

**HERPES SIMPLEX-1 LÁTENCIA VIZSGÁLATA IN VIVO ÉS
IN VITRO MÓDSZEREK SEGÍTSÉGÉVEL**

Ph.D. értekezés tézisei

Dr. DÓSA SÁNDOR

Témavezető:

Endrész Valéria PhD

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola
Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet, Szegedi Tudományegyetem, Szeged
Pathológiai Intézet, Szegedi Tudományegyetem, Szeged

Szeged

2016

KÖZLEMÉNYEK

A dolgozat témakörébe tartozó közlemények

- I. Valyi-Nagy K, **Dósa S**, Kovacs SK, Bacsa S, Voros A, Shukla D, Folberg R, Valyi-Nagy T. Identification of virus resistant tumor cell subpopulations in three-dimensional uveal melanoma cultures. *Cancer Gene Ther.*, 17(4):223-234 (2010)

IF: 3.74

- II. **Dósa S**, Castellanos K, Bacsa S, Gagy E, Kovacs SK, Valyi-Nagy K, Shukla D, Dermody TS, Valyi-Nagy T. Chronic progressive deficits in neuron size, density and number in the trigeminal ganglia of mice latently infected with herpes simplex virus. *Brain Pathol.*, 21(5):583-593 (2011)

IF: 3.99

BEVEZETÉS

A *Herpesviridae* család nagy és változatos csoportot alkot, a csoport tagjai a főemlősöktől a halakig bezáróan okoznak betegségeket. Biológiai tulajdonságaik alapján a *Herpesviridae* családot további három alcsaládra lehet osztani; *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* és *Gammaherpesvirinae*. Az orvosi szempontból jelentős HSV-1 és HSV-2 az *Alphaherpesvirinae* alcsaládba tartozik. Közös jellemzőik, hogy viszonylag rövid reprodukciós ciklusra képesek, gyorsan terjednek sejttenyészetben, hatékonyan elpusztítják a fertőzött sejteket és képesek létrehozni látens fertőzést elsősorban, de nem kizárólag, az érző idegdúcokban. A fertőzés a sérült bőr vagy nyálkahártya hámsejtjeiben megy végbe, az elsődleges fertőzés gyakran a korai gyermekkorban történik. A vírus a hámsejtben szaporodik gyakran tünetmentesen, de előfordulhat, hogy hólyagok jelennek meg a nyálkahártyán, melyek végül fekélyekké alakulnak a fertőzés területén. Az elsődleges fertőzést követően, mely a hámsejtek pusztulásával jár, a vírus az érzőideg-végződésbe jut, majd az idegnyúlványokon keresztül az idegdúcokban (ganglionokban) telepszik meg, ahol lítikus (a sejt pusztulásához vezető) vagy látens (élethosszig tartó lappangás) virális génexpresszió következik be.

A látens fertőzés alatt az idegdúcban minimális a kimutatható virális fehérje, a virális genomról történő átírás a látencia-asszociált transzkriptumokra (LATs) korlátozódik. Nem ismert, hogy a látens HSV-1 fertőzés maga, vagy az ismételt reaktivációs események és az

ehhez kapcsolódó gyulladáshoz való válasz áll-e az idegdúcok károsodása mögött. A trigeminális (háromosztatú) ganglionokban a látens HSV-1 fertőzés a kor előrehaladtával egyre elterjedtebb és érinti a felnőttek többségét. A HSV-1 fertőzés járványtanilag összefüggésbe hozható számos idült neuropszichiátriai és neurodegeneratív betegséggel. Kísérleti körülmények között a HSV-1 fertőzés egerekben idült viselkedési és idegrendszeri károsodáshoz, illetve krónikus fájdalomhoz vezethet. Míg az idegsejtek károsodása jól dokumentált következménye a fertőzés heveny szakaszának, a látens fertőzés patológiás következményei kevésbé ismertek.

Kutatásunk egyik célja annak megállapítása volt, hogy a látens HSV-1 fertőzés okozhat-e idegsejt károsodást az egerek háromosztatú idegdúcaiban. Felnőtt BALB/c egerekből származó háromosztatú idegdúcokat vizsgáltunk 1, 12 és 31 héttel a szaruhártyán keresztül HSV-1 oltást követően. Vizsgáltuk a fertőzés produktív vagy látens jellegét, illetve azt, hogy milyen változások történtek a neuronok méretét, sűrűségét és számát illetően.

A HSV-1 ezen felül egy ígéretes jelölt a vírus közvetített onkolitikus (daganatpusztító) terápia területén. Az onkolitikus HSV-1 terápia függ a vírus szaporodásától a daganatsejtekben, illetve fokozza a szervezet vírusellenes - és ezáltal daganatellenes - immunválaszát. Annak ellenére, hogy jelentős előrelépések történtek, a vírus közvetített onkolitikus terápia a mai napig kihívásokkal néz szembe. Bár kísérleti körülmények között, hagyományos egyrétegű, kétdimenziós daganatsejt-tenyészeteket használva hatékonyan lehet HSV-1 vírusokkal daganatsejt tenyészeteket megsemmisíteni, élő szervezetben a tumorsejtek elpusztítása gyakran nem teljes. Ezen jelenség okai a mai napig nem tisztázottak. Azonban számos megfigyelés azt sugallja, hogy a potenciális problémák közé tartozik többek között az extracelluláris mátrix gátló hatása a daganatsejtek közötti vírusterjedésre, illetve a virális receptorok csökkent kifejeződése a különböző daganatsejt szubpopulációkban.

