

รายงานฉบับสมบูรณ์

(1 ธันวาคม 2538 - 30 พฤศจิกายน 2540)

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลภายใน
เซลล์ประสาทภายหลังการติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้า

จีย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุขธิดา อูบล

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

รายงานฉบับสมบูรณ์

(1 ธันวาคม 2538 - 30 พฤศจิกายน 2540)

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลภายใน
เซลล์ประสาทภายหลังการติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้า

เมธีวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุขธิดา อุบล

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

rabies virus เป็นจุลชีพที่ก่อให้เกิดโรคกลัวน้ำ (hydrophobia) ซึ่งเป็นที่รู้จักกันมานานกว่าศวรรษ แต่ยังไม่ปรากฏวิธีการรักษา ผู้ป่วยเมื่อเริ่มแสดงอาการจะต้องเสียชีวิตทุกราย การป้องกันสามารถกระทำได้โดยการรับวัคซีนภายหลังจากถูกสัตว์ที่เป็นบักกัด ปัจจัยที่ทำให้การรักษาไม่ประสบผลสำเร็จนั้นประกอบไปด้วยหลายประการ ปัจจัยหลักประการหนึ่งคือ กลไกในการเกิดโรคยังไม่เป็นที่ทราบอย่างถ่องแท้ โครงการวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษากลไกการตายของเซลล์ประสาทภายหลังการติดเชื้อ rabies virus โดยทำการศึกษาในสัตว์ทดลองควบคู่ไปกับการศึกษาการตายของเซลล์ประสาท (neuroblastoma cell time) ในหลอดทดลอง

การติดเชื้อ rabies virus ใน mouse neuroblastoma cells ก่อให้เกิดการตายของเซลล์ดังกล่าวด้วยกลไก apoptosis ซึ่งพิสูจน์ได้จากลักษณะ chromatin condensation และ DNA laddering ของเซลล์ที่ติดเชื้อ และเมื่อตรวจ DNA repairing system ของเซลล์ที่ติดเชื้อพบว่า การ degrade ของสาย DNA นั้น เกิดควบคู่ไปกับการเสื่อมสลายของ poly ADP-ribose polymerase (PARP) ซึ่งเป็น marker ตัวหนึ่งของ DNA repairing system การเสื่อมสลายของ PARP นั้น พบว่าเกิดขึ้นเนื่องมาจาก upregulation และ activation ของเอนไซม์ในกลุ่ม cysteine protease (ICE, CPP-32) โดยที่ PARP นั้นจัดว่าเป็น substrate ตัวหนึ่งของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ นอกจากนี้ยังพบว่า apoptosis ใน neuroblastoma cells ที่ติดเชื้อมันถูกควบคุมโดยอัตราส่วนระหว่าง bcl-2 (apoptotic negative regulatory gene) และ Bax (apoptotic positive regulatory gene) พบ expression ของ bax เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ bcl-2 ไม่เปลี่ยนแปลง การที่มี Bax เพิ่มมากขึ้นจึงเป็นการกระตุ้น apoptosis ผลสรุปจากการศึกษาในหลอดทดลองคือ เมื่อ infect เซลล์ neuroblastoma ด้วย rabies virus จะมีการกระตุ้นการแสดงออกของ Bax ซึ่งเป็นสัญญาณให้เซลล์ตัดสินใจเข้าสู่ programmed cell death การตายที่เกิดขึ้นนั้นผ่านทางกระตุ้น ICE gene และ/หรือ protease ตัวอื่น ๆ ส่งผลให้เกิดการทำลายของ DNA repairing system ดังนั้นเมื่อเกิดการทำลาย DNA โดยการทำงานของ endonuclease จึงไม่มีการซ่อมแซมและเซลล์ตายในที่สุด

การตายของเซลล์ในหลอดทดลองข้างต้นได้นำมาศึกษาเปรียบเทียบกับ การตายของสัตว์ทดลองที่ได้รับเชื้อ rabies virus พบว่าเซลล์ประสาทของหนูที่ได้รับ fixed strain of rabies virus (CVS) และ street rabies virus (dog, bat strain) ตายโดยกลไก apoptosis เช่นเดียวกับเซลล์ในหลอดทดลอง การเกิด apoptosis ในหนูทดลองนี้ไม่เกี่ยวข้องกับบทบาทของ immunological mediators ทั้งนี้เพราะหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน (T & B cells ไม่ทำงาน) เซลล์ประสาทที่ติดเชื้อมีตายด้วยขบวนการเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่า apoptosis ของเซลล์ประสาทนั้นเกิดขึ้นก่อนที่หนูจะแสดงอาการป่วย การตรวจสอบ gene ที่เข้ามาเกี่ยวข้องพบในลักษณะเดียวกับเซลล์ในหลอดทดลอง กล่าวคือ bcl-2 gene ไม่เปลี่ยนแปลง มีการ upregulate การแสดงออกของ ICE gene และนอกจากนี้ยังมีการแสดงออกของ Nedd-2 gene

ผลการศึกษาจากโครงการวิจัยนี้และจากรายงานของนักวิจัยอื่นๆ พอที่จะสรุปพยาธิสภาพของโรคพิษสุนัขบ้าได้อย่างกว้างๆ คือ เมื่อสัตว์ได้รับ rabies virus ไวรัสจากบาดแผลเดินทางเข้าสู่ระบบประสาทเจริญเติบโตใน neuron และการเจริญเติบโตของไวรัสนั้นทำให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ และเชื่อว่าในขณะที่ neuron เข้าสู่ apoptosis โดยที่เซลล์ยังไม่ dissociate นั้น neuron ดังกล่าวจะต้องปล่อย factors ต่างๆ ออกมาอย่างผิดปกติ ผลของ factors ต่างๆ เหล่านี้บวกกับกระบวนการที่ยังไม่ทราบส่งผลให้เกิด leakage ของ blood brain barrier ติดตามด้วย influx ของ activated immune cells เข้าไปใน brain ซึ่งจะเป็นการขยายการตายของ brain cells ให้เกิดมากขึ้น อนึ่งการเกิด apoptosis ไม่สามารถอธิบาย clinical manifestation ของโรคได้ แต่คาดว่า factors ต่างๆ ที่ปล่อยมาจาก apoptotic neuron และบทบาทของ activated immune cells จะเป็นตัวกำหนด paralytic หรือ encephalitic type of rabies

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลภายในเซลล์ประสาทภายหลังการติดเชื่อโรคพิษสุนัขบ้า

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษากลไกการตายของเซลล์ประสาท ซึ่งติดเชื่อโรคพิษสุนัขบ้า โดยทำการศึกษาในสัตว์ทดลองควบคู่ไปกับการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง (mouse neuroblastoma cells)

สรุปผลการทดลองที่ค้นพบ

กลไกการตายของเซลล์ภายหลังติดเชื่อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงและในสัตว์ทดลอง ให้ผลสอดคล้องกันคือ เป็นกลไกเดียวกัน genes และโปรตีนที่เกี่ยวข้องเท่าที่ทำการศึกษาเป็นตัวเดียวกัน กล่าวคือ

1. ภายหลังการติดเชื่อ rabies virus เซลล์เป้าหมายจะตายด้วยกลไก apoptosis โดยที่การเกิด apoptosis จะสอดคล้องกับ kinetics of replication ของไวรัสในเซลล์ประสาทและเซลล์เพาะเลี้ยง

2. cleavage ของ DNA ใน apoptotic cell เกิดขึ้นควบคู่ไปกับการที่ DNA repairing system ถูกทำลาย

3. signal ชนิดหนึ่งที่ควบคุมการเข้าสู่ programmed cell death ของเซลล์ที่ติดเชื่อ rabies virus คือ ratio ระหว่าง bcl-2 และ Bax โดยเซลล์ที่ติดเชื่อนั้นสร้าง bcl-2 ในปริมาณปกติ แต่มีการสร้าง Bax เพิ่มมากขึ้น

4. proteases ที่เกี่ยวข้องกับการทำลาย DNA repairing system คือ ICE และ CPP-32

5. ในหนูทดลอง ขบวนการ apoptosis ในเซลล์ประสาทเกิดขึ้นก่อนที่สัตว์ทดลองนั้นจะแสดงอาการป่วย

6. ขบวนการ apoptosis ในสัตว์ทดลองที่ได้รับเชื่อนั้น เกิดขึ้นโดยการกระตุ้นของ rabies virus และไม่ขึ้นกับบทบาทของ immunological mediators

7. ในสัตว์ทดลองนอกจาก Bax และ ICE ที่ทำหน้าที่ควบคุมการเกิด apoptosis แล้วยังพบว่า Nedd-2 gene ซึ่งควบคุม neuron development ในช่วง embryonic stage และถูก suppressed ไปเมื่อหนูโตเต็มที่ Nedd-2 gene จะถูกกระตุ้นให้แสดงออกอีกครั้งหนึ่งเมื่อ neuron นั้นตาย โดย rabies virus-induced apoptosis

บทนำและที่มาของปัญหา

โรคพิษสุนัขบ้าและโรคกลัวน้ำนับว่าเป็นที่รู้จักมานานกว่าสองศตวรรษ (1) ในปัจจุบันโรคพิษสุนัขบ้ายังคงเป็นปัญหาในหลาย ๆ ส่วนของแต่ละทวีป รายงานขององค์การอนามัยโลกในปี 1994 พบผู้เสียชีวิตจากโรคดังกล่าว 34,110 ราย โดยส่วนใหญ่มาจากทวีปเอเชีย (33801 ราย) นอกนั้นมาจากทวีปอเมริกาและแอฟริกา ในประเทศที่พัฒนาแล้วและมีการบริหารจัดการวัคซีนเป็นอย่างดี การระบาดของโรคจะเป็นปัญหาในสัตว์ป่า และผู้เสียชีวิตติดโรคจากสัตว์ป่า แต่ในประเทศที่กำลังพัฒนาในแถบเอเชีย ปัญหาการติดเชื้อจะมาจากสัตว์เลี้ยงและสัตว์จรจัดเป็นหลัก (2)

พยาธิสภาพของการเป็นโรคกลัวน้ำนั้นกล่าวโดยทั่วไปคือ เมื่อถูกสัตว์ที่เป็นบ้ากัด ระยะฟักตัวจะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของบาดแผล ตำแหน่งที่ถูกกัด และปริมาณของไวรัสที่อยู่ในน้ำลายของสัตว์ในขณะที่ถูกกัด โดยปกติระยะฟักตัวจะอยู่ในช่วง 1-2 เดือน มีรายงานว่าระยะฟักตัวอาจจะสั้นกว่า 7 วันหรือยาวนานถึง 6 ปี (1, 3) อาการทางคลินิกมีสองลักษณะคือ paralytic หรือ dumb rabies และ encephalitic หรือ furious rabies นักวิจัยหลาย ๆ กลุ่มได้พยายามศึกษาถึงสาเหตุที่ทำให้เกิด clinical diversity ในโรคกลัวน้ำ

โดยทั่วไป พยาธิสภาพของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสหรือจุลชีพอื่น ๆ จะถูกกำหนดโดยปัจจัยหลัก 2 ปัจจัยคือ

I ปัจจัยที่มาจากตัว host เช่น ระบบภูมิคุ้มกัน, พันธุกรรม, ความสมบูรณ์ของร่างกาย, ระบบฮอร์โมน เป็นต้น

