

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**HUMÁN IMMUNDEFICIENCIA VÍRUS 1. TÍPUSA ÉS A
HUMÁN HERPESZVÍRUS 6 KÖLCSÖNHATÁSÁNAK *IN*
VITRO VIZSGÁLATA**

Csoma Eszter

Témavezetők: Dr. D. Tóth Ferenc

Dr. Gergely Lajos

Debreceni Egyetem

Általános Orvostudományi Kar

Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Orvosi Mikrobiológiai Intézet

2006

BEVEZETÉS

A humán herpeszvírus 6 (HHV-6), mely gyakran reaktiválódik a humán immundeficiencia vírus 1. típusával (HIV-1) fertőzött betegekben, a HIV-1-gyel kölcsönhatásba lépve befolyásolhatja annak szaporodását, ezért az AIDS progresszió igen fontos tényezője lehet. A két vírus kapcsolatát *in vitro* már több sejttípusban tanulmányozták, ám a HIV-1 vertikális átvitelében kulcsszerepet betöltő syncytiotrophoblast (ST) sejtekben, illetve a macrohagokban az interakció még nem kellően tisztázott.

Napjainkban a HIV-1 anyáról gyermekére történő átvitele a vírus terjedésének egyik jelentős problémájává vált. A méhen belüli fertőzés fontos módja a HIV-1 vertikális átvitelének. A méhlepény ST sejtjei barriert képeznek a magzat és az anya közt, hiszen ez a folyamatos, sokmagvú epithelium áll közvetlen kapcsolatban az anyai vérrel. A vírusnak ezen a rétegen kell áthatolnia ahhoz, hogy elérje és megfertőzze a magzati sejteket. Azt, hogy a HIV-1 képes megfertőzni az ST-okat már több vizsgálat igazolta: egyrészt *in situ* HIV-1 specifikus provirális DNS-t mutattak ki bennük, másrészt *in vitro* sikerült sejtmentes víruspartikulumokkal megfertőzni az ST sejteket. Ezekben az *in vitro* fertőzött sejtekben azonban a HIV-1 replikációs ciklusa általában abortív, fertőzőképes virionok nem vagy igen kis mennyiségben ürülnek. Azt, hogy a ST-ok *in vivo* produktív fertőzése meghatározott feltételek mellett végbemehet, klinikai vizsgálatok is igazolják: a méhlepény trophoblast sejtjeiben HIV-1-specifikus p24 antigén mutatható ki. Feltételezhető, hogy a HIV-1 szaporodását, így a vírus transzplacentális átvitelét számos tényező befolyásolhatja.

ST sejtekben a HIV-1 replikáció stimulálásának egyik lehetséges módja a HHV-6-tal történő koinfekció. A HHV-6 rendkívül elterjedt vírus, a primer fertőzés után látens állapotban a szervezetben marad, a szeropozitivitás átlagos felnőtt populációban meghaladja a 90 %-ot. A HHV-6 – az esetek többségében a vírus A variánsa (HHV-6A) – már a HIV-1-fertőzés korai stádiumában reaktiválódhat. A terhesség alatti reaktiváció szintén igen gyakori, ekkor a vírus a placentát is megfertőzheti. Bizonyos tanulmányok szerint a HHV-6 a CD4 gént aktiválva, fokozhatja a HIV-1-gyel szemben fogékony sejtek számát. Ugyanakkor a HHV-6, részint transzaktiváló géntermékeivel a HIV-1 LTR-re (long terminal repeat) hatva aktiválhatja a látens HIV-1 fertőzést, fokozhatja a replikációt. Bár a HHV-6 transzplacentális átvitele nem túl gyakori, mintegy 1-1,6 %, HIV-pozitív anyákban mégis fontos tényező lehet a HIV-1 méhlepényen keresztüli átvitelében.

Epidemiológiai vizsgálatok szerint a magzat fertőződése a terhességnek vagy a korai, vagy a késői fázisában történik. Feltételezések szerint azonban inkább az utóbbinak van

nagyobb szerepe a transzplacentális átvitelben. Ezért szülésből származó méhlepényből szeparáltunk cytotrophoblast sejteket, és az ezekből kialakított ST sejtekben vizsgáltuk a HIV-1 és a HHV-6A kölcsönhatását.