Munkánk második részében a HSV-1 által közvetített onkolízist vizsgáltuk két melanoma (rosszindulatú festéksejtes daganat) sejtvonal (OCM1 és C918) tanulmányozásával. Hogy bővebb betekintést nyerjünk a melanoma sejtek HSV-1 által közvetített onkolízissel szembeni ellenállásának folyamatába, egyrétegű/kétdimenziós és extracelluláris mátrixot tartalmazó háromdimenziós sejtenyészeteket fertőztünk meg egy módosított HSV-1 vírus törzssel, mely replikációja során zöld fluoreszcens fehérjét fejez ki.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a HSV-1 látens fertőzés folyamatát vizsgálatuk *in vivo* és *in vitro* módszerek segítségével.

- Vizsgálatunk első részében felnőtt BALB/c egerekből származó háromsztratóú idegdúccokat vizsgálatunk HSV-1 fertőzést követően. Arra kerestük a választ, hogy vajon a látens HSV-1 fertőzés okozhat-e idegsejt károsodást egerek háromsztratóú idegdúcaiban, illetve hogy a látens HSV-1 fertőzés milyen hatással van a neuronok méretére, sűrűségére, illetve a neuronok számára a vizsgált egerekben.
- Munkánk második részében két melanoma sejtvonalat (OCM1 és C918) fertőztünk meg egy módosított HSV-1 vírus törzssel (mely replikációja során zöld fluoreszcens fehérjét fejez ki). A vírusfertőzést követően vizsgálatunk az OCM1 és C918 melanoma sejtek HSV-1 által közvetített onkolízissal szembeni ellenállását, egyrétegű/kétdimenziós és extracelluláris mátrixot tartalmazó háromdimenziós sejttenyészetek segítségével. Munkánk során a következő kérdésekre kerestük a választ: (i) a háromdimenziós sejt kultúrákban lévő extracelluláris mátrixnak van-e gátló hatása a daganatsejtek közötti vírusterjedésre az általunk vizsgált két melanoma sejt vonalban; (ii) mely mechanizmusok segíthetik elő a háromdimenziós környezetben lévő tumorsejtek megnövekedett túlélését; (iii) vajon a háromdimenziós tumorsejt-tenyészetek alkalmasak-e különböző, látens HSV-1 fertőzést hordozó tumorsejt-populáció azonosítására, vizsgálatára; (iiii) vajon a háromdimenziós tumorsejt-tenyészetek használhatóak-e annak kiderítésére, hogy az extracelluláris mátrix milyen módon befolyásolja az onkolízissal vírusterápia hatékonyságát.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

HSV-1 látens fertőzés vizsgálata *in vivo* módszerek segítségével

- BALB/c egereket fertőztünk meg szaruhártyán keresztül egy vad típusú HSV-1 vírus törzssel (HSV-1 17+), majd a kísérleti egerekből származó trigeminális ganglionokat vizsgálatunk 1, 12 és 31 héttel a vírusfertőzést követően (5, 17 és 36 hetes életkorban). A

háromosztatú idegdúcok gyökeit az agytörzs magasságában átvágtuk, a ganglionokat formaldehides fixálás után, a végső beágyazás előtt véletlenszerűen elforgattuk hossz tengelyük mentén. Számos metszet készült a teljes vastagságnak megfelelően, ezeket rutin szövettani vizsgálatra (hematoxilin-eozin festés), immunhisztokémiára, *in situ* hibridizációra és morfológiai vizsgálatokra használtuk fel.

- Az immunhisztokémiai vizsgálat során 6- μ m vastagságú paraffinba ágyazott metszeteken az endogén peroxidáz aktivitás gátlását követően immunfestést végeztünk. A HSV-1 antigéneket (virális burok glikoprotein gB, gC, gD, gH és gL) poliklonális anti-HSV-1 szérummal detektáltuk. A minták elsődleges ellenanyaggal, majd biotinizált másodlagos ellenanyaggal történt inkubációját, illetve DAB szubsztráttal történő előhívástát követően a HSV-1 antigéneket fénymikroszkóppal detektáltuk.
- *In situ* hibridizáció során a HSV-1 látencia-asszociált transzkriptum (LAT) kimutatása 35 S-jelölt DNS próbával történt, mely specifikus volt a LAT Bst2±Bst2 fragmentumára. A jelölt próbával történő kezelést és a minták előhívását követően hematoxilin-eozin festést alkalmaztunk.
- Az idegsejt átlagos átmérő, az idegsejtmag átmérő, az idegsejt sűrűség, a ganglion térfogat és a gangliononkénti idegsejt szám meghatározása az alábbiak szerint történt: (i) Az idegsejt átlagos átmérő, illetve az idegsejt átlagos magátmérő meghatározására Aperio képanalizáló rendszert használtunk. A véletlenszerűen kiválasztott idegsejteket manuálisan mértük meg. (ii) Az idegsejt sűrűség vizsgálata 20 μ m vastagságú, csupán hematoxylinnal festett metszeteken történt. Ezeket a metszeteket digitális videokamera segítségével 60-szoros nagyítás mellett vizsgálatuk. Öt darab véletlenszerűen kiválasztott gangliont elemeztünk. Számítógépes rendszer segítségével sztereológiai optikai disszektor módszert alkalmaztunk, útmutatásként a Tandrup-féle módszert követtük. Az n_v (idegsejtek / térfogat) teljes értékét a következő képlet alapján számoltuk ki: $n_v = \frac{\Sigma Q}{p \cdot \Sigma a(\text{frame}) \cdot h}$, ahol ΣQ - a disszektoronkénti neuronok összege a teljes disszektor térfogatban, $a(\text{frame})$ a számítási keret területe, h az optikai disszektor magassága és p szektoronkénti pontok száma. (iii) Ganglion térfogat meghatározására képanalizáló szoftvert és digitális kamerát használtunk. Ötszörös nagyítás mellett a

metszet kerületéből a számítógép automatikusan számította ki a metszet területét. A teljes térfogat kiszámítása a metszetek átlagvastagságának és a metszetek számának szorzása révén történt. (iii) A gangliononkénti neuron szám (N) az idegsejt sűrűség (n_v) és a ganglion térfogat (V) egyszerű szorzataként $N = n_v \times V$ került kiszámításra.

