

A nectin-1 és az oxidatív károsodás szerepe a Herpes encefalitisz kialakulásában

Doktori értekezés magyar nyelvű kivonata

Emese Prandovszky, M.Sc.

Szegedi Tudomány Egyetem
Általános Orvosi Kar
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Kísérletes és Klinikai Idegtudomány c. Doktori Program



Témavezető: Dr. Horváth Szatmár MD, PhD.
SZTE-ÁOK Pszichiátriai Intézet

Szeged

2008.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés anyagát képező közlemények:

- I. **Prandovszky, E**, Horvath S, Gellert, L, Kovacs SK, Janka, Z, Toldi, J, Shukla, D, Valyi-Nagy, T.
Nectin-1 (HveC) is expressed at high levels in neural subtypes that regulate radial migration of cortical and cerebellar neurons of the developing human and murine brain. *J. Neurovirol.* 14: 1–9, 2008. (Impact factor: 3.290)
- II. Kavouras, JH, **Prandovszky, E**, Valyi-Nagy, K, Kovacs, SK, Tiwari, V, Kovacs, M, Shukla, D, Valyi-Nagy, T¹
HSV-1 infection induces oxidative stress and the release of bioactive lipid peroxidation by-products in mouse P19N neural cell cultures
J. Neurovirol. 13: 416–425, 2007. Impact factor: 3.290
- III. Horvath, S, **Prandovszky, E**, Kis, Z, Krummenacher, C, Eisenberg, RJ, Cohen, GH, Janka, Z, Toldi, J²
Spatiotemporal changes of the herpes simplex virus entry receptor nectin-1 in murine brain during postnatal development
J. Neurovirol. 12 (3): 161-170, 2006. Impact factor: 3.290

Közlemények, melyek a dolgozatba nem lettek belefoglalva:

- IV. Valyi-Nagy, T, Kavouras, JH, **Prandovszky, E**, Kovacs, K, Shukla D, Valyi-Nagy, K. Oxidative stress and release of bioactive lipid peroxidation by-products following herpes simplex virus infection of neural cell cultures
FASEB J 22: 59.10, 2008. Impact factor: 7.064
- V. Horvath, S, **Prandovszky, E**, Pankotai, E, Kis, Z, Farkas, T, Boldogkői, Z, Boda, K, Janka, Z, Toldi, J.
Use of a recombinant pseudorabies virus to analyze motor cortical reorganization after unilateral facial denervation
Cereb. Cortex X 15 (4): 378-384, 2005. Impact factor: 6.368

¹ Kavouras JH and Prandovszky E equally contributed to this work

² Horvath S and Prandovszky E equally contributed to this work

Prezentációk:

Prandovszky, E., O'Donnell, C, Horvath, Sz, Janka, Z, Valyi-Nagy, T.

Cell type and differentiation dependent modulation of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) replication by lipid peroxidation by-product, 4-hidroxy-2-nonenal

MÉT-FÉKF 2007, Pécs

Prandovszky, E., Tiwari, V, Shukla, D, and Valyi-Nagy, T

Expression of Herpesvirus Entry Mediator (HVEM) in the Retina and Trigeminal Ganglia

ARVO 2006, Ft.Lauderdale

Valyi-Nagy, T, Tiwari, V, **Prandovszky, E.**, Shukla, D.

Expression of Herpesvirus Entry Mediator (HVEM) in Normal and Herpes Simplex Virus Type 1-Infected Cornea

ARVO 2006, Ft.Lauderdale

Prandovszky, E., Horvath, S, Janka, Z, Toldi, J

Poliovirus infection induced schizophrenia: is nectin-1 the missing link?

MIT 2004, Budapest

Tudományometriai adatok:

Megjelent közlemények száma:	5
Összesített impakt faktor:	23,314
Megjelent absztraktok száma:	4

BEVEZETÉS

A HSV-1 és a HSV-2 a herpesvírusok α -herpesvírus alcsaládjába tartoznak. Bár általánosan ismertek arról, hogy léziót okoznak a száj környékén (HSV-1) és a genitáliákon (HSV-2), de azáltal, hogy képesek a központi idegrendszeren belüli terjedésre, olyan életre szóló központi idegrendszeri betegségeket is okozhatnak, mint meningitis és encefalitisz. HSE a leggyakrabban előforduló, sporadikus agyvelőgyulladás emberben. Míg a felnőttkori HSE háttérében HSV-1 fertőzés áll, addig az újszülött kori HSE kialakulásáért többségében a HSV-2 felelős. A felnőtt kori HSE-t, egyoldali megjelenés, illetve temporális és frontális lebenybeli lokalizáció jellemzi elsődlegesen. Ezzel szemben az újszülöttek körében gyakori HSE sokkal generalizáltabb, itt a vírus kivétel nélkül pusztít mindent, ami az útjába kerül.

Az antivirális terápia sokat fejlődött az elmúlt 20 évben, ennek ellenére a HSE kiemelkedő helyet foglal el mind az elhalálozási ráta, mind a morbiditás tekintetében. Kezeletlen betegek 70%-a elhalálozik. A kezelt betegek esetében ez a mutató 19%-ra csökken, de több mint 50%-uknál kell számolni visszamaradó mérsékelt vagy súlyos neurológiai elváltozással. Három HSE-ből egy primer fertőzésnek köszönhetően alakul ki, míg a fennmaradó kétharmad esetében a HSV előzetes jelenléte szerológiailag igazolható. A vírus a primer fertőzést követően főként a szaglógumóba vagy a trigeminális ganglionba fészkel be magát, de az agyban is előfordulhat ilyen látens góc, mely a szervezet immunrendszerének csökkent működése esetén reaktiválódik.