II ปัจจัยที่มาจากตัวไวรัสหรือคุณสมบัติของจุลชีพนั้น ๆ

I ปัจจัยที่มาจาก host

ปัจจัยของ host ที่มีผลต่อลักษณะอาการทางคลินิกของโรคพิษสุนัขบ้าได้มีผู้ทำการศึกษาอย่างกว้างขวาง โดยมุ่งเน้นไปที่บทบาทของ immunological mediators โดยเฉพาะบทบาท T-cell responses บทบาทของ T-cell responses ต่อลักษณะอาการทางคลินิกแตกต่างกันเล็กน้อย กล่าวคือ หนูที่มี active T-cells response จะแสดงอาการ paralysis ในขณะที่ผู้ติดเชื้อ rabies virus และมี active T-cell response จะแสดงอาการ encephalitic rabies (4,5,6,7) สิ่งหนึ่งที่สอดคล้องกันระหว่างหนูที่ติดเชื้อและคนที่ติดเชื้อและมี active T-cell responses คือทั้งหนูและคนเหล่านั้นจะมี survival time ที่สั้นกว่า หนูหรือคนที่ติดเชื้อแต่ไม่พบ active T-cell responses (3) ในขณะที่ humoral antibody มีบทบาทสำคัญต่อ protection (8) นอกจากนั้นยังพบว่าในผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้า นั้นไม่ว่าจะแสดงอาการ paralytic หรือ encephalitic rabies ไม่ใช่ทุกรายที่จะตรวจพบ detective level of immune responses to either rabies antigens or brain antigens (7) จากข้อมูลเหล่านี้อาจจะกล่าวได้ว่า T-cell response ไม่ได้อธิบาย primary cause ของลักษณะอาการทางคลินิก

ปัจจัยจาก host ที่มีผู้ศึกษานอกเหนือจากระบบภูมิคุ้มกัน เช่น serotonin, acetylcholine, neuropeptide, hormone etc. โดยคาดว่ามีการเปลี่ยนแปลงของระดับ IL-1 ในสมอง

จะส่งผลต่อ serotonin metabolism ซึ่ง serotonin นั้นมีบทบาทต่อเนื่องไปถึง acetylcholine system โดยอาจส่งผลให้เกิด desensitized muscarinic Ach R. ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับอาการทางคลินิกแบบ encephalities (3,9,10,11,12,13)

II ปัจจัยที่มาจากตัวไวรัสหรือคุณสมบัติของไวรัส

เดิมเชื่อกันว่า rabies virus ไม่ได้ทำให้เกิดการตายของเซลล์เป้าหมายโดยตรง ทั้งนี้เนื่องมาจากไม่ปรากฏ necrosis หรือ neuropathia ของเซลล์ประสาทในสัตว์ที่ติดเชื้อ ข้อมูลที่สนับสนุนในข้อที่ว่าคุณสมบัติของเชื้อไวรัสมีบทบาทต่อ pathogenesis เช่น พบว่า glycoprotein G ของ rabies virus โดยเฉพาะ antigenic site III มีบทบาทโดยตรงกับ pathogenesis โดยพบว่า substitution ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 333 ของ glycoprotein G จาก arginine ไปเป็น glutamine หรือ isoleucine จะทำให้เกิด nonpathogenic mutants (14) การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเพียงหนึ่งตัวนี้ส่งผลให้เกิดความล่าช้าในขบวนการ entry และ spreading ของไวรัสในเซลล์เป้าหมาย (15, 16)

ในช่วงเวลาเดียวกับที่ข้าพเจ้าได้รับทุนเมธีวิจัยจากสกว. นั้น Alan Jackson และคณะได้ทำการศึกษาถึงบทบาทโดยตรงของ rabies virus ต่อเซลล์เป้าหมายและได้ตีพิมพ์ผลงานในรูปของ Notes ใน Journal of Virology เมื่อเดือน July, 1997 โดยรายงานว่า rabies virus สามารถกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ในเซลล์เป้าหมายได้ (17)

Apoptosis กับการติดเชื้อไวรัส

ในปัจจุบันพบว่าไวรัสหลายชนิดสามารถกระตุ้นให้เกิด apoptosis ในเซลล์เป้าหมายได้ การเกิด apoptosis ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสนั้นอาจจะถูกมองว่าเป็นกลไกหนึ่งของ defense mechanisms ได้ ถ้า apoptosis นั้นเกิดขึ้นสมบูรณ์ก่อนที่ไวรัสนั้น replicate ออกมาเป็น progeny ใหม่และต้องเป็น apoptosis ของ regenerating cells ถ้ากลไกนี้เกิดขึ้นกับ nonregenerating cells เช่น neuron defense mechanism นี้อาจส่งผลให้เกิดการตายหรือเป็นโรคได้ ไวรัสที่มี genome ขนาดใหญ่และใช้เวลาในการ replicate และสร้าง progeny นาน ไวรัสพวกนี้มักจะ carry gene ที่ทำหน้าที่ inhibit apoptosis เช่น BHRF-1 ของ Epstein-Barr Virus, iap ของ baculovirus, Crm A ของ Poxvirus เป็นต้น ไวรัสในกลุ่มนี้มักจะก่อให้เกิด tumor

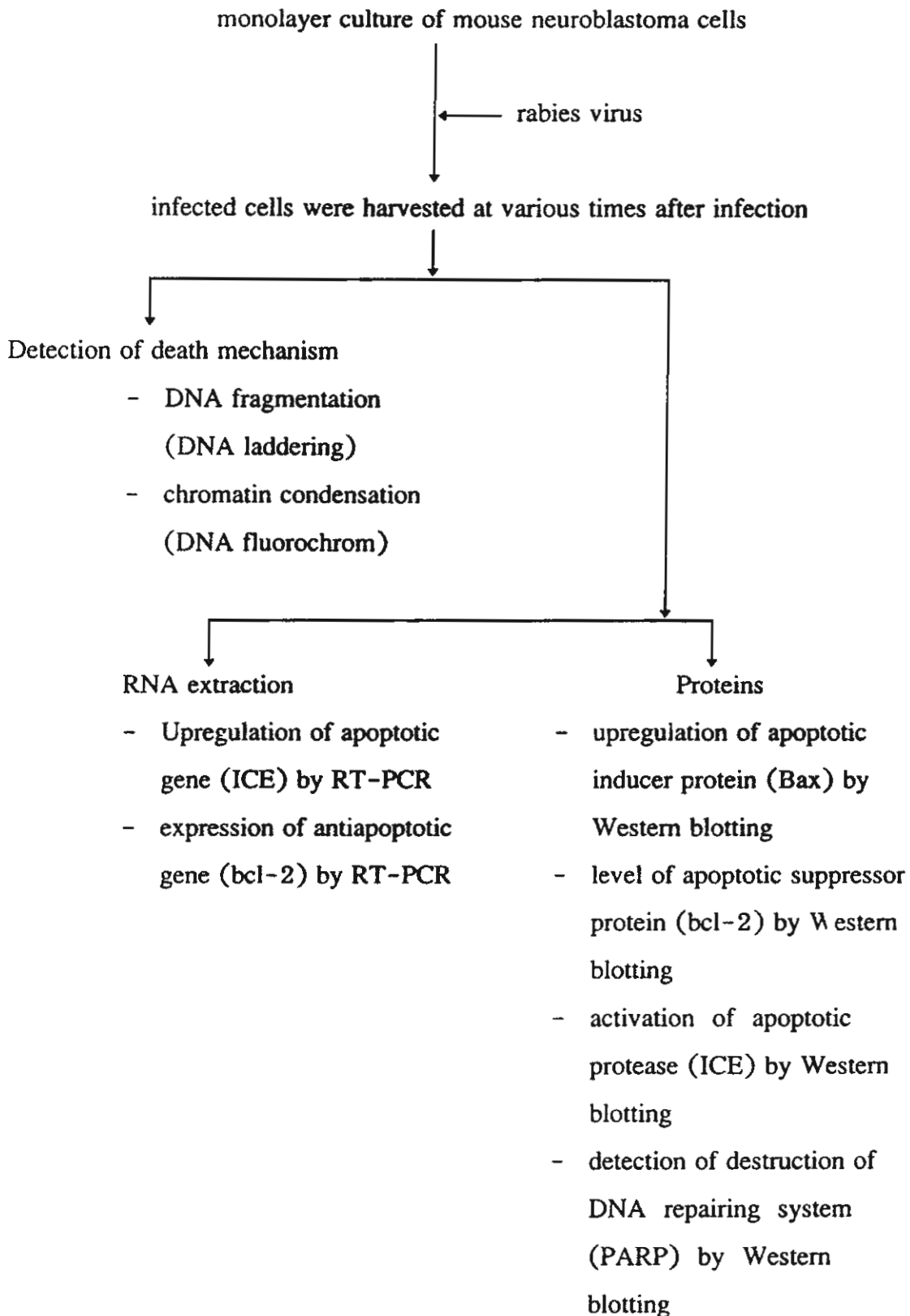
บทบาทของ viral induced apoptosis ต่อพยาธิสภาพของโรคติดเชื้อไวรัส ได้มีผู้ศึกษามากขึ้นและเริ่มจะเห็นบทบาทมากขึ้นทั้งในสภาวะที่เป็น apoptotic induction และ apoptotic inhibition ไวรัสสามารถก่อให้เกิดโรคได้ทั้งสิ้น การติดเชื้อ HIV เป็นตัวอย่างหนึ่ง ซึ่ง apoptosis ของ lymphoid tissue รวมทั้ง progenitor cells (18, 19) นำไปสู่สภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องและส่งผลให้เกิดการติดเชื้อฉวยโอกาสและอื่นๆ

ไวรัสที่มี genome ขนาดเล็กและ infect nonregenerating cells (neuron) เช่น Sindbis virus (SV) เป็นตัวอย่างที่แสดงให้เห็นว่า apoptosis ของเซลล์เป้าหมายส่งผลถึงพยาธิสภาพของโรคอย่างเด่นชัด SV จะเจริญเติบโตใน neurons และ progenies ของการเจริญโตจะถูกปล่อยออกจาก

เซลล์ก่อนที่เซลล์นั้นจะ dissociate ไปเป็น apoptotic bodies การตายของ neurons นี้ทำให้เกิด hindlimb paralysis และสัตว์ทดลองตายในที่สุด (20, 21) ในทางกลับกันถ้า neuron ซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมายนั้นถูก experimentally induced เกิด overexpression ของ bcl-2 gene เซลล์ดังกล่าวจะ replicate ให้ลูกหลานของไวรัสออกมาและกลายเป็น persistent culture ในขณะเดียวกัน overexpression ของ bcl-2 ในสัตว์ทดลองสามารถป้องกัน apoptosis ของ SV-infected neurons และป้องกันสัตว์ทดลองนั้นจาก fatal encephalitis ได้ (22, 23)

rabies virus เป็น neurotropic virus เจริญเติบโตใน neuron และทำให้เกิด apoptosis ของเซลล์ที่ rabies virus เข้าไปเจริญเติบโต โครงการวิจัยนี้ได้เสนอที่จะทำการศึกษากลไกการตายของเซลล์เป้าหมายภายหลังการติดเชื้อ rabies virus โดยจะติดตามการเปลี่ยนแปลงของ genes และ proteins บางตัว เช่น ICE, Bax เป็นต้น และศึกษาบทบาทของ immunological mediators ในการกระตุ้น apoptosis ดังกล่าว

ขั้นตอนในการทดลอง



ผลการทดลอง

I การศึกษาโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

1. กลไกการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อ rabies virus

การศึกษาการตายของเซลล์ที่ติดเชื้อในหลอดทดลอง เพื่อจะพิสูจน์ว่าเซลล์เหล่านั้นตายด้วยกลไก apoptosis หรือ necrosis เซลล์ที่ตายด้วย apoptosis จะแสดงลักษณะของ DNA laddering บน electrophoresis ในขณะที่ necrotic cells จะแสดงลักษณะ smear ของ DNA mouse neuroblastoma cells ที่ติดเชื้อ แสดงลักษณะของ DNA laddering ภายใน 48 ชม. หลังจาก infection (รูปที่ 1 A) เมื่อศึกษาลักษณะของ chromatin โดยการย้อมด้วย DNA fluorochrom เซลล์ที่ติดเชื้อ แสดงลักษณะ chromatin condensation (รูปที่ 2) ในขณะที่เซลล์ปกติจะมีการกระจายของ chromatin อย่างสม่ำเสมอใน nucleus การเกิด DNA laddering และ chromatin condensation เป็นการพิสูจน์ว่ากลไกการตายแบบ apoptosis ถูกกระตุ้นภายใน mouse neuroblastoma cells ภายหลังการติดเชื้อ rabies virus

2. การติดตามการแสดงออกของ apoptotic negative/positive regulators ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อ rabies virus