- A kapott adatok statisztikai kiértékelése a STATISTICA for Windows nevű szoftver segítségével történt. A neuronok méretére, sűrűségére és számára vonatkozó adatok normalitásának tesztelése Kolmogorov–Smirnov teszt, míg a homogenitás vizsgálata F-teszt illetve Levene's teszt használatával történt. A változást akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a $p < 0.05$ kritérium teljesült. A neuronok méretére, sűrűségére és számára vonatkozó adatok kiértékelésére független mintás t-próbát és egy szempontos variancia-analízist (ANOVA) használtunk melyet, Scheffe-féle post-hoc teszt követett. A középértékek közötti különbségeket szignifikánsnak tekintettük ha $p < 0.05$ feltétel teljesült. Az eredményeket középérték \pm standard deviációban (SD) fejeztük ki.

HSV-1 látens fertőzés vizsgálata *in vitro* módszerek segítségével

- Uveális melanoma sejtek HSV-1 fertőzés által kiváltott sejtpusztulását 2-dimenziós (2D) és 3-dimenziós (3D) környezetben tanulmányoztuk. C918 és OCM1 uveális melanoma sejteket tenyésztettünk extracelluláris mátrix jelenlétében, (Matrigel, 3D) illetve annak hiányában (2D). A 2D sejt kultúrák felszínére 70 százalékos konfluencia elérése után körülbelül 1 mm vastag Matrigel-t helyeztünk. Ezt követően a 2D és 3D kultúrákat megfertőztük vad típusú (wt) HSV-1 (KOS) (M.O.I. 0.5) vagy egy genetikailag módosított HSV-1 törzssel (HSV-1 K26GFP) (M.O.I. 0.5), illetve kontrol-fertőzést végeztünk PBS-sel. Ezt követően 4 hétig naponta figyeltük a sejteket invertált fluoreszcens mikroszkóp segítségével. A vizsgálati idő alatt tanulmányoztuk a virális cytopátiás hatást, illetve a zöld fluoreszkáló fehérje (GFP) kifejeződését.
- A HSV-1 Matrigel-en keresztüli terjedésének vizsgálatához C918 és OCM1 3D sejt kultúrákat fertőztünk meg HSV-1 K26GFP (M.O.I. 0.5) törzssel, illetve kontroll-fertőzést végeztünk PBS-sel. A sejt kultúrákat ezután két hétig tenyésztettük tovább és szabályos időközönként invertált fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a GFP kifejeződését.

- Előzetesen HSV-1 K26GFP törzssel fertőzött uveális melanoma sejtek Matrigel-ben való növekedési mintázatának tanulmányozásakor C918 és OCM1 uveális melanoma sejtek 2D sejt kultúráit fertőztünk meg HSV-1 K26GFP (M.O.I. 0.5) törzssel, illetve kontroll-fertőzést végeztünk PBS-sel. A fertőzést követően a sejteket lekapartuk a sejttenyésztő edények felszínéről és a sejt szuszpenziót sejttenyésztő tápfolyadékba helyeztük. A 3D kultúrákhoz körülbelül 0.2 mm vastagságú Matrigel réteget képeztünk a sejttenyésztő edények felszínén. A melanoma sejtek szuszpenzióját – melyeket HSV-1 K26GFP vagy PBS-sel kezeltünk – 1:1 arányban összekevertük Matrigel-lel, majd a Matrigel-lel előzetesen bevont sejttenyésztő edényekbe helyeztük. Ezután 4 hétig szabályos időközönként ellenőriztük a GFP kifejeződését, és megszámloltuk a GFP-t kifejező sejtek arányát a 2D és 3D sejt kultúrákban invertált fluoreszcens mikroszkóp segítségével.

EREDMÉNYEK

A látens HSV-1 fertőzés okozta morfológiai változások BALB/c egerekből származó háromosztatú idegdúcokban

1. Szaruhártyán keresztüli HSV-1 fertőzés hatásának vizsgálata BALB/c egerekben

BALB/c egereket elaltattuk szaruhártyán keresztüli HSV-1 fertőzését követően 1, 12 és 31 héttel (6, 17, illetve 36 hetes életkorban), majd a belőlük nyert háromosztatú idegdúcokat immunhisztokémiai módszerekkel, illetve *in situ* hibridizációt követő hematoxylin-eosin festés segítségével vizsgáltuk. Kontrollként steril sejttenyésztő tápfolyadékkal kezelt (mock-kezelt) egerekből származó háromosztatú idegdúcokat vizsgáltunk. HSV-1 fehérje kifejeződést egyik vizsgált időpontban sem tudtuk kimutatni a kontroll egerek esetében. A HSV-1 fertőzött egerekből származó trigeminális ganglionokban egy héttel a vírusfertőzés után HSV-1 fehérjéket mutattunk ki, ami a HSV-1 replikációjára utal. Azokban a ganglionokban, melyek a vírusfertőzést követő 12. illetve 31. hétről származtak HSV-1 fehérje kifejeződést nem tudtunk kimutatni, ellenben nagy mennyiségű HSV-1 LAT RNS kifejeződést figyeltünk meg. Míg a kontroll egerekből származó ganglionok hematoxylin-eosin festett metszetein heveny vagy idült gyulladást nem tudtunk megfigyelni, addig a HSV-1 fertőzést követően 1, 12 és 31 héttel gyulladással járó válasz jeleit

láttuk. Mind a heveny, mind a látens HSV-1 fertőzés gyulladásoos reakciót váltott ki a vizsgált egerek idegdúcaiban.