A monocyta/macrophag vonal sejtjei nemcsak az aktív HHV-6 fertőzés fontos célsejtjei, hanem egyben a látencia egyik fontos színhelyei is. A macrophagok a HIV-1 fertőzésben is rendkívül fontos szerepet töltenek be, hiszen célsejtek és reservoirok a vírus számára, illetve migrációs képességük miatt igen jelentősek a vírus szervezetben belüli disszeminációjában és a patogenezisben. Klinikai vizsgálatok szerint a fertőzés leggyakrabban R5 variánsokkal történik, ezek dominálnak a HIV-1-fertőzés kezdeti, tünetmentes fázisában, ugyanakkor a betegség egész ideje alatt jelen vannak a fertőzött egyén szervezetében. A betegség előrehaladtával azonban a HIV-1-fertőzöttekben megjelennek az X4 variánsok, és ezek dominanciája mindenképpen a betegség rossz prognózisát jelenti. A macrophagok elsősorban a HIV-1 R5 variánsaira fogékonyak, melyek CCR5 kemokin koreceptorhoz kötődve képesek a sejtbe bejutni. A receptor érzékenységét, sejt felszíni expresszióját, így a sejtek HIV-1 iránti érzékenységét számos tényező befolyásolhatja. Kulcsfontosságú szerephez jutnak ebben a különböző kemokinek, melyek ezen receptorok természetes agonistáiként a receptorhoz való kötődésért versengve akadályozhatják a víruspartikulumok sejtbe való bejutását. Emellett a kemokinreceptorok működését ligandjaik kötődése szabályozza. A kemokin-receptor kapcsolat olyan kaszkádrendszert kapcsol be, amely nemcsak a kölcsönhatásban résztvevő receptor érzékenységének elvesztéséhez és internalizációjához, de heterológ módon más kemokin receptorok működésének, expressziójának megváltozásához is vezethet. Különböző sejt típusokban (CD4+ T-lymphocytákban, perifériás vér mononuclearis sejteiben, dendritikus sejtekben és *ex vivo* lymphoid szövetekben) már kimutatták, hogy a HHV-6 képes a HIV-1 replikációját szuppresszálni, és ebben feltételezések szerint különböző szolubilis anyagoknak lehet szerepe.

Annak ellenére, hogy a macrophagok mind a HHV-6, mind a HIV-1 fertőzésben kulcsfontosságúak, a két vírus kölcsönhatását ezekben a sejtekben még nem tanulmányozták részletesen.

CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során a következő kérdésekre kerestünk válaszokat:

1. Fertőzhetőek-e az ST sejtek HHV-6A-val?
2. A HHV-6A-val és HIV-1-gyel történő kettős fertőzés befolyásolja-e a két vírus replikációját ST sejtekben?
3. Amennyiben igen, milyen módon?
4. HHV-6A-val és HIV-1-gyel történő kettős fertőzés befolyásolja-e a két vírus szaporodását macrophagokban?
5. Ha igen, milyen módon?
6. A fertőzések hatására megváltozik-e a macropagok kemokintermelése?
7. Amennyiben igen, milyen hatással van ez a vírusok szaporodására?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Cytotrophoblast sejtek szeparálása és tenyésztése

Kísérleteinkhez a cytotrophoblast sejteket immunmágneses technikával normál szülésből származó placentákból szeparáltunk. A sejteket 2 mM glutaminnal és 15 % magzati borjúsavóval (FBS) komplettált KGM (keratinocyte growth medium) tápfolyadékban tenyésztettük. Mivel a KGM tápfolyadék olyan komponenseket (epidermális növekedési faktort, agyalapi mirigy kivonatot) is tartalmazott, melyek a cytotrophoblastok differenciálódását indukálják, a kultúrákban sejtfúziós folyamatok zajlottak le, a sejtek kiszélesztését követő 5. napon a tenyészeteket sokmagvú óriássejtek (syncytiotrophoblastok) alkották. A kísérletek során ezeket az 5 napos ST kultúrákat használtuk.

A monocyta/macrophagok szeparálása és tenyésztése

A vírusok szaporításához a monocyták szeparálása perifériás vérből adherenciával történt. Egészséges véradók perifériás vérének mononukleáris sejtjeit (PBMC) Ficoll-Hypaque sűrűséggrádiens centrifugálással nyertük ki „buffy coat” preparátumokból. A sejteket 2 mM glutamint, 20 % FBS-t és antibiotikumokat tartalmazó RPMI tápfolyadékban vettük fel és tenyésztőpalackba szélesztettük. Egy órás inkubálást (37 °C) követően eltávolítottuk a le nem tapadt sejteket. A letapadt sejtekre friss tápfolyadékot adtunk.

Kísérleteinkhez a monocyták szeparálása Monocyta Negatív Izoláló Kittel történt a gyártó utasításai alapján. A monocytákat 2 mM glutamint, 20 % FBS-t, illetve antibiotikumokat tartalmazó RPMI tápfolyadékban vettük fel.

Vírustermeléshez és a kísérletekhez 7 napos, monocyta eredetű macrophag kultúrákat használtunk.

Vírusok

A HHV-6A GS törzsét HSB-2 sejtekben szaporítottuk. A sejteket 2 mM glutamint, 10 % FBS-t, illetve antibiotikumokat tartalmazó RPMI médiumban tartottuk fenn. A felülúszókat a sejtörmelékektől megtisztítottuk és ultracentrifugáltuk. Az üledéket friss tápfolyadékban vettük fel a kiindulási térfogathoz képest 20-szorosra koncentrálnak. A víruspreparátumokat felhasználásig -70 °C-on tartottuk.

