

# **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, T<sup>1</sup>  
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, J<sup>2</sup>  
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

---

<sup>1</sup> Kavouras JH and Prandovszky E equally contributed to this work

<sup>2</sup> 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  $\alpha$ -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, áttérjedhet 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 vesztéshez. 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 O<sub>2</sub> 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, számarban 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 megszámoztuk 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 $\mu$ M végkoncentráció, fenolredmentes tápoldatban oldva), amely fluoreszcensé válik ROS jelenlétében. A lemezeket 37°C-on 5%-os CO<sub>2</sub> 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 vírusfertőzést megelőzően 5 illetve 50 $\mu$ M HNE-vel kezeltük 0,5h illetve 1h órán át alacsony szérum tartalmú 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 vírusfertőzést megelőzően, majd a vírusfertőzést követően 24h óráig tettük ki 0, 5, 10, 25 $\mu$ M végkoncentrációjú antioxidáns kezelésnek 37°C-on. Ezt követően a felülúszót a plaque assay elvégzéséig -80°C-on tároltuk.

## 9.) Sejt-fúziós $\beta$ -galaktozidáz riporter assay

A vad típusú kínai hörcsög petefészek sejteket (CHO-K1) két populációra osztottuk. Az akceptor sejteket necln-1 plazmiddal és a  $\beta$ -galaktozidáz gén  $\omega$  peptidjével transzfektáltuk, míg az effektor sejtekbe a  $\beta$ -galaktozidáz gén  $\alpha$  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 lemezre helyeztük, és 37°C-on inkubáltuk. Az összekeverést követően a sejteket 0.5% Nonidet P-40-nel lizáltuk, majd klorofenol red- $\beta$ -D galaktopyranosid (*Roche*) adásával a  $\beta$ -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 $\gamma$ 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 $\mu$ 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 kontroltól. 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 $\mu$ 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 $\mu$ M ebselen kezelés közel hasonló eredményt mutatott. Legjelentősebb hatása a 25  $\mu$ M ebselen kezelésnek volt, mely 0,95%-ra szorította vissza a vírusreplikáció mértékét a kezeletlen kontrolhoz 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.  $\beta$ -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 térbeni 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-hydroxi-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 jelenlévő HNE hogyan hat a vírusfertőzésre. Érdekes módodon, azt kaptuk, hogy differenciált idegsejtek környezetében kis koncentrációban jelenlévő 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 büszkéek voltatok rám. És nem utolsó sorban nektek, Marcsi, Rita, Dóri, Andi., kedves barátok, akikre mindig számíthattam Nélkületek, ezt nem tudtam volna véghez vinni.