2. Az idegsejt átlagos átmérő, az idegsejtmag átlagos átmérő, az idegsejt sűrűség, a ganglion térfogat és a gangliononkénti idegsejt szám változása a kontroll BALB/c egerek trigeminális ganglionjaiban

A vizsgált kontroll (mock-kezelt) egerek ganglionjaiban az idegsejt átlagos átmérő és az idegsejtmag átlagos átmérő lépcsőzetes növekedést mutatott. Amíg a 6 és 17 hetes egerek ganglionjaiból származó mintákban az idegsejt átlagos átmérő és az idegsejtmag átlagos átmérő növekedése nem mutatott jelentős különbséget, addig statisztikailag szignifikáns különbséget figyeltünk meg mind a 6 és 36 hetes ($p < 0.0001$) mind a 17 és 36 hetes ($p < 0.0001$) egerek ganglionjaiból származó minták között, az idegsejt átlagos átmérő és az idegsejtmag átlagos átmérő növekedésére vonatkozóan.

Az idegsejt sűrűség csökkenő, a ganglion térfogat és a gangliononkénti idegsejt szám pedig növekedő tendenciát mutatott a teljes vizsgálati idő alatt a kontroll egerek ganglionjaiban. A 36 hetes kontroll egerek idegdúcaiban mért idegsejt sűrűség szignifikánsan kevesebb volt, mint a 6 hetes kontroll egerekben mért érték ($p = 0.000082$). A vizsgálati időtartam alatti ganglion térfogat növekedés statisztikailag szignifikáns volt (6 és 16 hetes értékek esetében $p = 0.000006$, a 17 és 36 hetes értékek esetében $p = 0.000005$, 6 és 36 hetes értékek esetében $p = 0.0000001$). A vizsgálati időtartam alatti gangliononkénti idegsejt szám növekedése a kontroll egerekben minden esetben statisztikailag szignifikáns volt (6 és 16 hetes értékek esetében $p = 0.00054$, a 17 és 36 hetes értékek esetében $p = 0.000013$, 6 és 36 hetes értékek esetében $p = 0.000001$).

3. BALB/c egerek ganglionjaiban lévő produktív HSV-1 fertőzés összefüggésben áll a megnövekedett idegsejt átlagos átmérővel, idegsejtmag átlagos átmérővel, illetve a csökkent idegsejt sűrűséggel

A produktív HSV-1 fertőzést 1 héttel a vírusfertőzést követően vizsgáltuk BALB/c egerekből származó háromosztatú idegdúcokban. A vírusfertőzött egerekből származó mintákban az idegsejt átlagos átmérő és az idegsejtmag átlagos átmérő nagyobb, míg az átlagos idegsejt sűrűség kisebb értéket mutatott, mint a kontroll (mock-kezelt) egerekből származó minták esetében. Az átlagos ganglion térfogat mért értékei azonosak voltak a

vírusfertőzött egerekből és a kontroll egerekből származó mintákban. Habár az átlagos idegsejt szám a vírus fertőzött egerek ganglionjaiban 8.61%-os csökkenést mutatott a kontroll egerekéhez képest, ez a különbség nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.

4. BALB/c egerek ganglionjaiban lévő látens HSV-1 fertőzés összefüggésben áll a csökkent idegsejt átlagos átmérővel, idegsejtmag átlagos átmérővel, illetve az idegsejt sűrűséggel

A látens HSV-1 fertőzést 12 és 31 héttel a vírusfertőzést követően vizsgáltuk BALB/c egerekből származó háromsztatú idegdúcokban.

Tizenkét hetes vírusfertőzött egerek ganglionjaiban az idegsejt átlagos átmérő, az idegsejtmag átlagos átmérő, az idegsejt sűrűség és a gangliononkénti idegsejt szám is szignifikánsan kisebb értéket mutatott a korban megfelelő kontroll egerek ganglionjaiban mért értékekhez képest. Az átlagos ganglion térfogat tekintetében a vírusfertőzött egerek és a kontroll egerek ganglionjaiban mért értékek közel azonosak voltak, míg a vírusfertőzött egerek ganglionjaiban számolt gangliononkénti átlagos idegsejt szám 12.25%-os, szignifikáns csökkenést mutatott a kontroll egerekéhez képest.

Harmincegy hetes vírusfertőzött egerek ganglionjaiban lévő idegsejt átlagos átmérő, idegsejtmag átlagos átmérő, idegsejt sűrűség és gangliononkénti idegsejt szám is jelentősen kisebb értéket mutatott a korban megfelelő kontroll egerek ganglionjaiban mért értékekhez képest. Az átlagos ganglion térfogat tekintetében a vírusfertőzött egerek és a kontroll egerek ganglionjaiban mért értékek közel azonosak. Azonban – hasonlóan a vírusfertőzést követő 12. heti eredményhez – a vírusfertőzés után 31 héttel az egerek ganglionjaiban számolt gangliononkénti átlagos idegsejt szám jelentős, 17.9%-os csökkenést mutatott a kontroll egerek ganglionjaiban számolt értékekhez képest.

Az idegsejt átlagos átmérőben, az idegsejtmag átlagos átmérőben, az idegsejt sűrűségben és a gangliononkénti idegsejt számban észlelt csökkenés mértéke sokkal kifejezettebb a vírusfertőzést követő 31. héten, mint a vírusfertőzést követő 12. héten. Mivel csupán látens HSV-1 fertőzés áll fent a vírusfertőzést követő 12. és 31. héten, ezért az ezen időpontok között észlelt előrehaladó csökkenés a neuronok számában, sűrűségében és méretében megfelel a látens HSV-1 fertőzés közben kialakult idült, előrehaladó idegsejt károsodásnak.

