

**A herpes simplex vírus és a rubeolavírus autofágiára gyakorolt *in vitro*  
hatásának vizsgálata**

Dr. Pásztor Kata

Ph.D. Tézis

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet

2014

## ÖSSZEFOGLALÁS

A vírusok szaporodásuk során számos intracelluláris folyamat működését befolyásolják. Ezen változások különféle programozott sejthalál formák aktiválódását eredményezhetik. Vírusfertőzések során az apoptózis, az anoikis, a nekroptózis, a partanatosz, a piroptózis és az autofágia indukcióját írták le.

Az autofágia finoman szabályozott lebontó folyamat, mely eltávolítja és elemeire bontja a károsodott sejtalkotókat és fehérjéket. Intracelluláris mikroorganizmusok megsemmisítését is végzi, ez esetben a folyamatot xenofágiának nevezik. Az autofágia során az eltávolítandó sejtkomponensek, mikroorganizmusok az autofagoszómába kerülnek, ami a lizoszómával való fúzióját követően autolizoszómává alakul. A vezikulatartalom a lizoszómális enzimek hatására lebomlik. Az autofagoszóma kialakulásában fontos szerepet játszik az Atg5, Atg12 és Atg16L proteinek által alkotott, 800 kDa molekulatömegű szuperkomplex, valamint az LC3B ubikvitinszerű fehérje. Az autofagoszóma kialakulása során először az Atg4 cisztein proteáz a pro-LC3B-t LC3B-I-re hasítja. Az LC3B-I-hez az Atg5/Atg12/Atg16L komplex foszfatidil-etanolamint kapcsol, és így jön létre az LC3B-II, ami nélkülözhetetlen az autofagoszóma membrán felépüléséhez.

A vírusok autofágiára gyakorolt hatása még nem kellően tisztázott. Vizsgálataink során ezért a rubeolavírus és a herpes simplex vírusok autofágiás folyamatokra gyakorolt hatásait tanulmányoztuk *in vitro* SIRC corneális sejtvonalon.

### **A rubeolavírus autofágiára gyakorolt hatása**

Munkánk kezdeti szakaszában indirekt immunfluoreszcencia és plakk titrálás segítségével megállapítottuk, hogy a SIRC sejtvonalon fogékony a rubeolavírus fertőzésre.

Ezt követően western blot analízissel tanulmányoztuk az LC3B-I és -II proteinek valamint az Atg5–Atg12 komplex szintjét. A fertőzetlen kultúrákban a 0. napon az LC3B mindkét formája kimutatható volt, és az LC3B-II szintje jelentős emelkedést mutatott a kontroll 1., 3., és 5. napos mintáiban. Ezen adat bizonyította a bazális autofágia aktiválódását a kontroll sejtekben. Ezzel szemben, a vírussal fertőzött kultúrákban az LC3B-II szintjének csak kismértékű emelkedését tudtuk detektálni a fertőzést követő 3. és 5. napon. A kontroll minták endogén Atg5–Atg12 expressziója kismértékű csökkenést mutatott, míg a vírusfertőzés hatására az Atg5–Atg12 komplex szintje nagymértékben csökkent a vírusfertőzéssel párhuzamosan. A rubeolavírus tehát nagymértékben csökkenti az Atg5–Atg12 fehérje szintjét és gátolja az LC3B-I lipidációját.

Az autofágiás-fluxus vizsgálatára irodalmi adatoknak megfelelően bafilomycin A1 kezelést alkalmaztunk. Megállapítottuk, hogy a vírussal fertőzött és bafilomycin A1-gyel kezelt mintákban a lipidált LC3B szintje alacsonyabb volt, mint a bafilomycin A1 kontrollé. A rubeolavírus tehát gátolja az autofágiás fluxust.