A HSE patogenezise nem teljesen tisztázott. Korábbi tanulmányok beszámolnak arról, hogy a HSE kialakulása során lítikus és hemorrágiás folyamatok túlsúlya figyelhető meg a mediális halánték, és az alsó homloklebeny tájékán. A HSV fertőzés nagyon gyorsan terjed az egyik oldali félteke limbikus struktúráin belül, majd a vírus, az agyat nem elhagyva, áterjedhet a másik oldalra is. Ez a folyamat három hét alatt lezajlik, a fertőzött területen nekrosis és súlyos gyulladás nyomait hagyva maga után. A sejtkárosodás pontos mechanizmusa nem ismert, de valószínűleg mind vírus által közvetlen mediált, mind közvetetten, az immunrendszer működése következtében kialakuló gyulladásos folyamatok tevékeny résztvevői a HSE kialakulásának. Ismert tény, hogy gyulladásos folyamatok során a gyulladás helyére vándorló fagociták képesek oxidatív gyökök termelésére (ROS), továbbá az is, hogy bizonyos vírusfertőzések képesek szövetkárosító oxidatív stressz kiváltására. A ROS szövetekben történő elszaporodása lipid peroxidációhoz, oxidatív károsodáshoz vezet, mely olyan lipid peroxidációs bioaktív melléktermékek megjelenését eredményezi, mint a 2-hidroxi-4-nonenal (HNE). Mind a ROS, mind az HNE hatással lehet a vírus replikációra az oxidatív stressz és károsodás lévén, továbbá azáltal, hogy módosítják a gazdasejt gyulladásos és immunreakcióit. Lehetséges, hogy a HSV maga is képes mind oxidatív stressz, mind oxidatív károsodás közvetlen indukciójára, mely szövetromboló következményei révén hozzájárulhat a HSE kialakulásához. Továbbá ROS képes a vér-agyagát felszámolására, például a RhoA kis GTPáz által közvetített jelátviteli út révén, ami még több immunsejt beözönlését vonja maga után, ami erősebb oxidatív stresszt

és végső soron az idegrendszer gyulladással elváltozását eredményezi. A RhoA kis GTPázok aktivitását a ROS mellett az idegrendszerben található fő herpesz receptor a nectin-1 is képes módosítani.

Korábbi vizsgálatok azt sugallják, hogy mind gazda, mind virális faktorok részt vesznek a HSV fertőzésben, és ez által jelentős szerepet töltenek be a HSE patogenezisében, bár szerepük ezidáig nem teljesen tisztázott. Adott virális faktorok, különös tekintettel a vírus envelop glikoproteinjeire (gB, gD, gH, és gL), nélkülözhetetlenek a HSV sejtbe jutásában és sejtről-sejtre való terjedésében. A HSV sejtbe jutása két lépésből áll: i) a plazma membránhoz való kapcsolódás, ii) és a soron következő fúzió a plazmamembránnal, vagy endocitózis esetén az endoszóma membránnal. Mindezek mellett a gazdasejten található receptor molekulák (nectin-1, nectin-2, HVEM, 3-OST-HS) is kritikusak ezekben a folyamatokban. A vírus a sejtbe történő belépése és sejtről-sejtre terjedése során kulcsfontosságú a nectin-1 és a vírus gD proteinek kölcsönhatása. A nectin-1 sejtadhéziós molekula, mely homo-transzdimereket képezve részt vesz a szinapszisok felépítésében, ezeknek a vírus gD által való felbontása súlyos élettani következményekkel járhat, mely eddig a pontig nem képezte kutatás tárgyát.

Összefoglalva, az eddigi eredmények alapján elmondható, hogy a HSV sejtbe lépése során a virális glikoproteinek funkciója illetve a gazdasejt receptorainak, különös tekintettel az idegrendszerben lévő nectin-1, funkciója és eloszlása fontos szerepet játszik a HSE kialakulásában és a patogenezisében. Ez a szerep részleteiben jelenleg feltárássra vár. Munkánk során ezekre a virális és gazdasejt faktorokra fókuszáltunk, valamint azokra a molekuláris mechanizmusokra, ld. oxidatív stressz és RhoA GTP-áz jelátvitel, melyekben ezek a faktorok részt vesznek. Továbbá ezen faktorok és molekuláris mechanizmusok szerepét tanulmányoztuk a HSE patogenezisében. Jelen pillanatban nincs olyan elérhető terápia, amely orvosolná a HSE-vel asszociált neurológiai problémákat. Így, kulcsfontosságú a HSV sejtbe lépését illetve sejtről-sejtre való terjedését kísérő celluláris és molekuláris folyamatok feltárása, mely hozzájárulhat a HSE elleni terápiás ágens kifejlesztéséhez.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Annak a hipotézisnek a tesztelésére, vajon az agyban főszerepet kapó HSV-1 receptor (nectin-1) expressziós mintázata hozzájárul-e az újszülött kori illetve a felnőtt kori HSE eltérő patogeneziséhez célul tűztük ki:
 - a. **A nectin-1 receptor idő és térbeli eloszlásának vizsgálatát immunhisztokémiai módszerekkel posztnatális újszülött és felnőtt BALB/c egér agyon.**
 - b. **Ember és egér agyból származó immunhisztokémiai metszetek összehasonlítását, esetleges hasonlóságok felderítésének céljából.**