จากรายงานของนักวิจัยหลาย ๆ กลุ่ม พบว่าปริมาณของ bcl-2 และ Bax ภายในเซลล์จะเป็นตัวควบคุม survival/death pathway ของเซลล์นั้น ๆ ถ้าปริมาณ homodimer ของ bcl-2 สูงกว่า Bax homodimers ภายหลังที่ได้รับการกระตุ้น (การติดเชื้อไวรัส) เซลล์นั้นจะเข้าสู่ survival pathway แต่ถ้า Bax homodimers สูงกว่า bcl-2 เซลล์จะเข้าสู่ death pathway เพื่อควบคุมการตายของโปรตีนทั้งสองชนิดในการควบคุม survival/death ของเซลล์ที่ติดเชื้อ rabies virus ปริมาณ Bax และ bcl-2 proteins ภายหลังการติดเชื้อในช่วงเวลาต่าง ๆ จึงถูกติดตามโดยการย้อมด้วย specific antibody โดยวิธี Western blotting และทำการประมาณปริมาณของโปรตีนทั้งสองตัว โดยใช้ความเข้มข้นที่อ่านได้จากเครื่อง densitometer ดังแสดงในรูปที่ 3 จะเห็นได้ว่าปริมาณของ bcl-2 ไม่เปลี่ยนแปลงภายหลังการติดเชื้อ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ ในขณะที่ปริมาณของ Bax เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่า Bax เป็น gene ตัวหนึ่งที่ควบคุมการเข้าสู่ apoptotic death ของเซลล์ที่ติดเชื้อ rabies virus

3. ติดตามการกระตุ้นการสร้างและการทำงานของ apoptotic gene (ICE) ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อ rabies virus

ปริมาณการสร้างหรือการแสดงออกของ ICE นั้นถูกศึกษาโดยใช้ RT-PCR (ดังที่ได้กล่าวในวิธีการทดลอง) ปริมาณ ICE specific RNA จะถูกติดตามที่ช่วงเวลาต่าง ๆ กันภายหลังการติดเชื้อ รูปที่ 4 แสดงการเพิ่มปริมาณการแสดงออกของ ICE-RNA การแสดงออกนั้นสามารถตรวจพบได้อย่างชัดเจนเมื่อ 48 ชม. ภายหลังการติดเชื้อ แต่ไม่พบการแสดงออกที่ 24 ชม. คาดว่าการแสดงออกน่าจะเริ่มเปลี่ยนแปลงตั้งแต่หลัง 24 ชม. เป็นต้นไป การเพิ่มการแสดงออกของ ICE gene นั้นเห็นได้อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับการแสดงออกของ bcl-2 gene ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงเลยตลอด

ระยะเวลาของการติดเชื้อ ICE ที่ถูกสร้างขึ้นมานั้น ได้ถูกเปลี่ยนไปเป็น active form โดยการตรวจหา p20 ในเซลล์ที่ติดเชื้อในช่วงเวลาต่างๆ กันด้วย antibody ที่เฉพาะต่อ p20 โดยวิธี Western blotting ดังแสดงในรูปที่ 5 เซลล์ที่ไม่ได้ติดเชื้อจะมีปริมาณของ pro ICE ในระดับเดียวกันตั้งแต่เริ่ม culture จนถึงประมาณ 96 ชม.หลัง culture โดยไม่พบ p20 ในขณะที่เซลล์ซึ่งติดเชื้อจะเริ่มพบ p20 ตั้งแต่ 48 ชม.หลังการติดเชื้อและยังคงพบตลอดจนจบการทดลองที่ 96 ชม.ภายหลังการติดเชื้อ

4. การศึกษาการทำลาย DNA repairing system ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ

เมื่อมีการเพิ่มขึ้นในการแสดงออกของ ICE gene และมีการเปลี่ยน inactive form ของ ICE ให้กลายเป็น active form ในเซลล์ที่ติดเชื้อ แสดงว่า ICE อาจจะเป็น cysteine protease ที่สำคัญในการทำลาย DNA repairing system ในเซลล์ที่ติดเชื้อ PARP เป็นเอ็นไซม์ตัวสำคัญตัวหนึ่งในขบวนการซ่อมแซม DNA และ PARP ยังถูกพบว่าเป็น substrate ของ ICE เพื่อจะแสดงให้เห็นว่า active form ของ ICE ทำหน้าที่เป็น apoptotic protein โดยการทำลาย DNA repairing system จึงได้ทำการติดตามการย่อยของ PARP จาก active form (110 Kd) ให้กลายเป็น inactive form (84 Kd และ 40 Kd) โดยการใช antibody ที่เฉพาะต่อ 84 Kd ของ PARP เซลล์ที่ไม่ติดเชื้อจะพบ active form ของ PARP อยู่ตลอดการทดลอง (รูปที่ 6) ในขณะที่เซลล์ซึ่งติดเชื้อจะพบการทำลายของ PARP ให้กลายเป็น inactive form ภายใน 72 ชม.หลังการติดเชื้อ จึงเห็นได้ว่าการทำลาย DNA repairing system, การ activate ICE ให้อยู่ในรูปของ active form และการเกิด DNA fragmentation เริ่มต้นในช่วงเวลาที่สอดคล้องกันคือระหว่าง 24-48 ชม.ภายหลังการติดเชื้อ (รูปที่ 1, 5, 6)

5. การพิสูจน์ apoptotic function ของ ICE โดยใช้ ICE inhibitor

เพื่อเป็นการพิสูจน์การทำงานของ ICE ว่าเกี่ยวข้องโดยตรงกับ apoptotic death ของเซลล์ที่ติดเชื้อ จึงได้ทำการยับยั้ง activity ของ ICE โดยใช้ synthetic peptide ที่จับกับ active site ของ ICE แบบ irreversible แล้วติดตามวัดปริมาณ DNA fragmentation ที่เกิดขึ้นในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อโดยได้รับ synthetic peptide เปรียบเทียบกับปริมาณ DNA fragmentation ในเซลล์ที่ติดเชื้อโดยไม่ได้รับ inhibitor ด้วยวิธีการ ELISA ดังแสดงในรูปที่ 7 ซึ่งจะเห็นได้ว่าในสภาวะที่มี inhibitor ของ ICE ปริมาณ DNA fragmentation จะเกิดขึ้นน้อยกว่าเซลล์ติดเชื้อที่ไม่ได้ยับยั้งการทำงานของ ICE เป็นข้อมูลที่แสดงให้เห็นว่า ICE หรือ interleukin-1 converting enzyme มีบทบาทโดยตรงต่อ apoptotic death ของเซลล์ที่ติดเชื้อ rabies virus

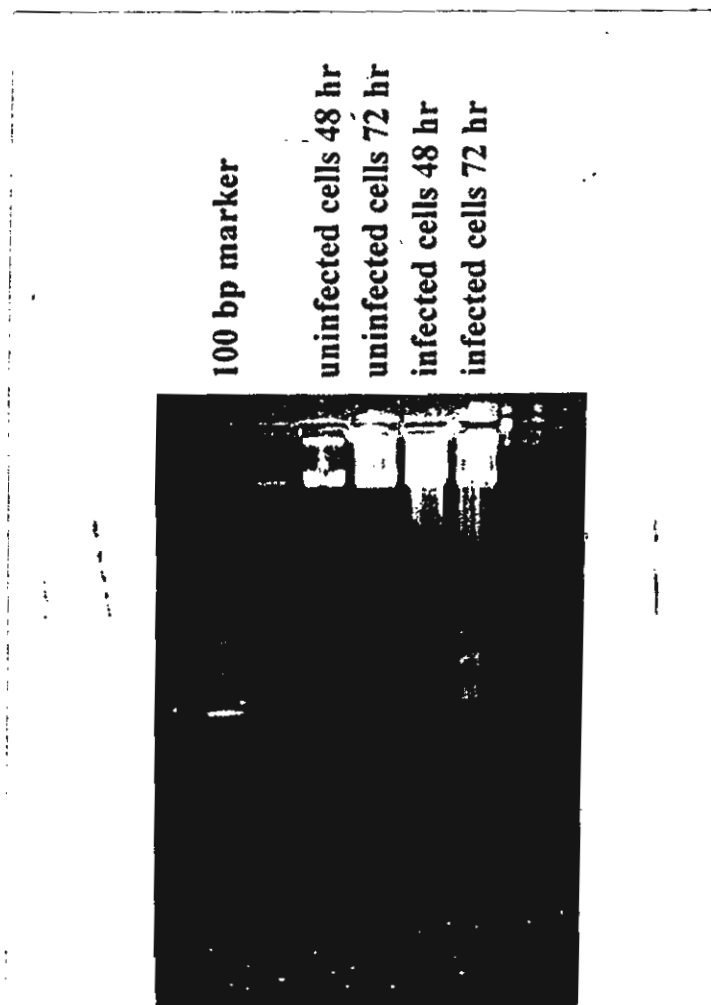
นอกจากนี้ยังได้ทดลองยับยั้งการทำงานของ protease อีกกลุ่มหนึ่ง ซึ่งพบว่ามียับยั้งต่อการเกิด apoptosis ในหลายๆ system คือ CPP-32 หรือ apopain โดยใช้ synthetic peptide ซึ่งเฉพาะต่อ active site ของ CPP-32 พบว่าสามารถยับยั้งการเกิด DNA fragmentation ได้อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าทั้ง ICE subfamily และ CED-3 subfamily ของ apoptotic proteases มีบทบาทโดยตรงต่อ apoptotic death ของเซลล์ที่ติดเชื้อ rabies viruses

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลองในหลอดทดลอง

การติดเชื้อ rabies virus กระตุ้นให้เกิด apoptosis death ของเซลล์เป้าหมาย จากผลการศึกษาพบว่าขบวนการเกิด apoptosis ใน system ดังกล่าวพอจะสรุปได้ตามแผนผังที่แสดงด้านล่าง กล่าวคือเมื่อไวรัสเข้าไปเจริญเติบโตในเซลล์จะเกิดขบวนการที่กระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่ survival pathway หรือ death pathway โดยมี bcl-2, Bax และ unidentified proteins เป็นตัวกำหนด ใน system ที่ศึกษาพบว่าปริมาณของ Bax เป็น regulatory protein ตัวหนึ่งที่กำหนดให้เซลล์ที่ติดเชื้อ rabies virus เข้าสู่ death pathway เมื่อเข้าสู่ death pathway แล้วจะมีการกระตุ้น proteases (ICE, CPP-32) ซึ่งเป็นตัวทำลาย DNA repairing system ในขณะที่ขบวนการ apoptosis ดำเนินอยู่นั้นจะมีการกระตุ้นการทำงานของ endonuclease ซึ่งจะเป็เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อย chromosome ให้เป็น fragment ดังนั้นเมื่อ endonuclease ถูกกระตุ้นให้ทำลาย DNA และในขณะเดียวกัน DNA repairing system ก็ถูกทำลายโดย protease เพราะฉะนั้นความเสียหายที่เกิดขึ้นต่อ DNA ของเซลล์จึงไม่มีการซ่อมแซม เซลล์จึงตายในที่สุด