Az LC3B intracelluláris lokalizációját indirekt immunfluoreszcenciás vizsgálat segítségével tanulmányoztuk bazális és rapamycin-indukálta autofágia során. Az intracelluláris LC3B eloszlás, LC3B-I és LC3B-II esetében különbözik. Az LC3B-I a citoplazmában szabadon található meg, immunfestés során diffúz citoplazmafestődést láthatunk, míg lipidációt követően az LC3B-II beépül az autofagoszómák membránjába. Eredményeink szerint mind a kontroll, mind pedig a rapamycinnel kezelt sejtekben intenzív, pöttyözött LC3B festődés volt kimutatható az 5 napos kultúrákban; a számos nagyméretű autofagoszóma jelenlétének köszönhetően. Ezzel szemben a vírussal fertőzött mintákban, illetve a vírussal fertőzött és rapamycinnel kezelt kultúrákban lényegesen kevesebb autofagoszóma volt detektálható. A festődés intenzitását line scan analízissel kvantitáltuk. Mérési adataink bizonyították, hogy a kontroll és rapamycinnel kezelt mintákban számos erőteljes csúcs található, míg a vírusfertőzött illetve vírusfertőzött és rapamycin-kezelt mintákban sokkal kevesebb és kisebb intenzitású csúcs van jelen. A rubeolavírus tehát gátolja az LC3B lipidációját, és ezáltal az autofagoszómákba történő transzlokációját. ImageJ software segítségével meghatároztuk a vakuolumok számát és méretét. Az átlagos vakuolumszám a kontroll sejtek esetében 19,76, a rapamycinnel kezelt kultúrákban pedig 21,89 volt. A vírussal kezelt sejtekben az átlagos autofagoszómaszám 12,49, míg a vírussal-fertőzött és rapamycinnel kezelt kultúrákban 12,81 volt. A rubeolavírus tehát csökkenti az autofagoszómák számát. Az átlagos vakuolum átmérő a kontroll sejtek esetében 657 nm, a rapamycinnel kezelt kultúrákban 680 nm volt. A vírussal kezelt sejtekben az autofagoszómák átlagos átmérője 481, míg a vírussal-fertőzött és rapamycinnel kezelt kultúrákban 480 nm volt. Érdekes módon a rubeolavírus az autophagosomák átmérőjét is csökkenti.

Az autofagoszómák lizoszómákkal való fúziójának köszönhetően autofágia során a citoplazma pH-ja savi irányba tolódik. A citoplazmatikus acidifikációt acridin orange festés segítségével vizsgáltuk. Az acridine orange savi pH-nál piros, míg neutrális pH-nál zöld színű. A kontroll sejtek citoplazmájában intenzív, punktált piros festődés volt látható, míg a vírusfertőzött sejtekben a festődés intenzitása és az acidotikus vezikuláris organelumok száma is csökkent. A kontroll kultúrákban, a különböző spektrális tartományokban mért festődési intenzitások megoszlása a piros szín esetében 49%, a narancs szín esetében 50.6%, a zöld szín esetében pedig 0,4% volt. A vírusfertőzött sejtekben, a festődési intenzitások

megoszlása a piros szín esetében 13%, a narancs szín esetében 84%, a zöld szín esetében pedig 3% volt. A rubeolavírus tehát jelentősen csökkenti az acidotikus vezikuláris organellek számát a fertőzött sejtekben.

Végül tanulmányoztuk azt is, hogy az autofágia milyen hatást gyakorol a vírus fertőzés folyamatára. Rapamycin alkalmazásával indukáltuk az autofágia mTOR útvonalát, és mértük az infekció virion számát, valamint az apoptózis mértékét. Plakk titrációval megállapítottuk, hogy az autofágia-indukció szignifikánsan csökkentette az infekció virionszámát. Apoptózis ELISA segítségével megállapítottuk, hogy az autofágia-indukció gátolja a rubeolavírus által indukált apoptózist. A rubeolavírus tehát két celluláris antivirális mechanizmust képes blokkolni az autofágia gátlása révén.

Mivel az autofágia fontos szerepet játszik az embriogenezis folyamatában, feltételezzük, hogy a rubeolavírus autofágiát gátló hatása hozzájárulhat a kongenitális rubeola szindróma során kialakuló súlyos magzati ártalomhoz.