A HIV-1 R5 variánsának Ada-M és Ba-L törzsét macrophagokban szaporítottuk. Az X4 variáns IIIB törzset H9 sejtekben szaporítottuk. A vírusokat -70 °C-on tároltuk.

Vírusok titrálása

A HHV-6A infekzív titerét HSB-2 monolayereket használva határoztuk meg. A titert fókuszképző egységekben (FFU) adtuk meg.

A szüretelt sejtfeletűszóban a HIV-1 IIIB és Ba-L törzse esetén a titer meghatározásához p24 antigén-ELISA és syncytiumképző vizsgálatot használtunk. Vírus-specifikus p24 antigén mennyiségi meghatározása ELISA kittel, a gyártó utasításai alapján történt. A Ba-L törzs infekzív titerét monocyta eredetű macrophag kultúrán, míg a IIIB törzset CEM-SS sejteken határoztuk meg. A HIV-1 titerét syncytium-képző egységek (SFU) száma alapján 1 ml vírusszuszpenzióra vonatkoztatva adtuk meg. Az Ada-M törzset pedig a virionok reverz transzkriptáz (RT) aktivitásának mértéke alapján titráltuk.

Syncytiotrophoblastok fertőzése HIV-1-gyel, illetve HHV-6A-val

Kísérleteinkhez 5 napos ST kultúrákat fertőztünk. A fertőzés multiplicitása HIV-1 esetén 1 SFU/sejt, míg HHV-6A esetén 1 FFU/ml volt, melyet a kiszélesztett cytotrophoblastok számának megfelelően állapítottunk meg. A vírusszuszpenzióval a sejteket 1 órán át inkubáltuk 37 °C-on. Kettős fertőzés során az 5 napos ST sejteket vagy szimultán fertőztük HIV-1-gyel és HHV-6-tal, vagy az egyik vírussal történő fertőzést a másikkal való infekció 3 nap múlva követte. A fertőzést az előzőekben leírtak szerint végeztük.

A macrophagkultúrák fertőzése

A kísérletekhez 7 napos, monocyta eredetű macrophagkultúrákat fertőztünk. A fertőzés multiplicitása a HHV-6A esetében 1 FFU/sejt volt, míg HIV-1-ből 15000 cpm/100 µl vírust adtunk a kultúrákhoz. A vírusokkal 2 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk a sejteket.

A kettős fertőzések szimultán módon történtek az előbbieken leírtak szerint.

Immunszérumok és konjugátumok

A HHV-6A 37-kDa korai (early, E) és p135, illetve p150 késői (late, L) antigének ellen, a macrophagokon expresszáldó CCR5 ellen, a monocyta-specifikus sejt felszíni CD14 marker ellen egér monoklonális ellenanyagokat (MAb) használtunk. A HIV-1 Tat és p24 antigénekre specifikus poliklonális ellenanyagokat, nyúlban termelték. Az anti-CD4, anti-CXCR4, anti-CCR5 és anti-CCR3 MAb-ok szintén egérből származtak.

ST sejtek esetén fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelzett, nyúlban termelt, anti-egér és sertésben termelt, anti-nyúl immunglobulint (Ig), illetve TRITC-cel (tetrametilrodamin-

izotiocianát) jelzett, kecske, anti-egér Ig konjugátumot használtunk. Macrophagok esetében szekunder ellenanyagként FITC-cel konjugált, Fc specifikus, kecskében termelt, anti-egér Ig-t alkalmaztunk.

Immunfluoreszcens technikák

A virális fehérjék expresszióját indirekt citoplazma immunfluoreszcenciával (IFA) mutattuk ki. Ehhez először a vírusfehérjékre specifikus MAb-ot adtuk a sejtekhez, majd a megfelelő szekunder ellenanyagot.

A HHV-6 E antigén és HIV-1 p24 antigén koexpressziójának vizsgálatához kettős, indirekt immunfluoreszcenciás vizsgálatot végeztünk. Ennek kivitelezése során kétféle szekunder konjugátumot használtunk.

A transzfektált ST sejtekben a HHV-6A nagyon korai (IE) fehérjéinek jelenlétét hővel inaktivált (56 °C, 30 perc) és tengerimalac komplementtel telített humán szérummal, illetve FITC-cel konjugált másodlagos ellenanyaggal vizsgáltuk.

A monocyta-specifikus sejtfelszíni marker, a CD14 expresszióját indirekt, membrán IFA-val mutattuk ki.

Polimeráz láncreakció (PCR)

A virális DNS izolálása a sejtekből és a kultúrák tisztított felülúszójából High Pure Viral Nucleic Acid Kittal történt a gyártó utasításai szerint. Vírusspecifikus primerekkel nested PCR-t végeztünk.