II การศึกษาการตายใน *in vivo* หรือในหนูทดลอง

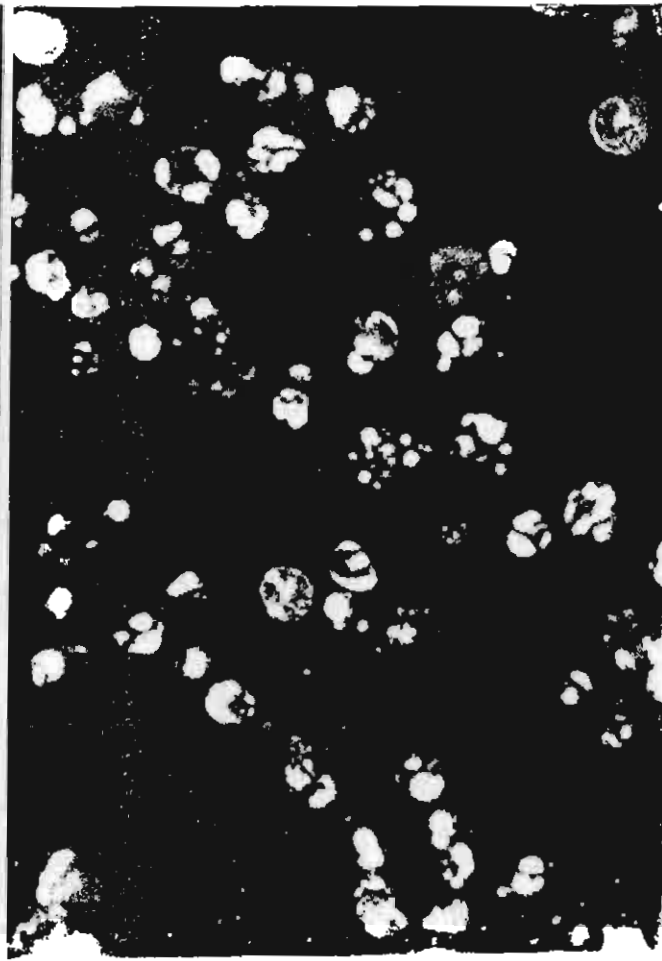
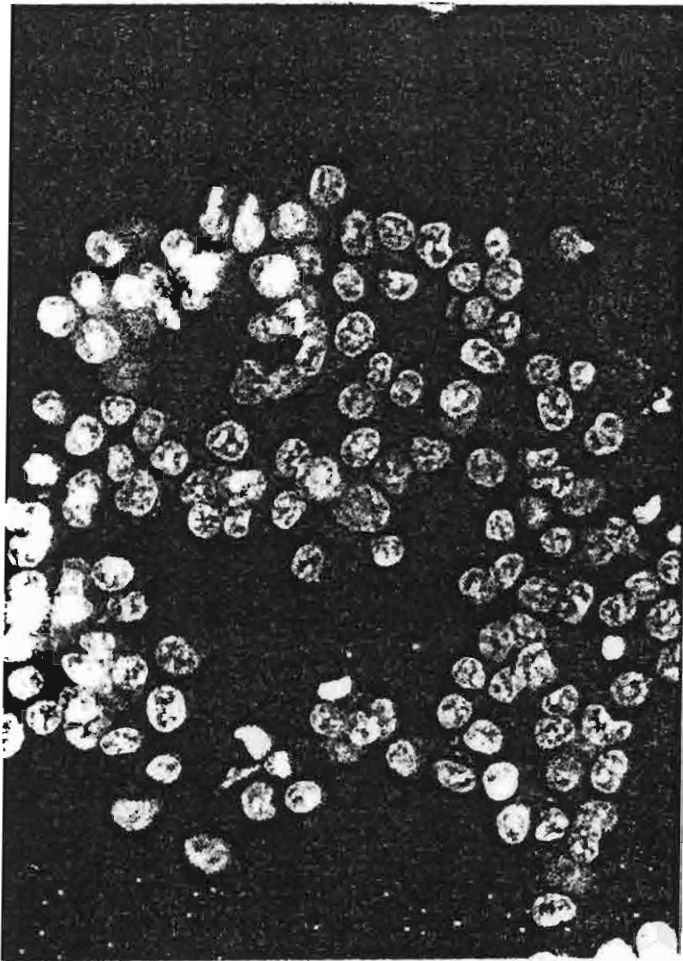
ขั้นตอนการศึกษาและผลการศึกษาเป็นไปตาม manuscript ที่แนบมา ซึ่งได้ submit ไปแล้ว และกำลังรอ final decision จาก Journal



รูปที่ 1 การเกิด DNA fragmentation หรือ DNA laddering ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อ rabies virus แสดง DNA laddering อย่างชัดเจน ภายใน 48 ชม.หลังการติดเชื้อ ในขณะที่เซลล์ ซึ่งไม่ติดเชื้อไม่แสดง fragmentation ของ DNA

A

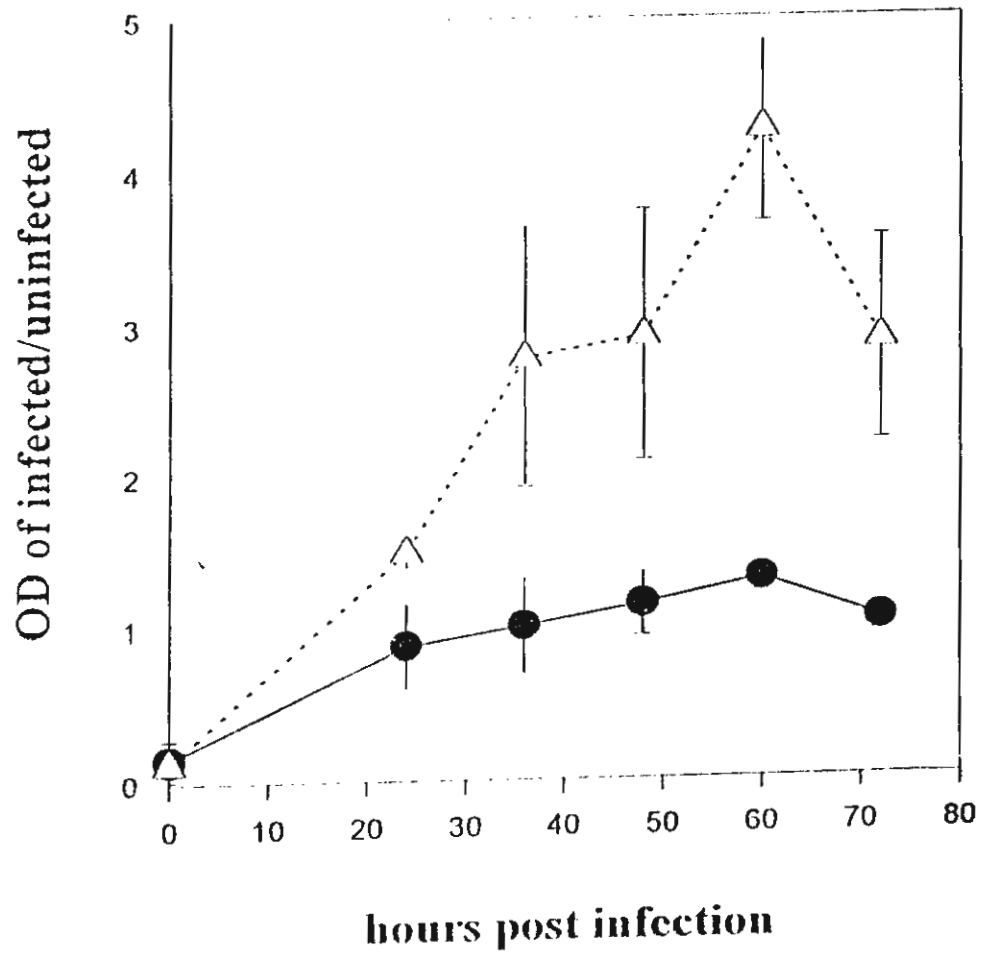
B



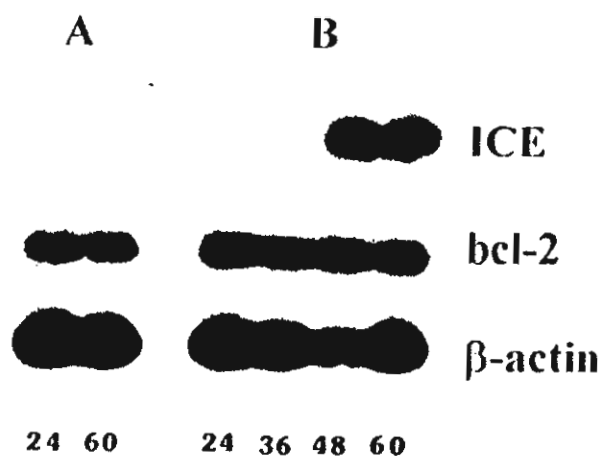
รูปที่ 2

แสดง chromatin condensation

- A. Uninfected cell : - chromatin กระจายอยู่ใน nucleus อย่างสม่ำเสมอ
- B. rabies virus infected cells : เกิดการเกาะกลุ่มของ chromatin
หรือ chromatin condensation



รูปที่ 3 ปริมาณการสร้าง Bax และ bcl-2 proteins ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ (●—●) bcl-2
(○.....○) Bax

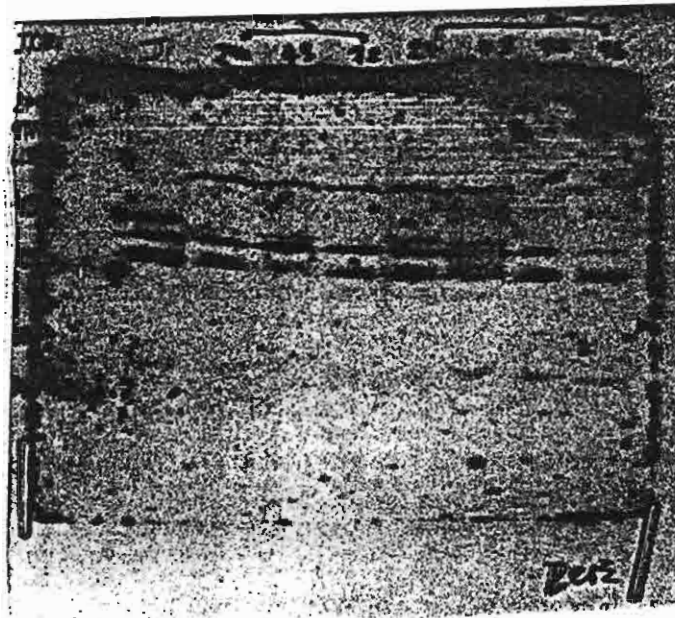


รูปที่ 4 แสดงการเพิ่มการแสดงออกของ ICE gene ภายหลังการติดเชื้อ เปรียบเทียบกับการแสดงออกของ bcl-2 gene ซึ่งไม่เปลี่ยนแปลง โดยมี actin gene เป็นตัว standardize ปริมาณ DNA ที่ใช้ในแต่ละช่วงเวลา

A = uninfected cells

B = infected cells

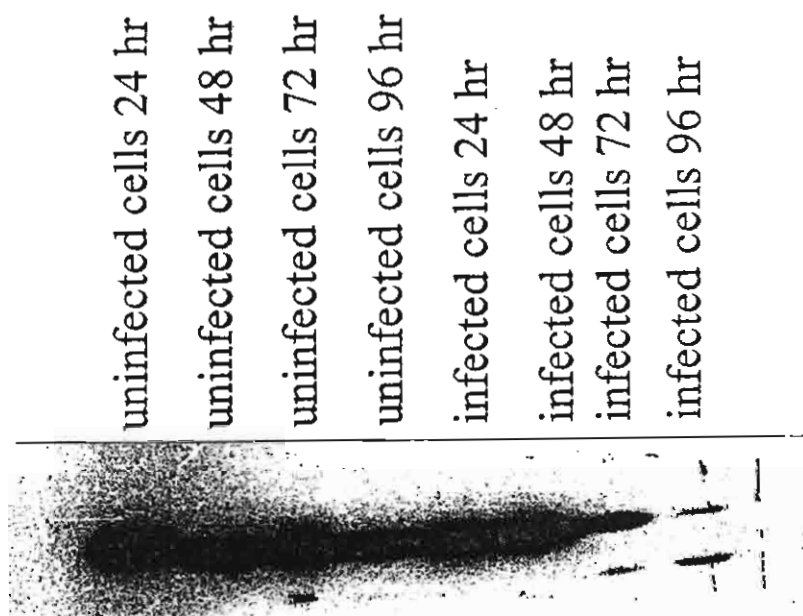
Turkat cells control
 uninfected cells 24 hr
 uninfected cells 48 hr
 uninfected cells 72 hr
 infected cells 24 hr
 infected cells 48 hr
 infected cells 72 hr
 infected cells 96 hr