### **A herpes simplex vírusok autofágiára gyakorolt hatása**

Indirekt immunfluoreszcencia segítségével megállapítottuk, hogy a SIRC sejtvonal fogékony mind a herpes simplex vírus-1 mind pedig a herpes simplex vírus-2 fertőzésre.

Transzmissziós elektronmikroszkópia segítségével tanulmányoztuk a herpes simplex vírus-1 fertőzés hatására létrejövő intranukleáris és intracitoplazmatikus replikációs kompartmentek, valamint a citoplazmában kialakuló auto- és xenofágiás vakuolumok jelenlétét. Ezen vizsgálatok egyértelműen bizonyították a virionok, valamint számos auto-, illetve xenofagoszóma jelenlétét a fertőzött sejtekben.

Az Atg5 és az LC3B intracelluláris lokalizációját indirekt immunfluoreszcenciás vizsgálat segítségével tanulmányoztuk bazális autofágia során. Kísérleteink a kontroll sejtekben halvány, diffúz citoplazmatikus festődést mutattak ki, ami a bazális autofágia alacsony aktivitására utal 24 órás sejtkultúrákban. Ezzel szemben, a vírussal fertőzött mintákban intenzív, pöttyözött Atg5 és LC3B festődés volt kimutatható; a számos nagyméretű autofagoszóma jelenlétének köszönhetően. Ezen adatok arra utalnak, hogy a herpes simplex vírus-1 befolyásolja az Atg5 és az LC3B autofagoszóma marker proteinek intracelluláris lokalizációját.

Western blot analízissel tanulmányoztuk az LC3B-I és -II proteinek szintjét. A fertőzetlen kultúrákban az LC3B mindkét formája kimutatható volt a tenyésztés 15. órájában, és az LC3B-II alacsony szintje az autofágia kis mértékű alap aktivitására utalt. Az LC3B-II szintje

jelentősen növekedett mind herpes simplex vírus-1, mind herpes simplex vírus-2 hatására. A fertőzés tehát fokozza az LC3B lipidációját.

Az autofágiás-fluxus vizsgálatára irodalmi adatoknak megfelelően bafilomycin A1 kezelést alkalmaztunk. Megállapítottuk, hogy a vírussal fertőzött és bafilomycin A1-gyel kezelt mintákban a lipidált LC3B szintje kissé alacsonyabb volt, mint a bafilomycin A1 kontrollé. A herpes simplex vírus-1 és a herpes simplex vírus-2 tehát valamelyest fékezi az autofágiás fluxust.

A citoplazmatikus acidifikáció mértékét a herpes simplex vírus fertőzés során is acridine orange festés segítségével vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy mind a herpes simplex vírus-1 mind pedig a herpes simplex vírus-2 fertőzés hatására fokozódik a citoplazmatikus acidifikáció mértéke.

Propidium jodid / annexin V kettős festéssel tanulmányoztuk a herpes simplex vírusok sejtkárosító hatását. Megállapítottuk, hogy az apoptotikus mechanizmusok fontos szerepet játszanak mind a herpes simplex vírus-1 mind a herpes simplex vírus-2 citopátiás hatásában.

Végül tanulmányoztuk az autofágia és az apoptózis közötti kölcsönhatást is. Bafilomycin A1-gyel gátoltuk az autofágiát, majd apoptózis ELISA-val mértük a sejtek herpes simplex vírus fertőzésre adott apoptotikus válaszát. Eredményeink szerint az autofágia gátlása jelentősen fokozta a mind a herpes simplex vírus-1 mind pedig a herpes simplex vírus-2 által indukált apoptózis mértékét.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy mind a herpes simplex vírus-1 mind pedig a herpes simplex vírus-2 autofágiát indukál a SIRC corneális sejtvonalon. Ezáltal a herpes simplex vírus fertőzések kiváltják az egyik legjelentősebb celluláris védekező mechanizmus, az autofágia fokozódását. Ezek az adatok hozzájárulhatnak a herpes simplex vírusok által okozott szemészeti és egyéb kórképek patogenezisének jobb megértéséhez is.