonyokhoz hasonló körülményeket utánozva a MOI alacsony (0,1) volt. Az IL-8 mennyiségét mind a kontroll tenyészet, mind a laboratóriumi (AD169 és Towne) törzsekkel fertőzött tenyészetek és a legtöbb izolátummal fertőzött tenyészet tápfolyadékában alacsonynak találtunk. A 128V és az E5 törzsek



1. ábra. HCMV törzsek IL-8 termelése A549 sejten

lényegesen nagyobb mennyiségű IL-8-termelést indukáltak (1. ábra). A HCMV fertőzött sejtekben az IE gén kifejeződésének mértéke a laboratóriumi (AD169 és Towne) törzsekkel fertőzött tenyészetekben alacsonyabb volt, mint az izolátumokkal fertőzött tenyészetekben. Az E5 jelű izolátummal fertőzött tenyészetben 3-szor, míg a 128V jelű izolátummal fertőzött tenyészetben 7-szer több IE génterméket tartalmazó sejt volt, mint a laboratóriumi törzsekkel fertőzött tenyészetekben (1. táblázat). A 128V és az E5 jelű törzsek szaporodása jelentős volt a laboratóriumi (Towne) törzs szaporodásával szemben. Az extracelluláris vírus mennyiségének maximuma a fertőzést követő a 3-4. napon volt (2. ábra).

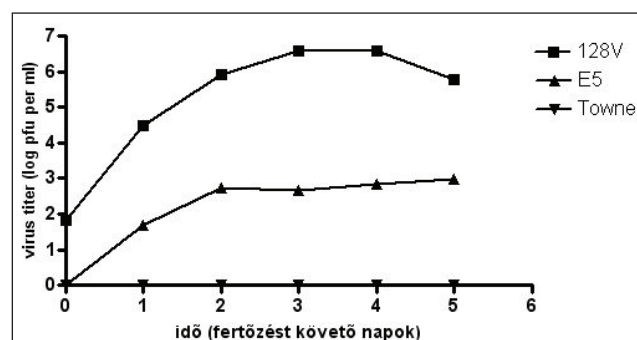
1. táblázat. HCMV izolátumokkal fertőzött A549 sejtekben1 képződött IL-8 és IE kapcsolata

HCMV izolátumok2	IL-8 pg/ml	IE3 antigén pozitív sejtmagok száma/ 400 sejt
-	108	-
E33	385	5,7 $\pm$ 2,5
128V	5009	14 $\pm$ 3,0
E5	2216	7,1 $\pm$ 3,0
Towne	156	1,9 $\pm$ 0,4
AD169	329	3,0 $\pm$ 1,3

¹48 órával a fertőzést követően, ²MOI: 0,1, ³igen korai antigén

Megbeszélés és következtetés

A vizsgálat eredményei azt mutatják, hogy a HCMV izolátumok IL-8-at indukáló képessége különböző az A549 epithelsejtben is. Megállapítható, hogy a képződött IL-8 mennyisége összefügg a vírus IE génjét expresszáló sejtek számával és a vírushozammal. Ez arra utal, hogy bizonyos HCMV gén(ek) kifejeződése szükséges(ek) a vírus szaporodásához epithelsejtben. Egyike lehet ezeknek az IL-8 termelést indukáló gén. Feltételezhető, hogy egyes HCMV törzsek azáltal, hogy epithelsejtben nagymennyiségű IL-8 termelést indukálnak megteremtik maguknak a szaporodásukhoz szükséges optimális viszonyokat nemcsak in vitro, hanem in vivo is. Az alacsony szintű IL-8 termelést indukáló törzsek a fertőzött sejtekben csak perzisztálnak, szaporodásukhoz pedig egy felülfertőző vírus vagy baktérium biztosíthatja az optimális IL-8 szintet. Annak igazolására, hogy



2. ábra. HCMV törzsek szaporodása A549 sejten

a HCMV-vel fertőzött epithelsejtekben a fertőzés kimeneteleiben a vírus törzsek IL-8 termelést indukáló képessége jelentős, esetleg elsődleges szerepet játszik, további vizsgálatok szükségesek.

Köszönetnyilvánítás

A vizsgálatokat az OTKA T-26442 számú és az Oktatási Minisztérium FKFP 113/2000 számú támogatásával végeztük.

Irodalom

1. Britt W. J., Alford C. A. - *Cytomegalovírus*, In: Field's Virology Vol. 2, 3rdend. (Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M. eds), Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996, 2483-2523.
2. Kahl M. et al. - *Efficient lytic infection of human arterial endothelial cells by human cytomegalovirus strains*, J Virol, 2000, 74 (16): 7628-7635.
3. Kovács I. J., Hegedűs K., Pál A., Pusztai R. - *Production of proinflammatory cytokines by syncytiotrophoblast cells infected with human cytomegalovirus isolates*, Placenta (közlés alatt).
4. Murayama T., Mukaida N., Khalid S. et al. - *Potential involvement of IL-8 in the pathogenesis of human cytomegalovirus infection*, J Leuk Biol, 1998, 64: 62-67.