2. Következő lépésben a HSE kialakulásáért felelős lehetséges molekuláris mechanizmus feltárására fókuszáltunk. Korábbi munkák nagy jelentőséget tulajdonítanak az oxidatív stressznek és oxidatív károsodásnak, melyek gyulladási folyamatok kíséretében a sejtek károsodásához végső soron a sejtek pusztulásához vezetnek, ezáltal hozzájárulhatnak a HSE során tapasztalt nagy mértékű idegsejt károsodáshoz, és idegsejt veszteséshoz. Munkánkat *in vitro* rendszerben retin savval differenciált P19 (P19N) neurális sejteken végeztük.
 - a. **Ahhoz, hogy a sejtvonalat további kísérletekben alkalmazzuk mindenképp el kellene készíteni azt, hogy a P19N sejtek fogékonyak-e a HSV-1 fertőzésre. Miután meggyőződünk erről, célul tűztük ki:**
 - b. **A HSV fertőzés oxidatív stresszre (*reaktív O₂ gyökök (ROS) mennyiségének mérése fluoreszcens módszerrel*) illetve lipid peroxidációra (*HNE mennyiség mérése kromatográfiás módszerrel*) gyakorolt közvetlen hatásának vizsgálatát.**
 - c. **Annak meghatározását, hogy a lipid peroxidáció már jelenlévő reaktív mellékterméke (HNE) hogyan befolyásolja a vírus fertőzőképességét neurális és nem neurális kultúrákban.**
 - d. **Valamint annak meghatározását, hogy a különböző koncentrációjú antioxidánsokkal (ebselen) történő kezelés hogyan befolyásolja a vírus fertőző képességét.**

3. A RhoA kis GTP-ázok fontos molekuláris kapcsolók az egyes jelátviteli utakban, továbbá ezek a molekulák nectin-1 és ROS révén egyaránt aktiválhatók. Így célul tűztük ki a RhoA kis GTP-ázok szerepének tisztázását a HSV sejtről-sejtre való terjedésében.
 - a. **Elsőként megnéztük, hogy domináns negatív illetve állandóan aktív RhoA GTP-áznak milyen hatása van a vírus fehérjék által mediált sejtfúzióra.**
 - b. **A RhoA aktivitásának változását vizsgáltuk a ezen fúzió során Western blottal, illetve G-LISA módszerekkel.**

MÓDSZEREK

1.) Immunhisztokémia

A rágszáló agyakat, a perfúziót követően 4%-os PFA-val fixáltuk, majd cryostattal megmetsztük. A blokkolást szobahőmérsékleten (RT) végeztük 1h órán át, a blokkoló oldat összetétele: 10% normal kecske szérum, 0,01% Triton X-100 PBS-ben (0,01M pH7,4). Ezt követve egy éjszakán át inkubáltuk 4°C-on a nectin-1 ellen termelt elsődleges antitestek egyikével (patkányban termelt anti-egér monoklonális antitest 1:2 [Y,Takai Osaka Egyetem, Japán], illetve nyúlban termelt anti-humán monoklonális antitest, 1:1000 [RJ Eisenberg, Pennsylvania, USA]. Majd mosást követően 1h órán keresztül inkubáltuk a metszeteket a másodlagos antitestek egyikével 1:200 hígításban (nyúlban termelt anti-patkány IgG, számban termelt AMCA konjugált anti-patkány IgG, kecskében termelt anti-rabbit IgG). Ezután a metszetek (kivéve AMCA-konj.) avidin-biotin-HRP komplexszel inkubáltuk 30-40 percig. Az előhíváshoz 3,3-diaminobenzidin-tetrahidrokloridot használtunk az avidin-biotin-HRP konjugált metszetek esetén, míg az AMCA konjugált minták közvetlenül fluoreszcens mikroszkóppal lettek vizualizálva. Kontrollként olyan metszeteket alkalmaztunk, melyek nem lettek kitéve elsődleges antitesttel való inkubációnak. A P19N sejt kultúrán végzett immunhisztokémiai vizsgálat során a sejteket, 2h órás 4%-os PFA fixálást követően, nyúlban termelt specifikus HSV-1 antitesttel inkubáltuk 32 percen keresztül 43°C-on. Majd a gyártó által biztosított blokkoló oldattal blokkoltuk a mintát a másodlagos antitesttel (biotinilált anti-nyúl) való inkubációt megelőzően. Az előhívás 3,3-diaminobenzidin-tetrahidrokloriddal történt.

2.) HSV-1 fertőzés

A sejteket, a mosást követően megfelelő multiplicitású vírussal inkubáltuk PBS-ben, 1h órán keresztül 37°C-on néha gyenge rázásnak kitéve. Ezt követően a vírust eltávolítottuk a rendszerből, és a sejteket normál médiummal inkubáltuk adott ideig. A fertőzés kontrollja (mock kezelt sejtek) a víruskészítéshez használt Vero sejt kivonattal történő kezelés volt, mely a vírusfertőzéssel párhuzamosan történt.