Kemokinek mennyiségének meghatározása

Az interleukin-8 (IL-8) és a RANTES ürítés mérése a fertőzött és a fertőzetlen tenyészetek felülúszóiból ELISA kittel történt a gyártó által meghatározott irányelvek szerint.

Transzfekció

Az ST sejteket a HHV-6A IE régiójának nyitott leolvasási kereteit (ORF) kódoló plazmidokkal, lipofectin módszerrel transzfektáltuk. A plazmidok az U16-U17, az U18-U19, az U86, illetve az U89 ORF-et hordozták.

Intracelluláris kalcium mérése

A macrophagokban a RANTES által kiváltott Ca^{2+} mobilizációt kétféle módszerrel vizsgáltuk.

Egyedi, fura-2AM-mel feltöltött sejteken a RANTES hatására bekövetkező intracelluláris kalcium koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) változását inverz fluoreszcens mikroszkóppal mértük. Az excitációs hullámhosszt 340 és 380 nm közt változtattuk egy kettős monokromátor és egy online kapcsolt mikrokomputer segítségével. A fluoreszcens emissziót 510 nm-en detektáltuk 10 Hz/hányados adatvételi gyakorisággal egy fotoelektron-sokszorozó segítségével. Majd számoltuk a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t.

A RANTES által okozott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedést fertőzetlen és HHV-6A-val fertőzött, fura-2AM-mel feltöltött macrophag-populációkban küvettában FluroMax Spectrofluorimeterrel mértük. A 340 és 380 nm-es gerjesztésen mért fluoreszcencia intenzitások arányát (R340/380) hasonlítottuk össze.

Fluorocytometriás vizsgálatok

Fertőzetlen és HHV-6A-val fertőzött macrophagok CCR5 receptor-expresszióját fluorocytometriával vizsgáltuk. Ehhez a sejtek felszínén található CCR5 molekulát membrán IFA-val megjelöltük. A jelölt sejteket 4 % paraformaldehidben fixáltuk. A méréseket FACScan analizátorral és CellQuest Software-rel végeztük.

Statisztikai elemzés

Az adatokat SPSS statisztikai programcsomaggal, t-próba segítségével hasonlítottuk össze.

EREDMÉNYEK

HHV-6A és HIV-1 fertőzőképességének vizsgálata syncytiotrophoblast sejteken

Kísérleteink során először azt kívántuk tisztázni, hogy a HHV-6A képes-e produktívan fertőzni az ST sejteket. Ehhez 5 napos trophoblast kultúrákat fertőztünk HHV-6A-val, majd indirekt citoplazma IFA-val vírusspecifikus antigének jelenlétét vizsgáltuk a fertőzött tenyészetekben. A fertőzést követő 24. órában az ST sejtek magjában megjelent az E antigén, ami a 10. napig volt kimutatható. Azonban sem késői fehérjéket, sem pedig infektív viriont a kísérlet 22 napja alatt nem észleltünk. Nem tudtunk Tat és p24 antigént, illetve fertőzőképes vírust kimutatni azon ST sejtek felülűszójában sem, melyeket HIV-1_{Ba-L}-lal vagy HIV-1_{IIIb}-vel fertőztünk. Az ST sejtek tehát fertőzhetők mind HHV-6A-val, mind pedig HIV-1-gyel, ám a replikációs ciklus egyik esetben sem produktív, infektív virionok nem ürülnek.

HIV-1-gyel és HHV-6A-val történt kettős fertőzés hatása a vírusok replikációjára syncytiotrophoblastokban

A koinfekciós kísérletek során az 5 napos ST sejteket vagy szimultán fertőztük HIV-1-gyel és HHV-6A-val, vagy az egyik vírussal történő fertőzést a másikkal való infekció 3 nap múlva követte. HHV-6A hatására a HIV-1 replikációs ciklusa produktívvá vált, hiszen valamennyi esetben tudtunk p24 antigént kimutatni a kultúrák felülűszójában. A legnagyobb títert abban az esetben értük el, ha a HIV-1-gyel fertőzött kultúrát 3 nap múlva fertőztük felül HHV-6A-val, míg a legkisebbet akkor, ha az előfertőzés a HHV-6A-val történt. Syncytiumképző vizsgálataink szerint valamennyi esetben infektív HIV-1 virionok ürültek.

Ha a kettős fertőzéseket hővel inaktivált HHV-6A-val végeztük, sem infektív HIV-1 virionokat, sem p24 antigént nem tudtunk kimutatni, ezért feltételezhetően aktív HHV-6A expresszió szükséges a HIV-1 szaporodásához.