A HSV-1 látenciája tumorsejtekben és az extracelluláris mátrix hatása a látensen fertőzött tumorsejtekre

1. Uveális melanoma sejtek pusztulása HSV-1 fertőzés hatására 2D és 3D környezetben különböző képet mutat

C918 és OCM1 uveális melanoma sejttenyészeteket fertőztünk meg vad típusú (wt) HSV-1 (KOS) (M.O.I. 0.5) vagy egy genetikailag módosított HSV-1 törzssel (HSV-1 K26GFP) (M.O.I 0.5) extracelluláris mátrix jelenlétében (3D), illetve annak hiányában (2D). A sejt kultúrákat a vírusfertőzést követően 4 héten keresztül kísértük figyelemmel invertált fluoreszcens mikroszkóp segítségével az előforduló vírus replikációra utaló citopátiás hatásokat. A vírusfertőzést követően pár napon belül mind a C918, mind az OCM1 2D sejtek teljes mértékben elpusztultak, túlélő sejtet nem találtunk a sejttenyészetekben. A K26GFP törzssel fertőzött 2D sejt kultúrákban a daganatsejtek 20–50%-a mutatott GFP kifejeződést a vírusfertőzés után 1 nappal, majd ezt követően 4-5 nap múlva a sejttenyészetek teljes, a vírus replikáció által kiváltott pusztulását megfigyeltük meg. Ezzel ellentétben a 3D C918 és OCM1 sejtek vírusfertőzést követően késleltetett és nem teljes mértékű pusztulását figyeltük meg, mind az OCM1, mind a C918 sejtek egy része túlélte a vírusfertőzést a 3D környezetben.

A 3D környezetben lévő OCM1 sejtek esetében a Matrigel felszínén aggregátumokat képező sejtek a vírusfertőzést követő első napon széleskörű GFP-pozitivitást mutattak, majd a vírusfertőzést követő nyolcadik napon a sejtek teljes mértékben elpusztultak. Ezzel ellentétben a Matrigel mátrix belsejébe benövő önálló sejtek között találtunk számos élő, GFP-negatív sejtet, melyek túléltek a teljes 4 hetes vizsgálati időtartamot. Azok a sejtek, melyek a Matrigel belsejében vagy a Matrigel alján többsejtű gömböcskéket (szferoidokat) képeztek, illetve azok a Matrigel felszínén lévő sejt aggregátumok, melyek belemerültek a Matrigel mátrixba jelentős ellenállást (rezisztenciát) mutattak a vírusfertőzéssel szemben a teljes 4 hetes vizsgálati időtartam alatt.

A 3D környezetben lévő C918 sejtek esetében a Matrigel felszínén egy rétegben növekvő sejtek a vírusfertőzést követő első napon széleskörű GFP-pozitivitást mutattak, majd a vírusfertőzést követő kilencedik napon a sejtek teljes mértékben elpusztultak. Ezzel szemben azok a sejtek, melyek a Matrigel felszínén érkező utánzó mintázatot mutattak nagy számban tartalmaztak GFP-negatív sejtet, melyek túléltek a négy hetes vizsgálati időtartamot. Hasonló jelenséget tapasztaltunk azon sejtek esetében, melyek önállóan foglalták

el a Matrigel mátrix belsejét, a négyhetes vizsgálati idő alatt közöttük számos élő, GFP-negatív sejtet figyeltünk meg.

2. A Matrigel gátolja HSV-1 terjedését

A továbbiakban kíváncsiak voltunk arra, vajon a Matrigel szerepet játszik-e a HSV-1 terjedés gátlásában és ezáltal a 3D környezetben megfigyelt GFP-negatív tumorsejtek túlélésében. A HSV-1 Matrigel-en keresztüli terjedésének vizsgálatához, sejttenyésztő edényekben lévő OCM1 és C918 sejtek egyrétegű sejttenyésztő Matrigel vékony rétegével fedtük le, majd ezt követően a Matrigel felszínére HSV-1 K26GFP-t helyeztünk. Kontrollként egyrétegű, Matrigel nélküli OCM1 és C918 sejttenyésztőket fertőztünk meg azonos mennyiségű vírussal. 18–24 órával a vírusfertőzés után Matrigel nélküli sejttenyésztők kiterjedt GFP kifejeződést mutattak és néhány napon belül teljesen elpusztultak. Ezzel szemben a Matrigel-lel fedett sejttenyésztők vírusfertőzés után életképesnek mutatkoztak és folyamatosan növekedtek GFP kifejeződés nélkül a kéthetes megfigyelési időszak alatt. Mindezen eredmények igazolták a Matrigel HSV-1 terjedését gátló hatását.

3. Az extracelluláris mátrix szerepet játszik a HSV-1 replikáció gátlásában a HSV-1 vírus tumorsejtekbe jutása után

Továbbiakban azt szeretnénk volna megtudni, hogy a HSV-1 tumorsejtekbe való bejutása utáni replikációjának gátlása felelős-e a 3D környezetben néhány tumorsejten megfigyelt virális replikáció hiányáért (GFP-negatív sejtek). Ennek eldöntésére az OCM1 és a C918 sejteket 2D környezetben megfertőztük HSV-1 K26GFP vírussal, majd ezután a fertőzött sejteket újból kiültettük 2D és 3D körülmények között sejttenyésztő edényekbe. A kontrollként használt, mock-fertőzött OCM1 and C918 sejtek újraszélesztése után mind 2D mind 3D körülmények között a tumorsejtek normális növekedést mutattak GFP kifejeződése nélkül.

A 2D körülmények között lévő, előzetesen HSV-1 K26GFP vírussal megfertőzött OCM1 és C918 sejtek a vírus replikáció következtében az újbóli kiültetést követő pár napon belül teljesen elpusztultak. A vírusfertőzés után 18 órával az OCM1 sejtek $29.53 \pm 15.01\%$ -a, míg a C918 sejtek $40.33 \pm 15.17\%$ -a mutatta a vírus replikáció jelét, azaz a GFP-pozitivitást. Teljes mértékű GFP-pozitivitást az OCM1 sejtek esetében a vírusfertőzést követő 72 óránál, míg a C918 sejtek esetében 96 óránál tapasztaltunk.