3.) Plaque assay

A fagyaszott felülúszókat felolvasztottuk és hígítási sort készítettünk belőlük, majd duplikátumban lefertőztük velük a titráláshoz használt Vero sejteket. A fertőzést követően 0,5%-os metilcellulózzal ellátott médiumot helyeztünk a sejtekre és 3 napig inkubáltuk 37°C-on, ezt követően a plakkokat megszámláltuk a legkezelhetőbb hígításban.

4.) Szincícium assay

A sejteket fixáltuk abs. metanollal 20 percig, majd PBS-sel történő mosást követően, frissen készített Giemsa festékkel kezeltük 20 percig. A mintát 95%-os etanollal, majd vízzel differenciáltuk.

A fluoreszcens assay-ben mind az akceptor mind az effektor sejtbe GFP-t is transzfektáltunk, a megjelenő szincíciumokat, 72h órával az összekeverést követően, fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

5.) ROS detektálás

A vírussal előkezelt sejteket PBS-sel történő mosást követően hydroxifenil fluoresceinnel (HPF) (*Molecular Probes*) kezeltük (5 μ M végkoncentráció, fenolredmentes tápoldatban oldva), amely fluoreszcensé válik ROS jelenlétében. A lemezeket 37°C-on 5%-os CO₂ mellett 20-60 percig inkubáltuk., majd eltávolítottuk a felesleges HPF-t és friss PBS hozzáadását követően a Tecan GENios Pro készülékkel mértük az egyes minták fluoreszcens aktivitását.

6.) Lipid peroxidáció mérése Biotech LPO586 színreakción alapuló assay-vel (*Oxis*)

Az előkezelt sejtek felülúszójából aliquotokat vettünk a megfelelő időpontban, amit butilalt hidroxitoluollal kezeltünk a további oxidáció megakadályozása végett, ezt követően a mintákat -80°C-on tároltuk az LPO 586 assay elvégzéséig. Az assay elvégzése során követtük a gyártó által adott protokollt. Az így kapott kombinált MDA és HNE szintet ezután normalizáltuk a Coomassie Plus Protein Assay kit (*Pierce*) segítségével meghatározott totál protein koncentrációval. A mintákat Biomate3 spektrofotométerrel mértük.

7.) HNE kezelés

Az HNE-ből, az előkezelést megelőzően törzsoldatot készítettünk 100% etanollal. Az előkezelés során a sejtekre jutó alkohol 0.05%-os volt minden minta esetében, így az alkohol toxicitásával nem kellett számolnunk a kiértékelés során. Kontrollként olyan sejteket alkalmaztunk a HNE citotoxicitásának vizsgálatára, melyek HNE-t nem, csak 0,05% végkoncentrációban alkoholt kaptak.

A HNE vírus replikációra gyakorolt hatásának vizsgálatkor a sejteket, a vírusherzést megelőzően 5 illetve 50 μ M HNE-vel kezeltük 0,5h illetve 1h órán át alacsony szérumszintű oldatban 37°C-on. 24h órával a fertőzést követően a felülúszót a plaque assay elvégzéséig -80°C-on tároltuk.

8.) Antioxidant assay

A kezelést megelőzően DMSO-ban oldva friss 10mM törzsoldatot készítettünk az Ebselenből. A P19n sejteket 1h órával a vírusherzést megelőzően, majd a vírusherzést követően 24h óráig tettük ki 0, 5, 10, 25 μ M végkoncentrációjú antioxidáns kezelésnek 37°C-on. Ezt követően a felülúszót a plaque assay elvégzéséig -80°C-on tároltuk.

9.) Sejt-fúziós β -galaktozidáz riporter assay

A vad típusú kínai hörcsög petefészek sejteket (CHO-K1) két populációra osztottuk. Az akceptor sejteket necln-1 plazmiddal és a β -galaktozidáz gén ω peptidjével transzfektáltuk, míg az effektor sejtekbe a β -galaktozidáz gén α peptidje és a vírus fúzióhoz szükséges glikoproteinjei (gB, gD, gH., gL) és kerültek. 16h órás inkubációt követően, mikor már a fehérjék kifejeződtek, a két populációt 1:1 arányban összekevertük, 96-os lemeze helyezettük, és 37°C-on inkubáltuk. Az összekeverést követően a sejteket 0.5% Nonidet P-40-nel lizáltuk, majd klorofenol red- β -D galaktopyranosid (*Roche*) adásával a β -galaktozidáz aktivitás 560nm-en meghatározható volt.

10.) Western blot

A transzfektált és előkezelt sejteket először egy RhoA protein pull-down assay-nek vetettük alá, mely izolálja a totál protein oldatból az aktivált RhoA molekulákat. Az inkubációt Rhotekin-RBD-GST gyöngyökkel végeztük 1h órán keresztül 4°C-on. Pozitív kontrollként használt minták GTP γ S-sel lettek előkezelve, míg belső kontrollnak az alap RhoA aktivitást használtuk. Az aktivált RhoA ezután Western blot analízissel lett detektálva, ahol a semidry transfert követően, a blottokat 1h órán át, szobahőmérsékleten blokkoltuk, a blokkoláshoz 5% zsírmentes tejet használtunk. Majd a primer antitesttel (anti-RhoA monoclonal, SantaCruz) való 2h órás, szobahőmérsékleten történő inkubáció következett. Mosást követően a sejteket szekunder antitest (HRP konjugált anti-egér 1:10000, Jackson) kezelésnek tettük ki szobahőmérsékleten, 1h órán keresztül. A vizualizációhoz kemiluminescens szubsztrátot használtunk.