A szimultán fertőzött koinfekciós kultúrában indirekt IFA-val a HIV-1 Tat fehérjét már a fertőzést követő 32. órában ki tudtuk mutatni, ami arra utal, hogy a HHV-6A valószínűleg a HIV-1 replikációjának korai fázisában fejt ki stimuláló hatását.

Kettős IFA-val a mindkét vírussal fertőzött ST sejtekben a HIV-1 p24 és a HHV-6A korai antigén együttes jelenlétét észleltük.

Ugyanakkor sem HHV-6A L antigént, sem pedig infektív HHV-6A virionokat nem tudtunk kimutatni ezekben a kettősen fertőzött kultúrákban.

Ezen kísérletek alapján a HHV-6A valószínűleg elősegíti a HIV-1 transzplacentális átvitelét, ugyanakkor a HIV-1 nem befolyásolja a HHV-6 amúgy is ritka anyáról magzatra történő terjedését.

Felszíni molekulák expressziójának vizsgálata fertőzetlen és fertőzött syncytiotrophoblast sejteken

A kísérlet következő szakaszában azt vizsgáltuk, hogy a HHV-6A vajon a sejtfelszíni molekulák expressziójának befolyásolása révén, a HIV-1-re fogékony sejtek számának növelésével hat-e a HIV-1 replikációjára. Először indirekt IFA-val fertőzetlen ST sejteken vizsgáltuk a CD4, CXCR4, CCR5 és CCR3 molekulák jelenlétét. Eredményeink szerint CD4 és CCR5 receptor nincs az ST sejteken, míg CXCR4 és CCR3 kimutatható.

Ezt követően fertőzött sejteken vizsgáltuk ugyanezen molekulák expresszióját. Sem a HIV-1-vel, sem a HHV-6A-val, sem pedig a kettősen fertőzött sejteken nem tapasztaltunk változást a fertőzetlen sejtekhez képest.

A következő lépésben blokkolós kísérleteket végeztünk. Ennek során a HHV-6A-val fertőzött ST sejteket 3 nap múlva felülfertőztük a HIV-1 Ba-L, illetve IIIB törzsével, miközben anti-CXCR4, anti-CCR3 és anti-CCR5 MAb-okat adtunk a kultúrákhoz külön-külön, illetve anti-CD4 ellenanyaggal kombinálva. Egyik receptor blokkolása sem gátolta a trophoblastok HIV-1-gyel történő fertőződését. Ez összhangban van azzal a ténnyel, hogy a trophoblastok felszínén nem található CD4, illetve CCR5 receptor; valamint egy korábbi eredményünkkel is, miszerint a HIV-1 IIIB és Ba-L törzsek sem CD4, sem pedig kemokin receptorokat nem használnak az ST sejtek fertőzése során.

A HHV-6A transzaktivátor géntermékeinek hatása a HIV-1 replikációjára

Az előző kísérlet eredményei alapján az ST sejtekben a HHV-6A nem a HIV-1-gyel szembeni fogékonyságot növelve fejti ki stimuláló hatását. Feltételezéseink szerint a HHV-6A transzaktiváló géntermékeinek lehet ebben szerepe. Ezért olyan kísérleteket végeztünk, melyekben az ST sejteket a HHV-6A IE-A és IE-B régiójának ORF-eit hordozó plazmidokkal transzfektáltuk, majd 48 óra elteltével HIV-1-gyel fertőztük. Ezután harmadnaponként 22 napig vizsgáltuk a kultúrák infektív HIV-1 termelését. A transzfekció hatékonyságát IFA-val ellenőriztük.

A HHV-6A U16-U17, U18-U19, U86 és U89 gének termékei mind képesek voltak az ST sejtekben az abortív HIV-1 replikációt produktívvá változtatni. Sőt, az U86 és U89 szinergista hatásának bizonyult. Korábbi tanulmány szerint az U89 géntermék

promterindukáló hatásához szükséges a HIV-1 LTR-ben található TATA box, illetve az NF- κ B és SP-1 kötőhely, az U16-U17 transzaktiválásához pedig nélkülözhetetlen az NF- κ B kötőhely. Ezek alapján feltételezhető, hogy ezek a géntermékek transzkripció enhancerekként hatnak a transzkripció egységek aktiválása vagy felerősítése révén. HHV-6A esetében az U16-U17, illetve az U18-U19 gének nemcsak a transzkripció nagyon korai, hanem korai szakaszában is átíródnak. Így tehát a HHV-6A szaporodásának IE és E szakaszában is képes a HIV-1 LTR-t stimulálni.

A HHV-6A szuppresszálja a HIV-1 replikációját macrophagokban

A HHV-6A HIV-1 replikációra kifejtett hatását 7 napos, monocyta eredetű macrophagokon vizsgáltuk. A kísérletek 14 napja alatt a szimultán kettősen fertőzött macrophagok esetén a HIV-1 szaporodása szignifikánsan ($n=5$, $p<0,05$) lecsökkent a csak HIV-1-gyel fertőzött sejtekhez képest. A kettősen fertőzött sejtek életképessége a csak Ada-M-mel fertőzöttekhez képest nem különbözött.