A 3D körülmények között lévő, előzetesen HSV-1 K26GFP vírussal megfertőzött OCM1 és C918 sejtek az újbóli kiültetés után először a Matrigel-ben magányosan elhelyezkedő sejtekből álltak. Mind az OCM1 mind a C918 sejteknek több mint a fele morfológiai változáson ment keresztül az újbóli kiültetést követő első napon, úgymint a sejtek egy része elkerekedett, másik része pedig az apoptózis morfológiai jeleit mutatta.

A vírusfertőzést követően 18 órával az OCM1 sejtek $2.80 \pm 2.75\%$ -a, míg a C918 sejtek $2.22 \pm 3.05\%$ -a mutatott GFP-pozitivitást a vizsgált 3D sejt kultúrákban. Ez az arány jóval kisebb volt, mint ahogy az várható lett volna a bevitt vírus mennyisége alapján. Mindezen eredmények igazolják azon feltevésünket, miszerint az extracelluláris mátrix hozzájárulhat a HSV-1 replikációjának gátlásához miután a vírus bejutott a tumorsejtekbe.

5. MEGBESZÉLÉS

A herpesz vírusok általános biológiai jellemzője az a képesség, hogy az elsődleges fertőzést követően élethosszig tartó lappangó fertőzést képesek fenntartani a gazdaszervezetben annak működőképes immunrendszere ellenére is. Ezt a jelenséget hívjuk a herpesz vírusok látenciájának.

Első modellrendszerünkben morfometriai vizsgálatokat végeztünk annak eldöntésére, hogy vajon a látens HSV-1 fertőzés befolyásolja-e az idegsejt átlagos átmérőt, az idegsejtmag átmérőt, az idegsejt sűrűséget és idegsejt számot az BALB/c egerek háromosztatú idegdúcaiban. Alapos morfometriai vizsgálatok segítségével kimutattuk, hogy egészséges, felnőtt BALB/c egerekben az idegsejt átlagos átmérő, az idegsejtmag átmérő, a ganglion térfogat és a gangliononkénti idegsejt szám lépcsőzetesen emelkedik az életkor 6. és 37. hete között. Ezen eredmények nem meglepőek, hiszen hasonló következtetésre jutottunk, mint több más kutatócsoport, melyek felnőtt, egészséges patkányok érző idegdúcait vizsgálták. Jól ismert, hogy egészséges immunrendszerű egerek szaruhártyán keresztüli HSV-1 fertőzése után az egerek háromosztatú idegdúcaiban vírus replikáció figyelhető meg körülbelül két héttel, mely után a ganglionokban élethosszig tartó HSV-1 látencia alakul ki. Az általunk kapott eredmények összhangban vannak ezekkel az előzetes eredményekkel, úgymint egy héttel a HSV-1 fertőzés után produktív vírusfertőzés, 12 és 31 héttel a vírusfertőzést követően pedig látens vírusfertőzés bizonyítékait találtuk meg az egerek ganglionjaiban. Egy hetes vírusfertőzött egerekből származó háromosztatú idegdúcokban az idegsejt átlagos átmérő és az idegsejtmag átlagos átmérő emelkedett, míg az idegsejt sűrűség és a gangliononkénti

idegsejt szám csökkent összehasonlítva a korban megegyező mock-fertőzött kontroll csoporttal. Ezen eredményeink jól magyarázhatóak a szakirodalomban leírtakkal, miszerint egerek HSV-1 fertőzését követő első hétben az idegsejtek pusztulása figyelhető meg, ez a jelenség magyarázatul szolgálhat az általunk tapasztalt idegsejt szám csökkenésre.

Vizsgálataink egyik legfontosabb észrevétele, hogy a vizsgált BALB/c egerek háromosztatú idegdúcaiban a HSV-1 vírusfertőzést követően a 12. és a 31. héten (az életkor 17. és 36. hetében) az idegsejt átlagos átmérő, az idegsejtmag átmérő, az idegsejt sűrűség és a gangliononkénti idegsejt szám jelentősen kisebb volt összehasonlítva az életkorban megegyező, mock-fertőzött, kontroll csoporttal. Megállapítottuk, hogy a látens fertőzött egerek ganglionjaiban tapasztalt csökkenés az idegsejt átmérőben, az idegsejtmag átmérőben, az idegsejt sűrűségében és az idegsejt számban sokkal nagyobb mértékű az életkor 36. mint a 17. hetében. Továbbá a látens fertőzött egerekből származó trigeminális ganglionokban az idegsejt átlagos átmérő, az idegsejtmag átlagos átmérő és a gangliononkénti átlagos idegsejt szám jelentősen növekedett az életkor 17. és 36. hetei között, a korban megegyező mock-fertőzött, kontroll csoport egereihez képest. Azonban a látens fertőzött egerek ganglionjaiban mért idegsejt átlagos átmérő, az idegsejtmag átlagos átmérő és a gangliononkénti átlagos idegsejt szám növekedése enyhébb mértékű volt, mint amit a mock-fertőzött, kontroll csoport egereinek esetében tapasztaltunk.