EREDMÉNYEK

1a.) Kísérleteink során újszülött rágcsáló agyban intenzív nectin-1 expressziót figyeltünk meg a kortikális területeken, valamint a hemiszférák között lévő kapcsoló struktúrákban (kéregtest, commissura hippocampi, és commissura anterior), ami a kor előre haladtával növekedett a limbikus területeken, és ezzel párhuzamosan csökkent az asszociációs területeken. A nectin-1 kifejeződés markáns csökkenése a kéregtestben az agy egyedfejlődése során korrelált a felnőtt agyra jellemző egyoldali HSV terjedéssel.

1b.) Mind az újszülött egér mind a fetális humán kortexben specializált nectin-1 mintázatot figyeltünk meg. Szembetűnő nectin-1 pozitivitást tapasztaltunk a kéreglemez felső rétegeiben, közvetlenül a marginális zóna alatt. Ezek a sejtek Cajal-Retzius sejtekre jellemző morfológiával rendelkeztek. Továbbá a kortikális lemez vándorló sejtjein is jelentős nectin-1 expresszió volt megfigyelhető. A pia matertől a kéreg mélyebben fekvő rétegei felé haladva nectin-1 expresszió egyre erősebbé vált. A subplate egy átmeneti zónát képzett az alatta helyet foglaló intermedier zónával egyetemben. Az intermedier zónában a tangenciálisan vándorló neuronokon intenzív nectin-1 jelet találtunk. Az alatta elhelyezkedő subventrikuláris zónában gyér, míg a ventrikális zónában erősebb nectin-1 expresszió volt megfigyelhető, bár a kamra közvetlen közelében ez alig tapasztalható szintre csökkent. Emellett ventrikuláris zóna radiális gliára emlékeztető morfológiájú sejtjei erőteljes festődést mutattak, sugallva azt, hogy a nectin-1 fontos szerepet tölthet be a radiális sejt vándorlásban. A újszülött egér hippocampusban a nectin-1 pozitivitás az egész hippocampusban detektálható volt. Az immun pozitív sejtek granuláris sejtekre emlékeztető morfológiával rendelkeztek a str. radiatumban, illetve piramis sejtekre emlékeztető morfológiával a str. oriensben. Születés utáni 7. napon erős immunszignál jellemezte mind a hippocampust (str. pyramidalet kivéve), mind a gyrus dentatust. Felnőtt egér agyban viszont a str. pyramidale kimagaslóan pozitívvá vált nectin-1-re, míg egyéb rétegek mérsékelten festődtek csak. Humán fetális hippocampusban a nectin-1 jel gyenge volt a subgranuláris rétegben, míg erős jelet kaptunk a granuláris és piramis sejt rétegben.

Emellett a rágcsáló szaglógumóban azonosítottunk egy nectin-1 által kijelölt, új tangenciális sejt vándorlási útvonalat: a CMS-t (callosalis migrációs út), mely a rostralis migrációs úttal (RMS-sel) párhuzamosan fut.

2a.) P19N sejtekben a HSV-1 fertőzést követően a virális protein jelenlétét immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk. A mock fertőzöthöz képest, ahol immunjel nem volt detektálható, majdnem minden sejt immun pozitív volt az 1 PFU HSV-1 vírussal fertőzött kultúrában, 24h órával a fertőzést követően. Plaque assay-vel is megerősítettük, hogy a HSV-1-vel lefertőzött P19N kultúrában a vírus 1h órával a fertőzést követően elkezd replikálódni, és 24h óra elteltével eléri az input értéket.

2b.) A HSV-1 fertőzés már az első órában (38,2%-kal) szignifikánsan ($p < 0,01$) megemelte a képződő ROS mennyiségét a mock fertőzött kontrol sejtekhez képest. A képződő ROS koncentrációja magas maradt a fertőzést követő 2h (32,4%), 3h (35,6%) és 24h (54,3%) órában is. Az UV és hő kezelt vírussal végzett kezelések nem vezettek szignifikáns ROS koncentráció emeléséhez. A színváltozáson alapuló fotometriás mérések szolgáltattak

információt a sejtfelülűszóban felszaporodó lipid peroxidációs melléktermékek, főként HNE, koncentrációjáról. A lipid peroxidáció mértéke 2h órával a HSV-1 fertőzést követően szignifikánsan ($p < 0,05$) magasabb volt (358,00) mint a kontrol mock kezelés (302,00) hatására. Ez tovább emelkedett, 4h órával a fertőzést követően a HSV-1 vírussal fertőzött sejteken a lipid peroxidáció mértéke 486,00, míg a mock kezelt 310,20 ($p < 0,01$). Viszont annak ellenére, hogy a termelő ROS koncentrációja magas volt 24h órával a fertőzést követően, a lipid peroxidáció mértéke kontrol közeli értékre esett vissza.

2c.) Az HNE koncentráció és differenciáltsági foktól függően befolyásolta a HSV-1 replikációját. Az 5 μ M HNE előkezelés anélkül, hogy bármilyen citotoxikus hatása lett volna kezelt sejtekre, Vero sejtekben a 0,5h elteltével szignifikánsan csökkentette a vírus hozamot, míg az 1 órás előkezelésnek a vírus fertőzőképességre gyakorolt hatása nem tért el lényegesen a kontrolltól. P19 sejtekben mind a 0,5h mind az 1 órás előkezelés hatása kontrol körüli értékeket mutatott. P19N sejtekben a 0,5h órás kezelés kontrol közeli volt, de az 1h órás HNE előkezelés szignifikánsan megemelte a vírus replikáció mértékét. Az 50 μ M HNE előkezelés a P19 sejtek kivételével mind két időpontban szignifikánsan csökkentette a vírus hozamot mind Vero, mind P19N sejtekben. De itt jelentős citotoxikus hatással is számolni kellett.