Hővel inaktivált (56°C, 1 óra) HHV-6A-val is végeztünk koinfekciós kísérleteket. Ebben az esetben azonban a kettősen fertőzött tenyészetekben az inaktivált HHV-6A nem gátolta a HIV-1 replikációját.

HHV-6A replikáció a macrophagokban

Infektív HHV-6A termelést sem a vírussal egyszeresen, sem pedig a HIV-1-gyel és HHV6-A-val kettősen fertőzött macrophagok esetében nem tapasztaltunk. A vizsgálatokat HSB-2 monolayeren 14 napon keresztül infektív titrálassal végeztük. Kísérleteink során a HHV-6A p150 kapszid proteinjének jelenlétét nem tudtuk kimutatni. A kultúrák felülúszójában HHV-6A genomekvivalensek megjelenését nested PCR-rel nem tapasztaltuk, ugyanakkor HHV-6A specifikus DNS-t detektáltunk a macrophagokban, igazolva, hogy a HHV-6A képes megfertőzni a macrophagokat.

Kísérleteink alapján feltételezhető, hogy a HHV-6A HIV-1 szaporodást gátló hatása nem függ a produktív HHV-6A fertőzéstől.

A HHV-6A fokozza a macrophagok IL-8 és RANTES ürítését

Ezt követően vizsgáltuk, hogy a HHV-6A megváltoztathatja-e a macrophagok kemokintermelését. Ezen kísérletek során fertőzetlen, egyszeresen, illetve kettősen fertőzött kultúrák felülúszóját tanulmányoztuk.

A HHV-6A fertőzés hatására a macrophagok nagymennyiségű RANTES-t ürítettek. A GS törzzsel egyszeresen, illetve GS-sel és Ada-M-mel szimultán fertőzött kultúrák esetében is az ürítés maximumát a fertőzést követő 2. napon tapasztaltuk. Ezután az ürítés mértéke csökkent, és a fertőzést követő 10. naptól a kemokin mennyisége nem különbözött a fertőzetlen, kontroll kultúrákétól. A csak HIV-1-gyel történő fertőzés szintén fokozott RANTES ürítést eredményezett, amit a 6. naptól a fertőzést követő 14. napig tapasztaltunk. Míg a csak HIV-1-gyel történő fertőzés esetén 10-szeres, addig a HHV-6A-val való fertőzés esetén megközelítően 100-szor magasabb kemokin ürítést tapasztaltunk a kontroll kultúrákhoz képest.

Ezután a sejtek IL-8 termelését mértük. A kísérlet 14 napja alatt a csak HHV-6A-val, illetve a HIV-1-gyel és a HHV-6A-val szimultán fertőzött kultúrák esetében is fokozott IL-8 ürítést figyeltünk meg. A fertőzést követő 6. napig az IL-8 mennyisége a HHV-6A-val fertőzött kultúrák esetében megközelítően 10-szeres volt a fertőzetlen kultúrákhoz képest, majd a szekréció mértéke csökkent. A HIV-1 Ada-M törzsével fertőzött macrophagok felülúszójában mérhető IL-8 mennyisége számottevően nem különbözött a kontroll sejtekétől.

Exogén IL-8 és RANTES hatása a HIV-1 replikációjára

A RANTES, a CCR5 természetes ligandjaként, receptorához kötődve a HIV-1 R5 variánsának kompetitora, tehát a macrophagok HIV-1-gyel történő fertőződésekor gátolhatja a vírus replikációját. Ráadásul a RANTES kötődése a CCR5-höz a receptor foszforilációjához, homológ deszenzitizációjához és internalizációjához vezet. A kemokin receptorok keresztszabályozás útján is hatnak egymásra, így más kemokin receptorok ligandjai (például az IL-8, a CXCR1 ligandja) is befolyásolhatják a CCR5 receptor működését.

Azt, hogy a HHV-6A fertőzés által kiváltott RANTES és IL-8 ürítésnek milyen hatása van a HIV-1 replikációjára, exogén kemokinek segítségével vizsgáltuk. A HHV-6A-val és HIV-1-gyel kettősen fertőzött kultúrák esetén mért kemokinek mennyiségével megegyező mennyiségű exogén RANTES-t és IL-8-at adtunk a macrophagokhoz a csak HIV-1-gyel történő fertőzést követően. Mind az exogén RANTES, mind az exogén IL-8 képes volt szignifikánsan gátolni a HIV-1 szaporodását ($p < 0,05$; $n = 3$).