Mindezen eredmények azt mutatják, hogy a látens HSV-1 fertőzés kapcsolatban áll az idegsejtek méretében, sűrűségében és számában létrejövő idült és fokozódó veszteséggel az ép immunrendszerű, egészséges egerekben. Azonban vizsgálatainkból nem derül ki, hogy milyen folyamatok állhatnak a látens HSV-1 fertőzés hatására kialakult idült és fokozódó idegsejt méret, idegsejt sűrűség és idegsejt szám csökkenés mögött. Spontán HSV-1 reaktiváció – ha ritkán is – előfordul látens fertőzött egerekben, ezért lehetséges, hogy a neuronok méretének és számának változásaiban reaktivációs folyamatok is közreműködnek. Továbbá a látencia alatt megfigyelhető állandó, idült gyulladás okozhat idegsejt károsodást, feltehetően a közvetített citokineknek és oxidatív stressznek köszönhetően. Eredményeink azt sugallják, hogy BALB/c egerekben a HSV-1 látens fertőzés alatt tapasztalt idegsejt károsodás összefüggésben van a háromosztatú idegdúcokban lévő idült gyulladás mértékével. Ezen gyulladási folyamatok károsíthatják részben az érett idegsejteket illetve gátolhatják az új idegsejtek folyamatban lévő képződését és érését az idegdúcokban.

Bár a kísérletes HSV-1 fertőzés heveny szakaszát túlélő egerek nem mutatják az agyvelőgyulladás tüneteit, azonban számos tanulmány számol be arról, hogy ezek az egerek idült viselkedésbeli zavaroktól, illetve idült fájdalomtól szenvednek. Munkánk során a

vizsgálatainkban résztvevő egereket napi rendszerességgel figyeltük meg, agyvelőgyulladás tüneteit és jeleit keresve, de részletes ideggyógyászati és viselkedésbeli megfigyeléseket nem végeztünk. További kísérletek szükségesek annak eldöntésére, hogy az általunk leirt, HSV-1 látens fertőzést követő kóros és előrehaladó elváltozások okoznak-e előrehaladó idegrendszeri vagy viselkedésbeli változásokat egerekben. Ezek a vizsgálatok kiváló kísérleti alapot biztosítanak arra, hogy a HSV-1 által kiváltott idült idegrendszeri megbetegedések folyamatait tovább elemezzük. A látens HSV-1 fertőzés által kiváltott idült idegrendszeri megbetegedésekre való genetikai fogékonyság vizsgálatának központi szerepet kellene kapnia az eljövendő vizsgálatokban, mivel a genetikai fogékonyság szerepe az emberben visszatérően felvetődik a HSV-1 által kiváltott idült idegrendszeri megbetegedésekben. Az ilyen új megfigyelések segíthetnek abban, hogy szélesebb betekintést nyerjünk azokba a folyamatokba, melyeken keresztül a látens HSV-1 vírusfertőzés közreműködik az idült ideggyógyászati betegségek kóroktanában, illetve támogathatják új vírus specifikus kezelések kifejlesztését.

Második modellrendszerünkben arra kerestük a választ, hogy vajon 3D környezetben növő, eltérő morfológiájú tumorsejt-tenyészetek alkalmasak-e HSV-1 fertőzéssel szemben ellenálló sejtpopulációk meghatározására, illetve tanulmányozásukkal szerettünk volna többet megtudni a tumorsejtek extracelluláris mátrix által közvetített HSV-1 onkolitikus terápiával szembeni ellenállásának mechanizmusairól. Munkacsoportunk első alkalommal mutatta ki, hogy azok a tumorsejtek, melyek 3D körülmények között a Matrigel mátrixában többsejtű gömböcskéket (szferoidokat) vagy érképződést utánzó struktúrákat képeznek, valamint, melyek képesek egyenként betörni az extracelluláris mátrixba, fokozott ellenállással rendelkeznek HSV-1 vírussal szemben. További vizsgálataink azt mutatták, hogy az általunk vizsgált tumorsejtek HSV-1 vírusfertőzéssel szembeni fokozott ellenállásában szerepet játszik a HSV-1 vírus extracelluláris mátrixban való akadályozott terjedése, valamint az, hogy az extracelluláris mátrixnak magának vírus replikáció gátló hatása van. Megfigyeléseink arra engednek következtetni, hogy a HSV-1 képes létrehozni látens fertőzést a többsejtes gömböcskében (szferoidokban) elhelyezkedő néhány tumorsejtben, és ez a látens állapot képes produktív vírusfertőzéssé alakulni, amennyiben egy-egy tumorsejt belenő az extracelluláris mátrixba.

Közismert hogy, a 3D tumorsejt-tenyészetek igen jól alkalmazhatók különböző tumor ellenes gyógyszerek citotoxikus hatásának elemzésére preklinikai vizsgálatokban. Az ugyanazon daganaton belüli különböző sejttípusok is különböző érzékenységek a terápiás gyógyszerekre, illetve besugárzásra *in vivo* és 3D sejttenyészetekben. Előzetes tanulmányok

kimutatták, hogy a 3D környezetben növesztett tumorsejtek sokkal ellenállóbbak a virális onkoterápiával szemben, beleértve a HSV-1 és adenovírusok által közvetített onkolitikus terápiákat, mint azok a daganatsejtek, melyek 2D környezetben tenyésznek. Eredményeink megerősítik ezeket a korábbi észleléseket, ezen felül munkacsoportunknak sikerült azonosítani morfológiailag különböző tumorsejt szubpopulációkat 3D tenyészetekben, melyek fokozott ellenállással rendelkeznek a virális onkolitikus terápiával szemben. Elméleti megfontolások illetve kísérleti megfigyelések messzemenően igazolják, hogy a tumorsejtek HSV-1 terápiával szembeni ellenállása mögött több mechanizmus is áll. Ezen folyamatok magukba foglalják az extracelluláris mátrix által gátolt daganaton belüli vírusterjedést, a vírusok tumorsejtekbe való csökkentett bejutását, mely a HSV-1 receptorok csökkent kifejeződésének köszönhető. Az említetteken kívül fontos még a vírus tumorsejtekbe való bejutását követő vírus replikáció gátlása, illetve a vírus eliminálása a gazdaszervezet immunrendszere által. Jelen kísérletünk során megállapítottuk, hogy a fenti elméleti folyamatok közül legalább kettő – az extracelluláris mátrix által gátolt daganaton belüli vírusterjedés, illetve a vírus tumorsejtekbe való bejutását követő replikáció gátlása - szintén fontos szerepet játszik a 3D tumorsejt-tenyészetekben is.