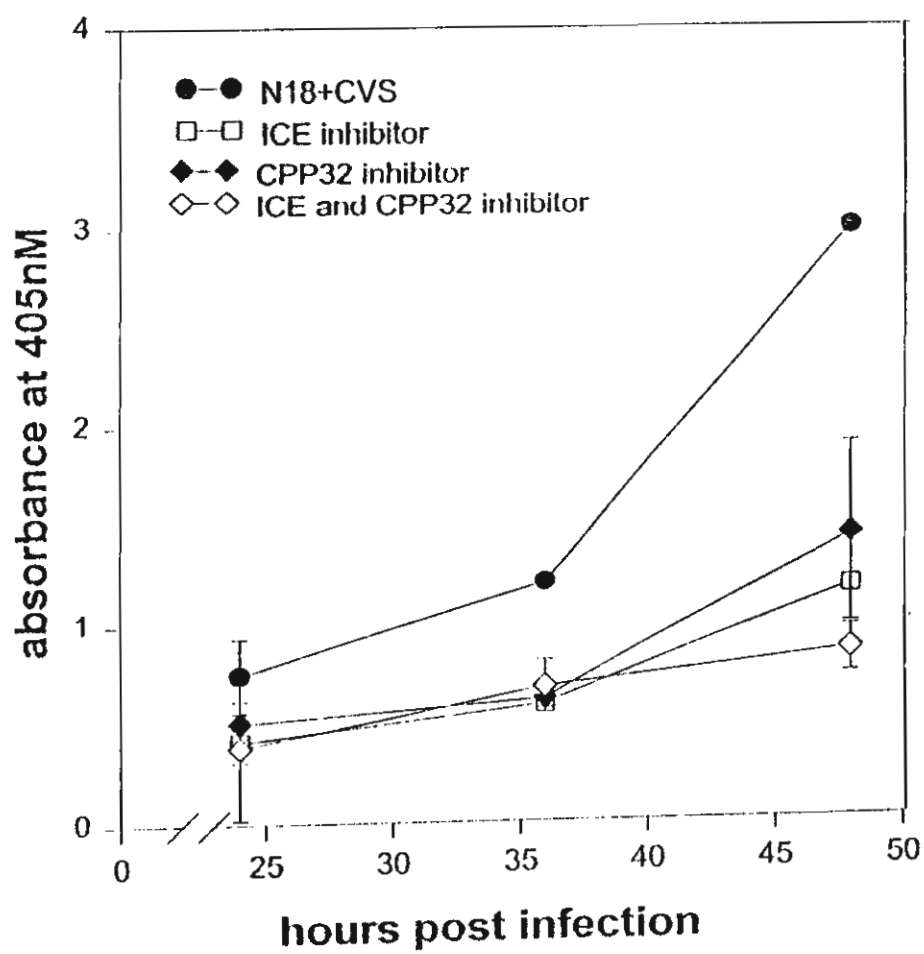
— proICE

— p20

รูปที่ 5 การตรวจหา active form (p20) ของ ICE ในเซลล์ที่ติดเชื้อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ

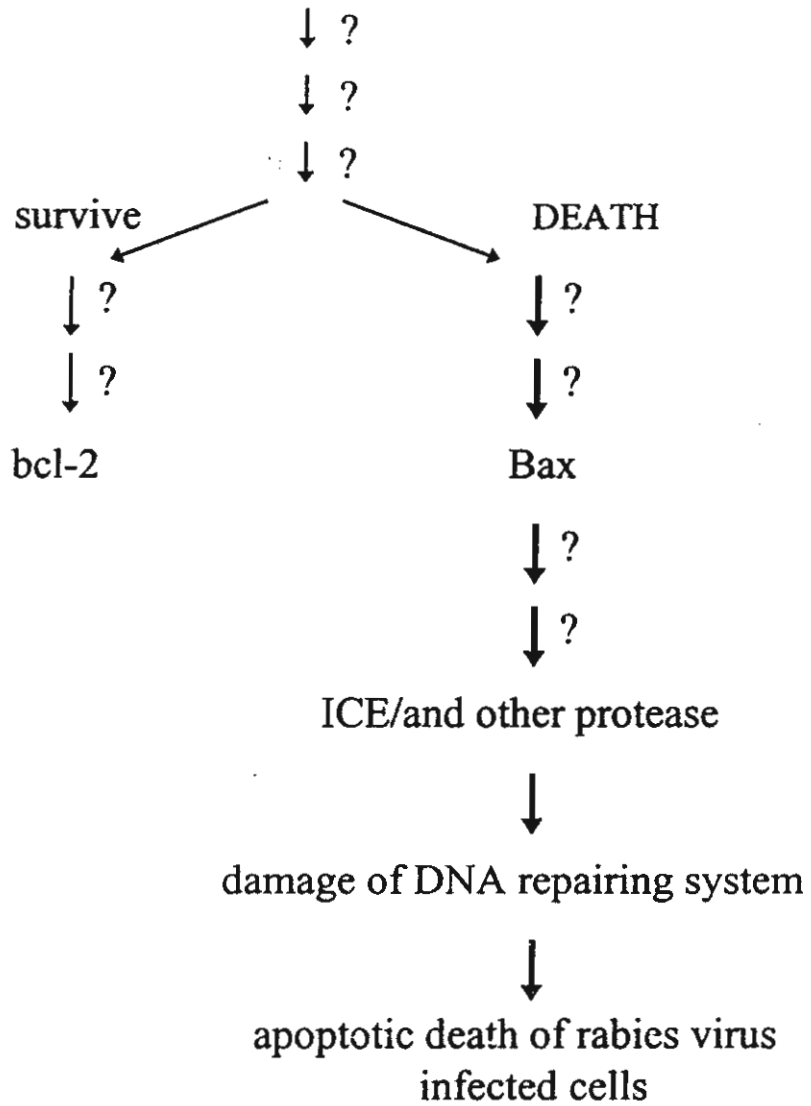


รูปที่ 6 การติดตามการทำลายของ poly (ADP-ribose) polymerase ในเซลล์ที่ติดเชื้อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติที่เวลาต่าง ๆ กัน



รูปที่ 7 การยับยั้งการเกิด DNA fragmentation ของ ICE inhibitor และ CPP-32 inhibitor

Rabies virus infection



แผนผังแสดง death pathway ที่เกิดขึ้นใน mouse neuroblastoma cells ซึ่งติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้า

เอกสารอ้างอิงในส่วนของการศึกษาในหลอดทดลอง

1. Dietzchold B, Rupprecht CE, Fu ZF, Koprowski H: Rhabdovirus. In Fields virology, Vol 1, edn 3. Edited by Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers; 1996; 1137-1159.
2. World Health Organization : World survey of rabies 30 (for the year 1993). World Health Organization unpublished document, WHO/EMC/ZOO/96.2.
3. Hemachudha T. and Phuapradit P. Curr. Opin. Neuro. 10: 260-267, 1997.
4. Iwasaki Y, Gerland W, Clark HF. Infect. Immu. 18: 220-225, 1997.
5. Smith JS, McClelland CL, Ried FL, Bear Gm. Infect. Immu. 35: 213-221, 1982.
6. Sugamata M, Miyazawa M, Mori S, Spangrue GI, Ewalt LC, Lodmell DL. J. Virol. 66: 1252-1260, 1992.
7. Hemachudha T : Rabies. In Handbook of Clinical Neurology. Edited by Vinken PJ, Bruyn GW, Klawans HL. Elsevier Science, Amsterdam, 1989: 383-404.
8. Xiang ZQ, Knowles BB, Mc Carrick JW, Ertl HC. Virol. 214: 398-404, 1995.
9. Marquette C, Ceccaldi P-E, Ban E, Weber P, Tsiang H, Haour F. Arch. Virol. 141: 573-585, 1996.
10. Dumrongphol H, Srikiathachorn H, Hemachudha T, Kotchabhakdi N, Govitrapong P. J. Neurol. Sci. 131: 1-6, 1996.
11. Marquette C, Van Dam A-M, Ceccaldi P.M, Weber P, Haour F, Tsiang H. J. Neurol. Immunol. 68: 45-51, 1996.
12. Linthorst ACE, Flachskamm C, Holsboer F, Reul JMH. Endocrinology 135: 520-532, 1994.
13. Saperstein A, Brand H, Audhya T, Nabriski D, Hutchinson B, Rosenzweig S, Hollander CS. Endocrinology 130: 152-158, 1992.
14. Dietzschold B, Weenner WH, Wiktor TJ. PNAS 80: 70-74, 1983.
15. Kucera P, Dolivo M, Coulon P, Flamand A. J. Virol. 55: 158-164, 1985.
16. Morimoto K, Ni YJ, Kawai A. Virol. 189: 203-216, 1992.
17. Jackson AC, Rossiter JP. J. Virol. 71: 5603-5607, 1997.
18. Boudet F, Lecocur H, Gougenon ML. J. Immunol. 156: 2282, 1996.
19. Ameisen JC, Estaquier J, Edziorck T. Immunol. Rev. 142: 9-51, 1994.
20. Jackson AC, Moench TR, Guffin DE, Johnson RT. Lab Invest. 56: 418-423, 1987.
21. Lewis J, Wesslingh SL, Guffin DE, Hardrick JM. J. Virol. 70: 1828-1835, 1996.

22. Levine B, hardwick JM, Trapp BD, Crawford TO, Bollinger RC, Guiffin DE. Science 254, 856-860, 1996.
23. Levine B, Goldman JE, Jiang HH, Griffin DE, Hardwick JM. PNAS 93: 4810-4815, 1996.

**Apoptosis induction in brain during the fixed strain
of rabies virus infection correlates with onset and
severity of illness**

Sompon Teerasurakarn and Sukathida Ubol*

Department of Microbiology,
Faculty of Science, Mahidol University,
RAMA VI Road, Bangkok 10400, Thailand.

Running title : rabies virus and apoptosis, rabies pathogenesis

* Correspondence: Dr. Sukathida Ubol

Fax: (662) 6445411, e-mail: scsul@mucc.mahidol.ac.th

Abstract

Viruses such as HIV, influenza, picornavirus and others are known stimulators of apoptosis. This individual cellular elimination is a preferential host defense in regenerative tissues. In contrast, if this death occurred in nonregenerating cells, such as neurons of the central nervous system, may result in disease. The target cell for rabies virus is the neuron. Here we studied the outcome of the interaction between rabies virus (CVS-11) and mouse brain cells. Replication of rabies virus in suckling mouse brain cells resulted in brain cell apoptosis, detected by DNA fragmentation and *in situ* apoptosis within 25 hr after infection and before evidence of intracerebral immune activation. Cell death occurred simultaneously with rabies virus replication. There were clinical signs of illness in infected newborn mice within 24 hr after the appearance of DNA fragmentation and before infiltration by lymphocytes. This suggested that onset of illness started independently of the immune function. This conclusion was supported by the occurrence of massive apoptosis followed by paralysis in rabies virus-infected immunosuppressed mice. Direct, viral- induced, neuronal apoptosis was the earliest death mechanism detected in these mice. We propose that pathogenesis of this fixed strain of rabies virus in mice begins with the induction of apoptosis by rabies virus replication. Cerebral damage may then be amplified by immunological mechanisms plus an additional unidentified factor. This is followed by increased permeability of the blood brain barrier.

Introduction

There are two major types of cell death: apoptosis and necrosis (Sander *et al*, 1995). Apoptosis is an active process which occurs through an evolutionarily conserved program. Cells undergoing apoptosis are characterized by membrane blebbing, cellular shrinkage, chromatin condensation, and chromosomal DNA fragmentation into oligonucleosomes (Schwartzman *et al*, 1993; Jones *et al*, 1989). In the final stage, an apoptotic cell breaks down into apoptotic bodies (Wyllie 1981). This type of death involves activation of certain enzymes and the upregulation of specific genes. Apoptosis is considered an individual cell death since it does not induce damage to neighboring cells. In contrast to apoptosis, necrosis depends mainly on autolytic activities of intrinsic cellular enzymes. Death by necrosis induces damage to nearby cells.

Viruses have recently been shown to trigger apoptosis. Human immunodeficiency virus (HIV) was postulated to cause immune suppression by inducing programmed cell death of CD4⁺ lymphocytes (Laurent-Crawford *et al*, 1993). Influenza virus can trigger apoptosis in alveolar cells and bronchial/bronchiolar epithelial cells (Mori *et al*, 1995). Sindbis virus (SV) can induce neuronal cell death by apoptosis (Levine *et al*, 1993; Ubol *et al*, 1994). Apoptosis is considered a natural host defense mechanism, since it may play a role in decreasing the rate of viral spread from infected cells (Clem *et al*, 1993). However, after a long adaptation to host cells, viruses seem to be able to overcome this type of host defense. For example, a virus with a large genome, such as baculovirus, takes a certain amount of time to generate progeny. Therefore, baculovirus has acquired the p35 gene to block apoptosis and ensure complete viral progeny production (Clem *et al*, 1993; Clem *et al*, 1994). Viruses with a small genome will complete replication and release viral progeny before the death of host cells by apoptosis (Levine *et al*, 1993). Inefficient viral blockage and apoptotic induction of nonregenerating cells could be responsible for disease progression. Lewis *et al* have shown that the ability of SV to induce apoptosis in neurons correlates with mortality in mice (Lewis *et al*, 1996).