HHV-6A hatása a CCR5 ligandérzékenységére

A RANTES CCR5 receptorhoz kötődése foszfolipáz aktivációját, inozitol-1,4,5-trifoszfát és diacilglicerol keletkezését, illetve intracelluláris Ca^{2+} mobilizációt okoz. A G-fehérjéhez kötött receptorkinázok aktiválódnak, amelyek a CCR5

karboxiterminális végét foszforilálva a receptor homológ deszenzitizációját eredményezik, vagyis a receptor elveszíti ligandjával szembeni érzékenységét. A foszforilálásnak köszönhetően a CCR5 így már kötődhet a β -arrestinhez, amit a receptor igen gyors internalizációja követ.

Ugyanakkor a CCR5 receptor működését heterológ módon más kemokin receptorok, így azok ligandjai is befolyásolhatják. A CXCR1-ről már kimutatták, hogy képes a CCR5 érzékenységét és sejtfelszíni jelenlétét befolyásolni. A CXCR1 kemokin receptor aktivációjának – az IL-8 kötődésének – hatására a CCR5 kereszt-deszenzitizálódik. Legalább két mechanizmusnak van szerepe ebben a heterológ érzékenységvesztésben. Ezek közül az egyik lehetőség a CCR5 keresztfoszforilációja másodlagos hírvivők által aktivált protein kináz C útján, amelyet a receptor és a G-fehérje szétválása kísér. A másik lehetőség pedig a foszfolipáz C gátlása. Emellett a CXCR1 aktivációja a CCR5 keresztinternalizációjával jár.

Mint hogy a macrophagok felszínén a CXCR1 jelen van, feltételeztük, hogy a HHV-6A által indukált IL-8 receptorához kötődve megváltoztatja a CCR5 receptor HIV-1-fogékonyságát. Mindemellett a nagymennyiségű RANTES szintén jelentősen befolyásolhatja a CCR5 érzékenységét és sejtfelszíni expresszióját.

A szenzitivitás vizsgálatához a kemokin receptor természetes ligandját, a RANTES-t használtuk. A RANTES által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} mobilizációt fertőzetlen és HHV-6A-val fertőzött macrophagokon tanulmányoztuk a fertőzést követő 6. napon. Egyedi sejteken történt méréseink szerint a HHV-6A-val fertőzött macrophagok esetében a RANTES adagolást követő $[Ca^{2+}]_i$ növekedés kisebb mértékű volt. Macrophag-populációk esetén a relatív R340/380 változás szignifikánsan kisebb volt ($p=0,032$; $n=6$), mintegy 22 %-nyi a fertőzetlen populációkéhoz képest.

A HHV-6A fertőzés befolyásolja a macrophagok CCR5 expresszióját

Azonban a kisebb receptorérzékenység abból is adódhat, hogy a deszenzitizáció mellett a sejtfelszíni receptorok száma is kevesebb lehet. Irodalmi adatok szerint a HIV-1-fertőzés gátlásához a receptor érzékenységvesztése nem is elegendő, a receptor internalizációja is szükséges. A sejtfelszíni receptorok száma fluorocytometriás vizsgálataink alapján a HHV-6A-val fertőzött macrophagokon jelentősen kevesebb, mint a fertőzetlen sejteken.

Feltételezésünk szerint a HHV-6A fertőzés hatására ürülő nagymennyiségű IL-8-nak és RANTES-nek kulcsszerepe lehet ebben azáltal, hogy megváltoztatják a CCR5 kemokin koreceptor érzékenységét és sejtfelszíni expresszióját, így a HIV-1-gyel szembeni fogékonyságot. Emellett természetesen egyéb tényezők is szerepet játszhatnak, és

valószínűleg játszanak is a HHV-6A szuppresszív hatásában, amelyek további kutatások témái lehetnek.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. A HHV-6A, illetve a HIV-1 bizonyos törzsei képesek az ST sejteket megfertőzni, de a replikáció egyik esetben sem produktív, infekzív virionok nem ürülnek.
2. A HHV-6A-val és HIV-1-gyel történő koinfekció hatására ST sejtekben végbemegy a HIV-1 teljes replikációs ciklusa, míg HHV-6A esetében ekkor sem.
3. ST sejtekben a HHV-6A nem befolyásolja a CD4, CXCR4, CCR3 és CCR5 felszíni molekulák expresszióját, a HIV-1 szaporodását stimuláló hatását nem a vírusra fogékony sejtek számának növelésén keresztül fejti ki. A HIV-1 trophoblastok esetében a fertőzés során sem CD4, sem pedig kemokin receptorokat nem használ.
4. A HHV-6 IE-A és IE-B gének transzaktiváló hatásuk révén stimulálják a HIV-1 replikációját a fertőzött ST sejtekben.
5. A HHV-6A képes kettősen fertőzött macrophagokban a HIV-1 szaporodását szignifikánsan gátolni.
6. A HHV-6A fertőzés macrophagokban nem produktív, a HIV-1-gyel történő kettős fertőzés sem indukálja a vírus szaporodását.
7. HHV-6A fertőzés hatására a macrophagok RANTES és IL-8 ürítése jelentősen fokozódik.
8. Ezek a kemokinek képesek szignifikánsan gátolni a HIV-1 szaporodását.
9. HHV-6A fertőzés hatására a macrophagok felszínén található CCR5 receptorok ligandérzékenysége és száma jelentősen lecsökken.