A HSV-1 által kiváltott onkolízis fokozható a fibrilláris kollagének lebontásával, ami az extracelluláris mátrix jelentős szerepére utal a kezelés hatékonyságában. Kísérleteink során azt találtuk, hogy a lamininban gazdag Matrigel gátolja a HSV-1 terjedését. Fontos megjegyezni azonban, hogy a HSV-1 meg tudott fertőzni, majd replikálódott néhány olyan tumorsejtben is, melyek betörték az extracelluláris mátrixba. Mindezen megfigyeléseink arra utalnak, hogy a HSV-1 képes keresztüljutni a Matrigelen, amennyiben az extracelluláris mátrixban infiltratív daganatsejtek vannak jelen.

Kísérleteink során azt is megállapítottuk, hogy a HSV-1 látens fertőzést tudott létrehozni néhány 3D körülmények között növekvő tumorsejtben. Amikor 2D körülmények között növekvő OCM1 és C918 sejteket HSV-1 vírussal való fertőzés után kiszélesztettük Matrigelbe, a fertőzött sejteknek csak egy kis része mutatta a vírus replikáció jeleit (GFP kifejeződés). Ezen a megfigyelésünk arra utal, hogy a vírus replikációs ciklusa a daganatsejtekbe való bejutás utáni lépésben gátlódott a fertőzött tumorsejtek többségében. A vírussal fertőzött OCM1 sejtek következményes növekedése 3D körülmények között többsejtű gömböcskék (szferoidok) képződéséhez vezetett, melyek nagy többsége GFP negatív maradt a négy hetes megfigyelési időszak alatt. Azonban ha magányos tumorsejtek nőttek ki a gömböcskékből a Matrigel irányába, az infiltráló sejtekben, illetve a gömböcskében gyakran GFP kifejeződés jelentkezett. Mivel a Matrigel gátolja a vírus

terjedését, a GFP kifejeződése a többsejtű gömböcskékben a HSV-1 reaktivációjára utalhat. Jól ismert, hogy a HSV-1 képes látens fertőzést létrehozni nem neuronális sejtekben is, ha a virális replikációs ciklust röviddel a vírus gazdasejtbe való bejutása után blokkolják. Azonban az extracelluláris mátrix által kiváltott, tumorsejtekben létrejött látencia, majd a tumorsejtek morfológiai/növekedési mintázatának megváltozásával összefüggésben lévő, és azt követő reaktiváció és virális replikáció még nem került közlésre. Megfigyeléseink új információkat szolgáltatnak a 3D sejt kultúráinkban létrejövő egyedi tumorsejt alpopulációkban létrejövő virális ellenállásról, illetve az extracelluláris mátrix által kiváltott, tumorsejtekben létrejövő virális rezisztenciáról.

Összegzésképpen elmondhatjuk, hogy a HSV-1 kóroktanában résztvevő bonyolult és összetett folyamatok megértésének jobb megismeréséhez a sejt kultúrában végzett vizsgálatok és az állat modellek egyaránt fontosak. A megbeszélésből is világossá válik, hogy számos fent említett téma további mélyreható vizsgálatokat igényel a látenciával összefüggésben, mely jövőbeli kutatásokkal tovább szélesíthetjük jelenlegi tudásunkat és jobban megalapozhatjuk a betegellátás fejlesztésére irányuló lehetőségeinket.

Köszönetnyilvánítás

Hálás vagyok Dr. Vályi-Nagy Tibornak, MD, PhD és Dr. Endrész Valériának PhD támogatásukért és a tudományos munkában nyújtott segítségükért. Szeretném köszönetemet kifejezni a Rosztóczy Alapítványnak és a Szegedi Tudományegyetem Pathológiai Intézetének azért a kiváló lehetőségért, hogy az University of Illinois at Chicago Pathológiai Intézetében dolgozhattam. Külön köszönet illeti meg feleségemet, Dr. Bacsa Saroltát, PhD, akinek támogatása és segítsége nélkül ez a munka nem készült volna el.

Társszerzői nyilatkozat

A doktorjelölt neve: Dr. Dósa Sándor

Alulírott Dr. Vályi-Nagy Tibor felelős szerzőként hozzájárulok, hogy fent nevezett Dr. Dósa Sándor felhasználja Valyi-Nagy K, **Dósa S**, Kovacs SK, Bacsa S, Voros A, Shukla D, Folberg R, Valyi-Nagy T. (2011): Identification of virus resistant tumor cell subpopulations in three-dimensional uveal melanoma cultures. Cancer Gene Ther., 17(4):223-234. közleményünkben foglalt eredményeinket a Szegedi Tudományegyetem Interdiszciplináris Doktori Iskola keretében a PhD fokozat eléréseért benyújtott dolgozatában, és egyúttal kijelentem, hogy ezeket az eredményeket nem használtam fel tudományos fokozat megszerzésekor, s ezt a jövőben sem teszem. A szóban forgó közleményben a jelölt szerepe meghatározó fontosságú.

Közlemény címe:	Identification of virus resistant tumor cell subpopulations in three-dimensional uveal melanoma cultures.
Szerzők:	Valyi-Nagy K, Dósa S , Kovacs SK, Bacsa S, Voros A, Shukla D, Folberg R, Valyi-Nagy T.
Folyóirat, év, kötet, oldaltól /-ig	Cancer Gene Ther., (2010), 17(4):223-234


.....
Dr. Vályi-Nagy Tibor

Kelt: Chicago, 2014. év 01 hó 17 nap