The pathogenesis of rabies includes encephalitis and paralysis. This may be the consequence of the direct effect of the virus on infected neurons combined with

activation of immune mediators. The direct role of rabies virus in host cell damage is unclear. There is no evidence of necrosis or neurophagia in the infected brains of immunosuppressed mice (Smith *et al*, 1982). However, direct damage by rabies virus on neural cells has been shown *in vitro*. Replication of rabies virus strain 1820B in embryonic chick myotubes induces morphological changes consistent with apoptosis, including myotube shrinkage, small surface blebs, and irregularities under phase microscopy (Bare *et al*, 1991). Using advanced flow cytometry, Marcovitz *et al*. were able to detect apoptosis outside the nervous system of rabies virus infected mice (Marcovitz *et al*, 1994). This raises the possibility that a part of the pathogenesis of rabies infection may be due to induction of apoptosis in infected neurons. In this study a fixed strain of rabies virus, CVS-11, was selected since it is derived from street rabies virus and is believed to induce pathophysiologic changes similar to infection by street rabies virus. We studied changes in brain cells of suckling mice, immunocompetent and immunosuppressed adult mice during infection by CVS-11 in order to answer whether rabies virus infection can lead to apoptosis of brain cells and whether apoptotic induction in rabies virus infected brain cells correlates with the severity of infection.

Results

Replication of rabies virus in mouse neuroblastoma cells, an undifferentiated neuronal cell line, caused apoptosis within 48 hr after infection as shown by DNA fragmentation in Fig.1A. This provided evidence that rabies virus could induce apoptosis in target cells. A similar experiment was performed in suckling mice to answer whether this phenomenon occurred in the central nervous system *in vivo*. As shown in Fig. 1B, DNA laddering was first detected from infected brains at 25 hr post infection, while sham inoculated mice did not show any signs of DNA fragmentation. This experiment was repeated three times with three sets of mice and the same results were obtained that apoptosis of infected brains could be detected as early as 25 hr after infection. Apoptosis in rabies virus infected brain was confirmed by the *in situ* TUNEL assay. As shown in Fig. 2B-C, infected brains at 24 hr and 72 hr post infection exhibited abundant signals of nuclear TUNEL staining while TUNEL assays on brains of control mice were uniformly negative (Fig. 2A). These

results showed that neuronal apoptosis could be triggered during rabies virus infection.

Apoptosis occurred *in vitro* as a direct effect of rabies virus on target cells. However, in infected suckling mice, this phenomenon might be due to many factors such as immune mediators. CD8⁺-lymphocytes and certain cytokines like TNF have been shown to induce apoptosis in target cells (Kagi *et al*, 1994; Lowin *et al*, 1994; Walsh *et al*, 1994; Ware *et al*, 1996). To determine any effect of the cellular immune response on apoptotic induction in rabies virus infected mice, the correlation between lymphocyte infiltration and appearance of DNA laddering was monitored. As showed in table 1 the histopathological examination of an extravascular lymphocyte infiltration of rabies virus-infected brains at 18, 25, and 48 hr after infection were not observed. Mice developed signs of illness after brain cells entered programmed cell death and before the appearance of lymphocyte infiltration. Therefore the onset of illness correlated with induction of apoptosis detected by both DNA laddering and *in situ* TUNEL staining (Fig.2).

Upregulation of inflammatory cytokine genes in infected brain was also studied, since these soluble molecules may be responsible for progression to programmed cell death. By using semiquantitative RT-PCR, upregulation of mRNA for IL-1 β and TNF α was detected at 48 hr after infection while the expression of IFN γ mRNA was increased by 36 hr (Fig 3A and B). This, intracerebral upregulation of apoptotic related cytokine genes occurred after DNA laddering.

Informations obtained from study in rabies virus-infected suckling mice suggested that apoptosis is an earliest detected death of brain cells and is independent of immune mediators. To disprove the role of the immune responses as a apoptotic inducer and as a primary cause of rabies, development of rabies was studied in rabies virus-infected, immunosuppressed, adult mice in comparison to immunocompetent mice. Infected adult mice had paralysis by day 7. Immunosuppressed mice developed sign of illness in the presence of an undetectable level of an antibody and cellular responses to rabies which were detected by RIFFIT and lymphocyte stimulation respectively (data not shown). By contrast, massive apoptosis was found in their brains (Fig. 4 A and C). The intensity

of the apoptotic signal was not different between infected immunosuppressed and immunocompetent mice as shown in Fig.4 A-D.

The ability of rabies virus to activate apoptosis in nerve cells directly was studied by determining the correlation between induction of apoptosis and growth of rabies virus in infected brains. The kinetics of rabies virus replication in infected brains was studied by Fluorescent Foci staining. Increased production of viral progeny occurred in parallel with DNA laddering (Fig.5B). The appearance of DNA laddering (Fig.5A) was observed after the first replication cycle was completed.

Discussion

This study demonstrated for the first time that a fixed strain of rabies virus triggered apoptosis in newborn mice and in immunosuppressed and immunocompetent adult mice brain cells. This was detected by DNA laddering and by *in situ* apoptotic staining. In newborn mice, induction of apoptosis occurred before lymphocyte infiltration and activation of cytokine production in infected brains. This finding indicated that immune components were not necessary for the progression of neural cells to programmed cell death after rabies virus infection. Indeed, the appearance of apoptosis correlated with viral replication. This process is supported by Sindbis virus-induced apoptosis in neuroblastoma cells in which flow cytometry indicated no evidence of apoptosis until viral replication had reached the stage of new virion formation (Ubol *et al.* 1996).

This study also demonstrated that signs of illness in infected suckling mice developed after brain cells entered programmed cell death and before activation of immune responses. This data suggested that the onset of acute encephalitis in newborn mice during rabies virus infection may be dependent on the ability of the virus to directly induce brain cell apoptosis. Our findings are similar to reports for Sindbis virus (SV) infection. SV, an alphavirus, causes age-dependent encephalitis. Young mice are more susceptible to SV infection than older mice (Johnson *et al.*, 1972). It has been demonstrated that the age affect on susceptibility is not due to an inadequate or immature immune response in the newborn mice but rather due to the increased susceptibility of immature neurons to apoptosis induction (Levine *et al.*,

1993; Wesselingh *et al*, 1994; Griffin 1995). Experimentally induced over expression of antiapoptotic gene, bcl-2, inhibits apoptosis and protects newborn mice from fatal infection by SV (Levine *et al*, 1996). This supports the hypothesis that acute encephalitis in SV-infected newborn mice starts with apoptotic death of infected neurons which is triggered during SV replication. In rabies, age-dependent illness is not significant, both newborn and adult mice die of rabies. However, newborn mice die faster. Our data showed that apoptosis is not only a major mechanism of brain death in newborn mice, but that it can also be triggered in immunosuppressed and immunocompetent adult mice.

Rabies in adult mice and humans manifests as two clinical forms: paralysis and encephalitis. Immunosuppressed mice and athymic mice develop encephalitic illness. This encephalitis occurs concomitantly with increased viral replication and destruction of neurons in the absence of detectable immune mediators (Iwasaki *et al*, 1977; Smith *et al*, 1982). Therefore, encephalitic rabies in adult mice seems to be a direct effect of the rabies virus. Paralytic rabies is found in immunocompetent mice only. Passive transfer of immune sera and activated lymphocytes to immunosuppressed mice results in paralysis and early death (Smith *et al*, 1982; Sugamata *et al*, 1992).

Information from the mouse model contradicts what has been reported in human rabies. Hemachudha *et al* have found a defect in activation of the immune process in human paralytic rabies patients, while encephalitic patients have an active immune response to rabies (Hemachudha 1988; Hemachudha *et al*, 1989). This raises questions whether the immune responses is significant in rabies pathogenesis and whether the pathogenesis processes differ in mice and man. A study in immunosuppressed adult mice showed that illness can be developed due to apoptosis of brain cells progressing to paralysis in the absence of a T and B cell response. This suggested that factors such as the strain of rabies virus and individual imbalances of neuronal function and other unidentified factor may determine clinical manifestation.

Our study led to the hypothesis that pathogenesis in mice infected with this fixed strain of rabies virus may be divided into two phases. The first phase is the result of interaction between rabies virus and host cells. Rabies virus disseminates from the primary infection site, enters and replicates in the CNS leading to apoptosis

of brain cells. Pathogenesis begins as a consequence of viral induced neuronal death. Infiltration of immunological components through the blood-brain barrier and activation of intrinsic local immune responses may play a dual function. Immune responses may limit viral spread. However, these immunological factors may also amplify the severity of brain death. Such an immunological attack on brain cells, including damage from other unidentified mechanisms may represent a second phase of illness.

Materials and Methods

Cell cultures

Mouse neuroblastoma cells (N18) were obtained from the Johns Hopkins University. Both N18 cells and BHK-21 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, penicillin, and streptomycin.

Virus

A fixed strain of rabies virus (CVS-11) from The Queen Soavabha Memorial Institute was used in this study. Rabies viruses in brain suspension were propagated in N18 cells. Supernatant fluid of infected cultures was clarified by centrifugation at 2,000 rpm, at 4°C for 5 min and stored in aliquots at -70°C. Stock viruses were assayed by Fluorescent Foci staining on BHK-21 cells and had titers of approximately 10^7 pfu/ml

Animal infection

Litters of 1-day-old Swiss albino mice were inoculated intracerebrally with diluted rabies virus (0.02 ml of 10^5 pfu/ml). Mice received diluent only were used as a negative control. The infected mice were chloroform euthanized and brains were harvested at various times after infection. These harvested brains were used as samples for apoptotic detection, upregulation of proinflammatory cytokine genes, and lymphocyte infiltration studies. Because of a small size of 1-day-old mouse brain, each of the above experiments was performed on different mice within the same litter.

Detection of apoptosis in rabies virus infected brains and infected mouse neuroblastoma cells

Infected brains, one mouse brain at each time point, were homogenized in lysis buffer containing 100mM TRIS-HCL pH8.0, 0.5% SDS, and 25mM EDTA. Homogenates were then treated with proteinase K (0.1 mg/ml) overnight at 56°C. Total DNA was extracted with phenol-chloroform and precipitated with absolute ethanol. RNA was eliminated from DNA by RNase digestion (0.1 mg/ml) for 1 hr. at

37°C. Extracted DNA was analyzed by 1.8% agarose gel electrophoresis. DNA from cells undergoing apoptosis give a characteristic DNA laddering of 180-200 bp fragments.

Detection of chromosomal cleavage in rabies virus infected mouse neuroblastoma cells was performed by a similar procedure. The infected cells were harvested at various times as indicated and were lysed in lysis buffer. The lysates were treated and processed as described.

Detection of apoptosis in immunosuppressed mice

Four-week-old male and female adult mice were immunosuppressed by intraperitoneal injection with 3 doses of Cytoxan (3 mg/mouse, Mead Johnson), on day 1, 4, and 7 after virus inoculation. Brains were harvested at various times and fixed with 4% paraformaldehyde for 48 hr and embedded in paraffin and sectioned. Sections were used for apoptotsis detection by the TUNEL assay.

Lymphocyte infiltration study

Rabies-virus-infected suckling mice were chloroform euthanized without perfusion. Brains were removed, paraformaldehyde fixed for 48 hr, embedded in paraffin, and sectioned. Sequential sections were stained by hematoxylin and eosin. Extravascular infiltration of lymphocytes was evaluated by the presence of perivascular cuffing observed using light microscopy. Five constitutive sections from fore brain, mid brain, and hind brain were examined. Twenty fields were examined for each section.