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy a HHV-6A feltételezhetően szerepet játszik a HIV-1 transzplacentális átvitelében, míg a HIV-1 valószínűleg nem befolyásolja a HHV-6 anyáról magzatra terjedését. Macrophagokban a HHV-6A fertőzés hatására ürülő nagymennyiségű kemokinek feltehetően a HIV-1 R5 variánsaival szembeni fogékonyságot csökkentve szuppresszálják a HIV-1 szaporodását. Bár *in vitro* kísérleteink szerint a HHV-6A jelentősen csökkenti a HIV-1 szaporodását a HIV-1 pathogenezisében és disszeminációjában igen fontos szerepet betöltő macrophagokban, a vizsgálat tárgyát az R5 variánsok képezték. A CCR5 koreceptorok csökkent érzékenysége, száma jelentős mértékű szelekciós nyomás lehet a CXCR4 kemokin koreceptort használó X4 variánsok felé, melyek megjelenése általában a betegség rossz prognózisát jelenti. Így tehát a HIV-1-fertőzésben igen gyakran reaktiválódó HHV-6 nemcsak a lymphocyták számának csökkentésével, de a HIV-1 R5 variánsaival szembeni fogékonyság csökkentésével az AIDS progresszió igen fontos kofaktora lehet.

AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK

Eszter Csoma, Attila Bácsi, Xiangdong Liu, Judit Szabó, Peter Ebbesen, Zoltán Beck, József Kónya, István Andirkó, Etelka Nagy, and Ferenc D. Tóth: Human Herpesvirus 6 Variant A Infects Human Term Syncytiotrophoblasts In Vitro and Induces Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Dually Infected Cells
Journal of Medical Virology 67: 67-87 (2002)

Impakt faktor: 2,629, citáció: 3

Eszter Csoma, Tamás Deli, József Kónya, László Csernoch, Zoltán Beck and Lajos Gergely: Human Herpesvirus 6A Decreases the Susceptibility of Macrophages to R5 Variants of Human Immunodeficiency Virus 1: Possible Role of RANTES and IL-8
Virus Research. (2006) (in press)

Impakt faktor: 2,155

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK:

Attila Bácsi, **Eszter Csoma**, Zoltán Beck, István Andirkó, József Kónya, Lajos Gergely, and Ferenc D. Tóth: Induction of HIV-1 Replication in Latently Infected Syncytiotrophoblast Cells by Contact with Placental Macrophages: Role of Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α .
Journal of Interferon and Cytokine Research 21: 1079-1088 (2001)

Impakt faktor: 2,281, citáció: 8

Attila Bácsi, Peter Ebbesen, Judit Szabó, Zoltán Beck, István Andirkó, **Eszter Csoma**, and Ferenc D. Tóth: Pseudotypes of Vesicular Stomatitis Virus-Bearing Envelope Antigens of Certain HIV-1 Strains Permissively Infect Human Syncytiotrophoblasts Cultured In Vitro: Implications for In Vivo Infection of Syncytiotrophoblasts by Cell-Free HIV-1.
Journal of Medical Virology 64: 387-397 (2001)

Impakt faktor: 2,881, citáció: 0

Etelka Nagy, Zoltán Beck, Attila Kiss, **Eszter Csoma**, Béla Telek, József Kónya, Éva Oláh, Kálmán Rák, Ferenc D. Tóth:

Frequent methylation of $p16^{INK4A}$ and $p14^{ARF}$ genes implicated in evolution of chronic myeloid leukemia from its chronic phase to acceleration.

European Journal of Cancer 39: 2298-305 (2003)

Impakt faktor: 3,694; citáció: 5

Zoltán Beck, Attila Bácsi, Xiangdong Liu, Peter Ebbesen, István Andirkó, Eszter Csoma, József Kónya, Etelka Nagy, and Ferenc D. Tóth: Differential Patterns of Human Cytomegalovirus Gene Expression in Various T-Cell Lines Carrying Human T-Cell Leukemia-Lymphoma Virus Type 1: Role of Tax-Activated Cellular Transcription Factors.

Journal of Medical Virology 71: 94-104 (2003)

Impakt faktor: 2,371, citáció:0

Etelka Nagy, György Veress, Krisztina Szarka, Eszter Csoma, Zoltán Beck: Frequent methylation of p16INK4A/p14ARF promoters in tumorigenesis of Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid cell lines.

Anticancer Research 25: 2153-60 (2005)

Impakt faktor: 1,395, citáció: 0