2d.) Az ebselennel (seleno-organikus antioxidáns) történő előkezelés koncentrációfüggő módon szorította vissza a vírus hozamot. 5 és 10 μ M ebselen kezelés közel hasonló eredményt mutatott. Legjelentősebb hatása a 25 μ M ebselen kezelésnek volt, mely 0,95%-ra szorította vissza a vírusreplikáció mértékét a kezeletlen kontrollhoz képest.

3.a) A RhoA kis GTP-áz hatását a HSV sejtről-sejtre való terjedése során egy sejt-sejt fúziós modell rendszerben vizsgáltuk. Mivel a RhoA szerepet játszik a neuronális differenciációban, a korábban alkalmazott idegsejtvonalat nem használhattuk, és egy olyan indifferens sejtvonalat kellett választanunk (CHO-K1), amely lehetővé tette a nectin-1 és a virális glikoproteinek kölcsönhatásának izolált rendszerben való vizsgálatát. A konstitutívan aktív illetve domináns negatív RhoA plazmidot kotranszfektáltunk a virális glikoproteinekkal illetve a nectin-1 receptorral, mely populációkat 1:1 arányban összekevertük. β -galaktozidáz assay-vel vizsgáltuk a fúzió mértékét, mely a konstitutívan aktív RhoA jelenlétében 72%-kal magasabb volt, míg a domináns negatív RhoA mellett 52%-ra esett vissza. Konstitutívan aktív RhoA jelenlétében méretben nagyobb és több szincíciumot kaptunk mind CHO-K1, mind a HSV-1 fertőzésre alaphoz fogékony Vero sejtek esetén. Domináns negatív RhoA jelenlétében fordított hatást tapasztaltunk.

3b.) Annak meghatározására, vajon a sejt-sejt fúzió eredményez-e változást a RhoA aktivitásában, nectin-1-t hordozó akceptor, és virális glikoproteineket tartalmazó effektor sejteket kevertünk össze, majd adott időpontban a folyamatot leállítottuk, és G-LISA illetve Rhotekin pull-down assay-vel kiegészített Western blot technikákkal izoláltuk az aktivált RhoA proteint. Legmagasabb aktivitást 15-20 perccel az összeengedést követően mértünk, majd 1 óra elteltével ez visszaesett alapszintre, viszont 2h, 3h és 5h-nál az aktív RhoA szintje ismét megemelkedett.

MEGBESZÉLÉS

Egyéves kor feletti gyermekeknél, illetve felnőttek esetében a HSV-1 felelős a HSV enkefalitisz kimagasló hányadáért, ami jellemzően egyoldali és a limbikus területeket, illetve a prefrontális régiót érinti. Míg újszülöttekben a HSE kialakulása, mely ez esetben diffúz, több agyterületet érint preferáltság nélkül, főként HSV-2 fertőzésre vezethető vissza. Napjainkban még nem teljesen tisztázott miért mutat életkortól függően jelentős különbséget mind patogenezisében, mind klinikai megnyilvánulásában az idegrendszer HSV fertőzése. Vizsgálataink rámutattak ennek a paradigmának egy lehetséges magyarázatára, mely a központi idegrendszer elsődleges receptorának, a nectin-1 molekulának térbeli és időbeni eloszlásának változása az agy fejlődése során. Kísérleteink során újszülött rágcsáló agyban intenzív nectin-1 expressziót figyeltünk meg a kortikális területeken, valamint a hemiszférák között lévő kapcsoló struktúrákban (kéregtest, commissura hippocampi, és commissura anterior). A nectin-1 kifejeződés a kor előre haladtával növekedett a limbikus rendszerben, és ezzel párhuzamosan csökkent az asszociációs területeken. A nectin-1 kifejeződés markáns csökkenése a kéregtestben az agy egyedfejlődése során korrelált a felnőtt agyra jellemző egyoldali HSV terjedéssel. Eredményeinkből arra következtettünk, hogy az agy fejlődése során a vírus receptor (nectin-1) térbeli és időbeli kifejeződésének változása magyarázatul szolgálhat arra, hogy mikor mennyire fogékony az agy a neurotróp HSV fertőzésre.

Az újszülött kori HSE-t olyan patológiai elváltozások kísérik, mint kérgi atrófia, vízféjűség, microphthalmia. Mely azt sugallja, hogy ezek az agyi elváltozások a vírus közvetlen pusztításának tudhatók be, másrészt, hogy különösen a vándorló neuronok vannak a támadás középpontjában. Rágcsálókön végzett kísérletek is megerősítik azt a nézetet, miszerint a fejlődő agy sokkal fogékonyabb a HSV fertőzésre. Humán és rágcsáló mintákat vizsgálva arra a következtetésre jutottunk, hogy a nectin-1 tevékeny irányítója a radiális sejt vándorlásnak, ugyanis kifejeződik mind a vándorló sejteken, mind azokon a sejteken, melyek a sejt vándorlást irányítják (ld.: radiális gliák és Cajal Retzius sejtek). Ez alapján felállítottunk egy lehetséges modellt, arról, hogyan szabályozza a specifikus, rétegenként eltérő nectin-1 kifejeződés a sejtek radiális vándorlását.