Detection of upregulation of proinflammatory cytokine mRNA by RT-PCR

Infected suckling mouse brains were homogenized in RNase-free PBS. Total RNA was isolated from homogenized brains using TRIZOL(GIBCO) as recommended by the manufacturer. The portion of extracted RNA was subjected to first strand cDNA synthesis as described by Wesseling *et al.*, 1994. In brief, 20 µg of extracted RNA was used in a 20 µl reaction mixture for cDNA synthesis containing 2.5 units of AMV reverse transcriptase, reverse transcriptase specific buffer as supplied by the manufacturer, 1mM of each dNTP, 20 µg/ ml oligo dT, and 1 unit of

RNase inhibitor. The first strand cDNA was synthesized at 42°C for 1 hr. After completion of synthesis, the reaction was diluted to 100 µl with distilled water and was used for each PCR reaction.

The PCR reaction (50µl) contained 200µM of each dNTP, 2.5 units Taq polymerase (Perkin-Elmer), buffer as supplied by the manufacturer, 1µM of each specific primer (Wesseling *et al*, 1994). A Gene Amp PCR system 2400 thermal cycle (Perkin-Elmer, Cetus Corp) was used. The PCR conditions were optimized for each set of primers and the products were analyzed by gel electrophoresis. The purified cDNA from Sindbis virus infected mouse brains (kindly provided by Diane Griffin, Johns Hopkins University) and the cDNA from PHA-stimulated mouse spleen cells were used as positive controls. The β -actin gene was used as an internal control.

For detection of IFN γ mRNA, the amplified products were hybridized with the 32 P-IFN γ probe as described by Wessling *et al*. Specifically, 20 µl of PCR product was electrophoresed through 1.8% agarose gel and transferred onto a membrane (Nytran-plus, S&S). Filters were prehybridised in hybridizing buffer containing 5x SSC, 0.1% blocking reagent (Boehringer Mannheim), 0.1% N-laurylsarkosine, and 0.02% SDS at 50°C for 2 hr. Hybridization was performed in the same buffer at 60°C overnight. An oligonucleotide probe specific to IFN γ (Wesseling *et al.*, 1994) was radiolabelled with 32 P-ATP using T4 kinase. After hybridization, filters were washed 3 times in 2xSSC and 0.1% SDS at 60°C and finally in 0.1x SSC and 0.1% SDS at the same temperature before autoradiography.

Virus titration

Viruses from infected brains were determined by fluorescent staining of foci of infected BHK-21 cells. Briefly, infected brains were harvested, homogenized and centrifuged at 2,000 rpm for 5 min at 4°C. Then 50 µl of ten-fold dilutions of the supernatant were inoculated onto BHK-21 cells in a 96 well plate. After overnight incubation, infected cultures were washed, fixed with cold 70% acetone, and stained with fluorescein-conjugated anti-rabies antibody (Becton Dickinson Company, USA). The number of fluorescent positive cells in each well at each dilution were counted. The viral titer was expressed as number of fluorescent foci per milliliter.

TUNEL assay

The TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labeling) staining was used to detect apoptotic nuclei by the addition of fluorescein-labeled dUTP to the endonucleolytically cleaved DNA ends by terminal transferase. It was performed as recommended by the manufacturer (Boehringer Mannheim). Briefly, sections of infected-paraffinized brains were deparaffinized, rehydrated, and permeabilized by incubation in 10 µg of proteinase K per ml for 15 min at room temperature and washed twice for 5 min in PBS. Tissues were covered with 50 µl of a TUNEL reaction mixture containing, deoxynucleotidyl transferase , nucleotide mixture (including fluorescein-labeled dUTP), and reaction buffer for 60 min at 37°C. The reaction was terminated by washing samples twice in PBS. Then, 50 µl of anti-fluorescein antibody conjugated with alkaline phosphatase was added to the treated tissue section and incubated for 60 min at 37°C. The sections were then washed twice with PBS and color was developed by addition of 4-nitroblue tetrazolium chloride and X-phosphate as substrates.

Acknowledgements

We thank Dr. Henry Wilde (Queen Soavabha Memorial Institute) for helpful discussions and critical reading of this manuscript. We also thank Dr. Witaya Thamavit for microscopic observations of brain sections and Dr. T.W. Flegel for editing the manuscript. This work was supported by The Thailand Research Fund.

Legends of figures

- Fig.1 A. Detection of DNA laddering of rabies virus-infected mouse neuroblastoma cells (harvested at 24, 48, 60, 72, and 84 hr after infection; lane 3, 4, 5, 6, 7 respectively). The neuroblastoma cells were infected with rabies virus at an MOI of 1. Lane2 represented an uninfected culture harvested at 72 hr after culture initiation. Lane 1 is a molecular weight marker.
- B. DNA fragmentation analysis of rabies virus-infected suckling mouse brains at 12, 25, 48, and 72 hr after infection (lane 3, 4, 5, and 6) and sham inoculated mouse brain at 72 hr (lane 2). Lane 1 is a molecular weight marker.
- Fig.2 *In situ* detection (TUNEL assay) of apoptotic cells in suckling mouse brains infected with CVS-11 at 24 and 72 hrs post infection (B and C). The TUNEL assay on brain tissues from sham inoculated mice is negative control (A). Original magnification X 200
- Fig.3 Detection of mRNA coding for inflammatory cytokines by semiquantitative RT-PCR. The mRNA for IL-1 β and TNF α (A) and IFN γ (B) were reverse transcribed, amplified, and analyzed by electrophoresis. For IFN γ , the amplified products were hybridized with 32 P-IFN γ probe. The amount of cDNA used at each time point was standardized to the level of the β -actin gene.
- Fig.4 TUNEL assay in immunosuppressed and immunocompetent mouse brains infected with CVS-11 at day7 after infection. Apoptotic cells are abundant in cerebellum and cerebrum of immunosuppressed (A and C) and immunocompetent mice (B and D). E and F are negative controls of cerebellum and cerebrum respectively. Original magnification X100

- Fig.5 A. DNA fragmentation analysis of rabies virus-infected suckling mouse brains at 12, 18, 25, 30, 54, 66, and 78 hr after infection (lane 3,4,5,6,7,8, and 9) and sham inoculated mouse brain at 78 hr.(lane 2). Lane 1 is molecular weight marker.
- B. Kinetics of rabies virus replication in suckling mouse brain. Rabies virus infected brains were harvested and the amount of virus was detected by fluorescent staining of BHK-21 cells.

Table I Correlation between apoptosis induction, lymphocyte infiltration, and severity of infection in CVS-11-infected suckling mice.

Hours post infection	DNA fragmentation	lymphocyte* infiltration	Severity of ** infection
18	No	No	-
25	Yes	No	-
48	Yes	No	+ / ++
60	Yes	ND	+++
72	Yes	ND	++++

* Lymphocyte infiltration was determined by the presence or absence of perivascular cuffing.

** Severity of infection was graded as follows.

- = absence of clinical signs

+ / ++ = mild clinical signs

+++ = severe illness

++++ = moribund.

ND = not done

References

- Baer GM, Lentz TL (1991). Rabies pathogenesis to the central nervous system. In: The Natural History of Rabies, Baer GM(ed), 2nd edition. CRC Press, Boston, pp 105-118
- Clem RJ, Miller LK (1994). Control of programmed death by the baculovirus gene. *Mol Cell Biol* 14: 5212-5222.
- Clem RJ, Miller LK (1993). Apoptosis reduces both the in vitro replication and the in vivo infection of a baculovirus. *J Virol* 67: 3730-3738.
- Griffin DE (1995). The Gordon Wilson Lecture: Unique interactions between viruses, neurons and the immune system. *Trans Amer Clin & Climato Asso.* 107: 89-98.
- Hemachudha T (1989). Rabies. In: Handbook of Clinical Neurology, Vinken PJ, Bruyn GW, Klawans HL, (eds.) Elsevier Science, Amsterdam, pp. 383-404.
- Hemachudha T, Phanuphak P, Sriwanthana B (1988). Immunologic study of human encephalitic and paralytic rabies. A preliminary of 16 patients. *Am J Med* 84: 673-677.
- Iwasaki Y, Gerland W, Clark HF (1977). Role of host immune response in the development of either encephalitic or paralytic disease after experimental rabies infection in mice. *Infect Immun* 18: 220-225.
- Johnson RT, McFarland HF, Levy SE (1972). Age-dependent resistance to viral encephalitis: Studies of infection due to resistance to Sindbis virus in mice. *J Infect Dis* 125: 257-262.
- Jones DP, McConkey DJ, Micotera P, Orrenius S (1989). Calcium-activated DNA fragmentation in rat liver nuclei. *J Biol Chem* 264: 6398-6403.
- Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P (1994). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 265: 528-530.

- Laurent-Crawford AG, Krust B, Muller S, Riviere Y, Rey-Cuille MA, Bechet JM, Montagnier L, Hovanessian AG (1991). The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis. *Virology* 185: 829-839.
- Levine B, Goldman JE, Jiang HH, Griffin DE, Hardwick JM (1996). Bcl-2 protects mice against fatal alphavirus encephalitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4810-4815.
- Levine B, Huang Q, Isaacs JT, Reed JC, Griffin DE, Hardwick JM (1993). Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the bcl-2 cellular oncogene. *Nature* 361: 739-742.
- Lewis J, Wesselingh SL, Griffin DE, Hardwick JM (1996). Alphavirus-induced apoptosis in mouse brains correlates with neurovirulence. *J Virol* 70: 1828-1835.
- Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J (1994). Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370: 650-652.
- Marcovistz R, Bertho AL, Matos DCS (1994). Relationship between apoptosis and thymocyte depletion in rabies-infected mice. *Brazilian J Med Biol Res* 27: 1599-1603.
- Mori I, Komatsu T, Takeuchi K, Kazuya N, Sudo M, Kimura Y (1995). In vivo induction of apoptosis by influenza virus. *J Gen Virol* 76: 2869-2873.
- Sanders EJ, Wride MA (1995). Programmed cell death in development. *Inter Rev Cyto* 163: 105-153.
- Schwartzman RA, Cidlowski JA (1993). Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews* 14: 133-151.
- Smith JS, McClelland CL, Ried FL, Bear GM (1982). Dual role of the immune response in street rabies virus infection of mice. *Infect Immun* 35: 213-221.

- Sugamata M, Miyazawa M, Mori S, Spangrude GJ, Ewalt LC, Lodmell DL (1992). Paralysis of street rabies virus-infected mice is dependent on T lymphocytes. *J Virol* 66:1252-1260.
- Ubol S, Park S, Budihardjo I, Desnoyers S, Montrose MH, Poirier GG, Kaufmann SH, Griffin DE (1996). Temporal changes in chromatin, intracellular calcium and poly (ADP-ribose) polymerase during Sindbis virus-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *J Virol* 70: 2215-2220.
- Ubol S, Tucker PC, Griffin DE, Hardwick JM (1994). Neurovirulent strains of alphavirus induce apoptosis in bcl-2-expressing cells; role of a single amino acid change in the E2 glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5202-5206.
- Walsh CM, Matloubian M, Lin C-C, Ueda R, Kurahara CG, Christensen JL, Huang MTF, Young JDE, Ahmed R, Clark WR (1994). Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10854-10858.
- Ware CF, VanArsdale S, VanArsdale TL (1996). Apoptosis mediated by the TNF related cytokine and receptor families. *J Cell Biochem* 60: 47-55.
- Wesselingh SL, Levine B, Fox RJ, Choi S, Griffin DE (1994). Intracerebral cytokine mRNA expression during fatal and nonfatal Alphavirus encephalitis suggests a predominant type 2 T cell response. *J Immunol* 152: 1289-1297.
- Wyllie AH (1981). Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. In: Cell death in biology and pathology, Bowen ID, Lockshin RA (eds) Chapman & Hall. London, pp 9-34.