A HSV gD–nectin-1 kapcsolat kialakulása nélkülözhetetlen az eredményes vírushelyezéshez. Így a nectin-1-hez kapcsolódó HSV gD befolyásolja a nectin-1 élettani funkcióját, mely a sejt vándorlás során a radiális glia hálózat és a vándorló idegsejtek intim kapcsolatának megszakadásához, ezáltal hibás kérgi rétegződéshez vezethet. Kísérleteink azt mutatták, hogy a radiális vándorlás mellett a nectin-1 részt vesz a tangenciális vándorlásban is. A rágcsáló szaglógumóban ennek kapcsán azonosítottunk egy új sejt vándorlási útvonalat: a CMS-t (callosalis migrációs út), mely a rostralis migrációs úttal (RMS-sel) párhuzamosan fut, és a fejlődés csak egy bizonyos stádiumában található meg. Igaz, hogy a radiális és tangenciális vándorlás között a kapcsolat még teljességében nem ismert, úgy tűnik, a nectin-1 kapcsolatot teremt a kétféle vándorlási típus között. Elmondhatjuk, hogy az agy fejlődése során a nectin-1 fontos szerepet tölt be a neuronok mind radiális, mind tangenciális vándorlásában. Így

egy méhen belül bekövetkező HSV fertőzés nagymértékben megváltoztathatja mind a kérgi rétegződést, mind a kérgi összeköttetéseket. Mivel a HSV más receptorokat is használ a sejtbe való bejutáshoz, elképzelhető, hogy ezeknek, a receptoroknak az eloszlása módosíthatja a HSE patológiai megjelenését.

Az oxidatív stressz, mint kísérőjelenséget, már sokféle vírusfertőzés esetében leírták. Kísérleteink kimutatták, hogy HSV-1 közvetlen módon képes reaktív oxigén (ROS) gyökök felhalmozódása révén oxidatív stressz kiváltására *in vitro* neuronális sejt kultúrán (P19N), továbbá, hogy a HSV-1 fertőzést követő ROS képződéshez szükség van a vírus sejtbe való bejutására, valamint replikációjára. Emelt ROS szint már a fertőzést követő első órában megfigyelhető, ami arra enged következtetni, hogy az oxidatív stressz kiváltása a bejutással egy időben, vagy közvetlen utána lezajló esemény, melyhez elegendő egy vagy több virális „immediate early” vagy „early” gén átíródása. A HSV-1 fertőzés antioxidánssal, ebselnnel, mely egy glutation peroxidáz típusú enzim, visszaszorítható. Ez a tény megint csak megerősíti azt a feltételezést, hogy az eredményes fertőzéshez a vírusnak oxidatív stresszt kell indukálnia. Az oxidatív stressz a membránok foszfolipidjeinek károsítása révén lipid peroxidációhoz vezet, melynek során olyan bioaktív melléktermékek keletkeznek, mint 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) és malondialdehid (MDA). Kísérleteink azt mutatták, hogy HSV-1 közvetlenül indukál lipid peroxidációt, mely jelentős sejtpusztuláshoz vezet a sejtmembrán szétesése és a nukleinsav károsodása révén. Az HNE és MDA amellet, hogy apoptózist indukál, kis koncentrációban regulátor funkciót tölt be a sejtosztódás és a sejt differenciáció folyamatában. Munkánk során megvizsgáltuk, hogy magas illetve fiziológias koncentrációban jelenlevő HNE hogyan hat a vírusfertőzésre. Érdekes módodon, azt kaptuk, hogy differenciált idegsejtek környezetében kis koncentrációban jelenlevő HNE pozitívan hat a vírusfertőzésre, mely maga után vonja azt a lehetőséget, hogy ezáltal a szomszédos, még nem fertőzött sejtek HSV-re való fogékonysága befolyásolható. Ez nagyon fontos lehet, ha számba vesszük, hogy az alkalmankénti reaktiváció során a látens fertőzés helyén is kimutatható enyhén emelkedett szintű HNE, mely ezáltal gyorsíthatja a fertőzés kiterjedését, és így segíti a gazdaszervezet védekező, antioxidáns rendszerének visszaszorítását. Munkánk, arra enged következtetni, hogy az oxidatív stressz és oxidatív károsodás a HSV fertőzés esszenciális velejárója, mely jelentős mértékben hozzájárulhat a HSE kialakításához.

Végül a RhoA kis GTP-áz szerepét vizsgáltuk a vírus sejtről sejtbe való terjedésében CHO-K1 sejteken. Mivel a RhoA befolyásolja az idegsejtek differenciálódását, ezért úgy találtuk, hogy egy nem idegi sejt vonal alkalmazása, pontosabb következtetéseket enged levonni a mechanizmust illetően. A vírus sejtről-sejtbe való terjedése, elsődleges módja annak, hogy a vírus az idegrendszeren belül újabb és újabb sejteket hajtson igába. Ismert, hogy a vírus sejtbe lépésekor RhoA aktiválódik nectin-1-t expresszáló sejtekben, de szerepe a sejtről-sejtbe való terjedés során eddig a pontig feltáratlan. Kísérleteink azt mutatták, hogy az aktivált RhoA elősegíti a sejt-sejt fúziót és a szincíciumok kialakulását. A legmagasabb RhoA aktivációt a sejtek összeeresztését követő első 20 percben tapasztaltuk, mely azt mutatja, hogy a receptor és vírus glikoproteinek jelenléte elengedhetetlen a RhoA