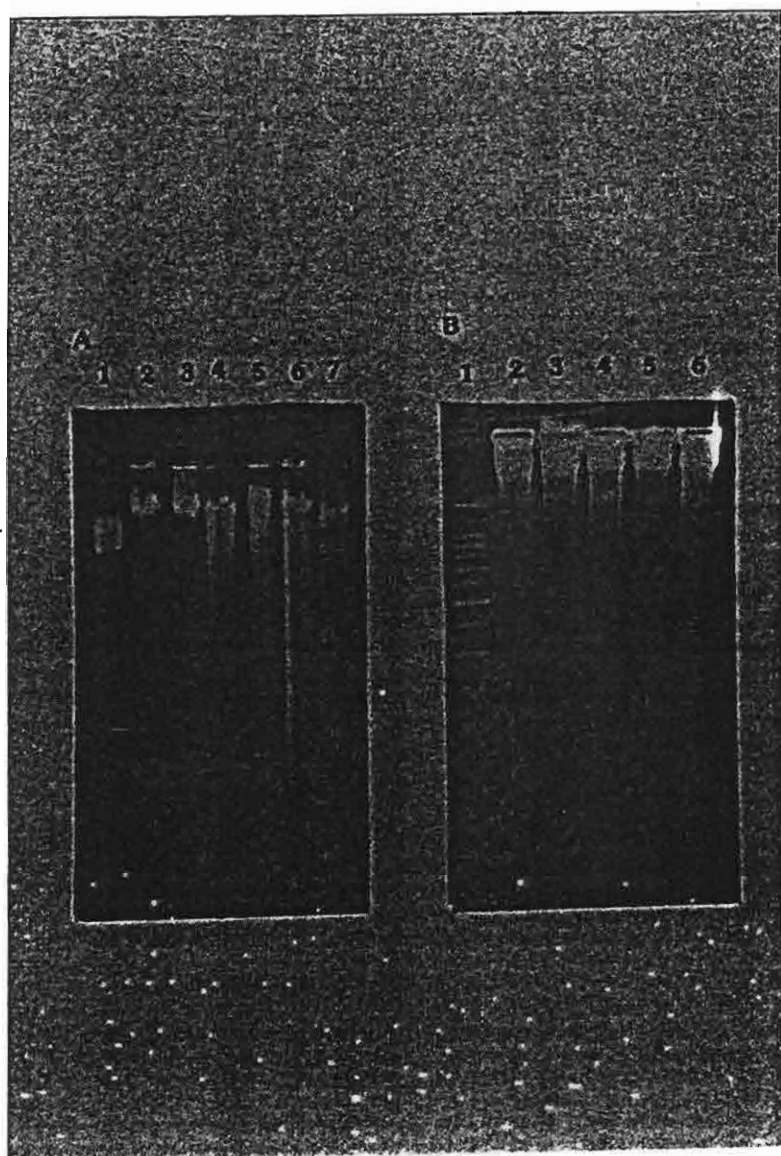


Fig 1

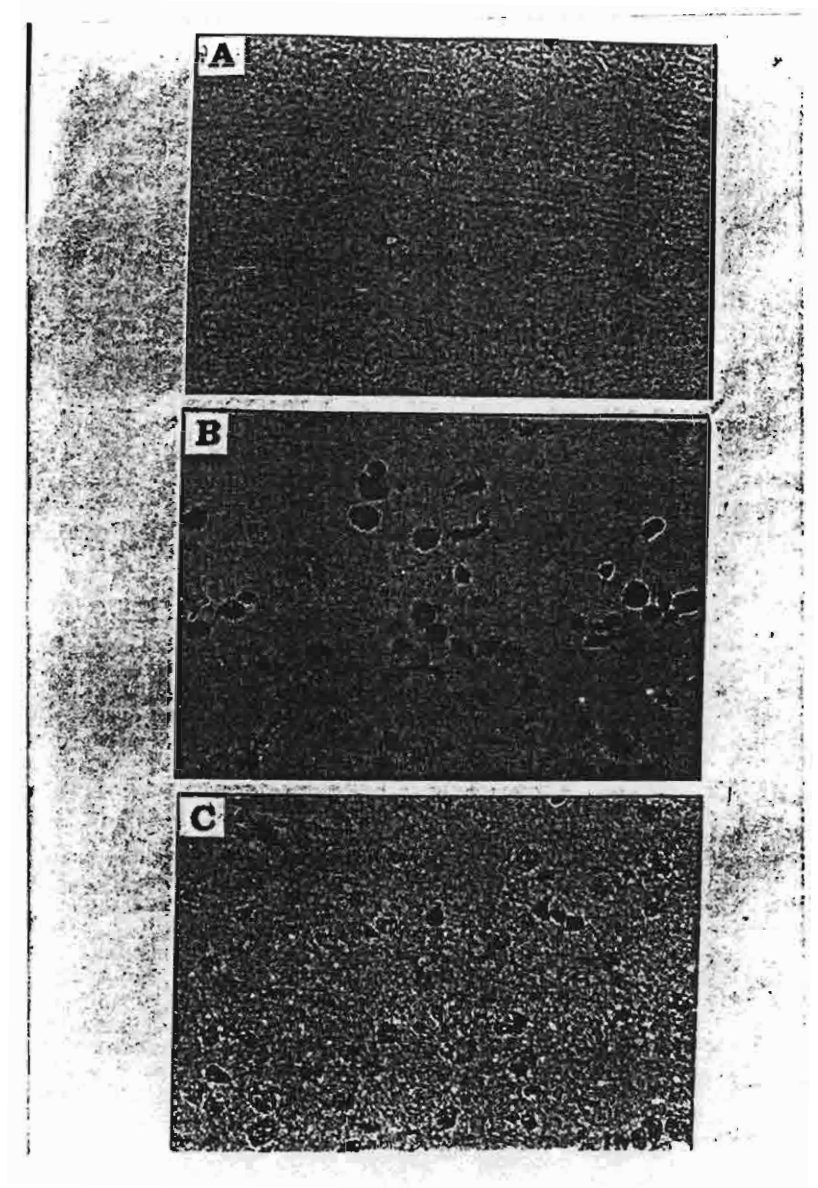


Fig 2

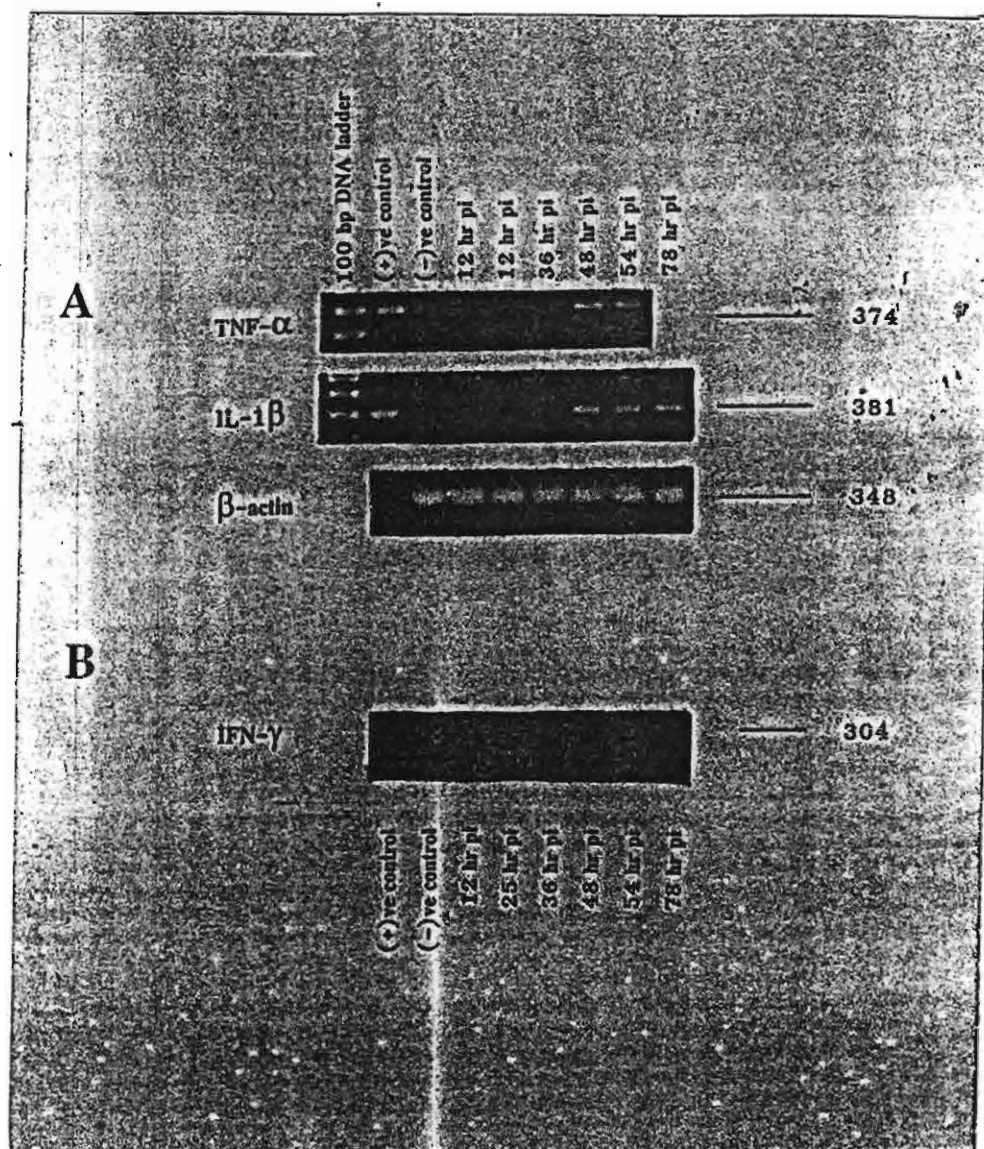


Fig 3

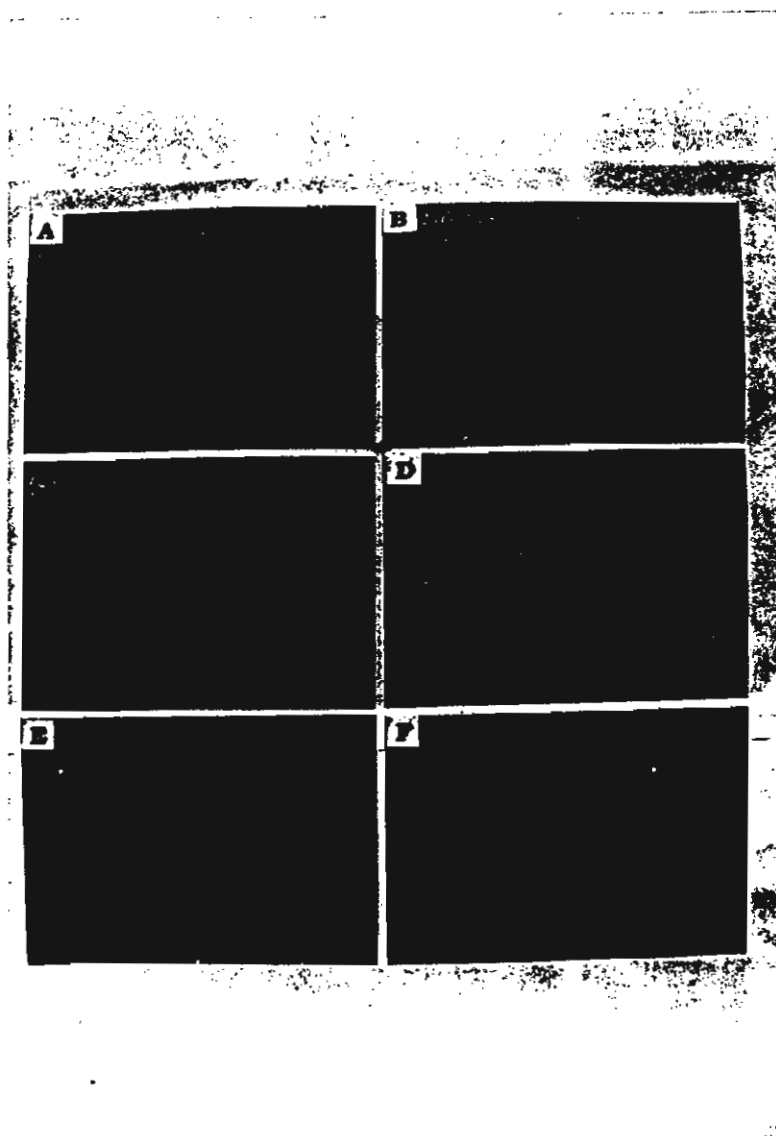


Fig 4



Figs