aktivációhoz, továbbá azt, hogy a RhoA korai aktiválódása elengedhetetlen a fertőzés korai fázisában. Mivel az aktivitás az első 60 percet követően ismét megemelkedett 2h, 3h és 5h óránál, ez több dologra enged következtetni, egyrészt, hogy a RhoA részt vesz késői jelátviteli folyamatokban is, vagy aktivációja ciklikus, és az újabb és újabb fúziót ismételt RhoA aktiváció követi. A kezdeti RhoA aktiváció nectin-1-hez kapcsolódó jelátvitel következménye lehet, míg a későbbi, kapcsolódhat a HSV-1 által indukált ROS képződéshez. ROS képes felhasználni RhoA jelátvitelt arra, hogy feloldja a szoros kapcsolatokat (tight junction), melyek nectin-afadin rendszer szabályozása alatt állnak. A szoros kapcsolatok felbomlása a vér-agyagát károsodásához vezet, mely lehetővé teszi az immunsejtek invázióját. Az így bejutó immunsejtek tevékenysége hozzájárul a ROS szintjének további emelkedéséhez. Tehát RhoA feltehetően jelentős mind a vírus által közvetlen mediált (HSV sejtről-sejtre terjedése), mind az immunrendszer által közvetített gyulladásos folyamatok kiváltásában (immunsejtek RhoA jelátvitel által történő beáramlása a fertőzés helyére). Ezek a folyamatok hozzájárulhatnak a HSE kialakulásában szerepet játszó nagymértékű sejtkárosodáshoz, és sejtpusztuláshoz. Bár úgy tűnik, hogy ROS és nectin-1 képes aktiválni a RhoA kis GTP-át a HSV által kiváltott oxidatív károsodás során, további vizsgálatok elvégzése indokolt, mely a jelátviteli út pontosabb megértéséhez vezethet.

Zárszóként említésre méltó, hogy HSV-1 jelenlétét herpesz encefalitiszen kívül olyan idegrendszeri betegségekben is, mint Alzheimer kór és szkizofrénia, leírták már, bár ezekben a HSV szerepe még tisztázatlan. Mindenesetre érdekes az a többszörös egybeesés, miszerint a HSE-ben és a szkizofréniában érintett agyi területek azonosak, továbbá egy perinatális herpesz vírus fertőzés növeli a kockázatát egy esetleges, az egyedfejlődés során később megjelenő, szkizofrénia kialakulásának, valamint az is, hogy a lipid peroxidáció egyes elméletek szerint hozzájárul a szkizofrénia patológiai elváltozásaihoz. Így HSV által kiváltott idegrendszeri elváltozások mögött álló folyamatok kutatása hozzájárulhat más neurológia betegségek patológiájának tisztázásához és segíthet egy ellenük irányuló klinikai terápia kifejlesztéséhez.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretnék köszönetet mondani az Alma Maternek, a Szegedi Tudományegyetemnek, hogy elsősorban a Pszichiátriai, Orvos Biológiai valamint Élet és Idegtudományi Intézete által nyújtott szakszerű, alapos képzés lehetővé tette ennek a dolgozatnak a megszületését. Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Horváth Szatmárnak, aki kezdetektől fogva támogatta tudományos előmeneteletemet. Úgy érzem, a jelenségek mögötti folyamatok jobb megértéshez vezetett, az, hogy munkámat nemcsak kutatóként, hanem orvosként is felülbírálta. Lényeg látása és motivációja mindig példaként állt előttem. Külön köszönet illeti Dr Vályi-Nagy Tibort, kinek laborjában tölthettem 15 hónapot az Illinois Egyetemen, Chichago-ban, akiben nemcsak egy nagyon logikusan gondolkodó kutatóra, hanem barátokra is leltem. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Rosztoczy Ferencnek, aki lehetővé tette számomra Rosztoczy alapítványtól kapott ösztöndíj révén ezt a sok szempontból gyümölcsöző amerikai tanulmányutamat. Továbbá köszönettel tartozom Dr. Deepak Shukla-nak, azért hogy lehetőséget biztosított laborjában a molekuláris munkák elvégzésére, egy újabb amerikai tanulmányút keretén belül, melyre a Magyar Oktatási Minisztérium és a Doktoranduszok Országos Szövetsége biztosította az anyagi fedezetet. És semmiképpen sem szeretném a sorból kihagyni Dr. Toldi Józsefet, akire mindig minden körülmények között számíthattam, annak ellenére, hogy már nem tartoztam hivatalosan az Intézetéhez.

Szeretném megköszönni az összes kollégának, a teljesség igénye nélkül Dr. Seprényi Györgynek, az Orvos Biológiai Intézet asszisztenseinek, az Élettani Intézet munkatársainak meg nem szűnő barátságát és támogatását.

Nem utolsó sorban, de a legnagyobb köszönettel a szüleimnek, öcsémnek és jövődöbeli páromnak tartozom. Köszönöm a türelmet, a biztatást, azt hogy mindig büszkék voltatok rám. És nem utolsó sorban nektek, Marcsi, Rita, Dóri, Andi., kedves barátok, akikre mindig számíthattam Nélkületek, ezt nem tudtam volna véghez vinni.