

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A PLACENTA MACROPHAGOK SZEREPÉNEK *IN VITRO*
VIZSGÁLATA A HUMÁN CYTOMEGALOVÍRUS ÉS A HUMÁN
IMMUNDEFICIENCIA VÍRUS 1. TÍPUSA VERTIKÁLIS
ÁTVITELÉBEN**

BÁCSI ATTILA



DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ORVOSI MIKROBIOLÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN, 2001.

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A PLACENTA MACROPHAGOK SZEREPÉNEK *IN VITRO*
VIZSGÁLATA A HUMÁN CYTOMEGALOVÍRUS ÉS A HUMÁN
IMMUNDEFICIENCIA VÍRUS 1. TÍPUSA VERTIKÁLIS
ÁTVITELÉBEN**

BÁCSI ATTILA

TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. D. TÓTH FERENC

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ORVOSI MIKROBIOLÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN, 2001.

Bevezetés

A magzat méhen belüli fertőződése fontos módja a humán cytomegalovírus (HCMV) és a humán immundeficiencia vírus 1. típusa (HIV-1) vertikális terjedésének. A vírusok placentán való átjutásának mechanizmusa jórészt ismeretlen.

A placenta syncytiotrophoblast sejtjei (ST) - melyek folytonos, sokmagvú hámréteget alkotnak - közvetlenül érintkeznek az anyai vérrel és szelektív barriert képeznek az anya és a magzat között. A vírusoknak át kell jutniuk a syncytiotrophoblast rétegen ahhoz, hogy elérjék a mélyebben fekvő cytotrophoblast sejteket, placenta macrophagokat (Hofbauer sejtek), fibroblastokat, illetve a magzati kapillárisokat szegélyező endothel sejteket.

Bár a syncytiotrophoblast rétegben HIV-1-specifikus provirális DNS-t *in situ* többen is kimutattak, nem tisztázott, hogy a trophoblastok fertőzése sejtmentes víruspartikulákkal (virion) megtörténhet-e. Több *in vitro* vizsgálat azt igazolta, hogy a syncytiotrophoblast sejtek megfertőzhetők laboratóriumi HIV-1 törzsekkel. Más kutatók nem tudták bizonyítani a trophoblastok virionokkal való fertőzhetőségét. Véleményük szerint a syncytiotrophoblastok HIV-1 fertőzése csak sejt-sejt kölcsönhatás révén valósulhat meg.

Az egymásnak ellentmondó eredmények oka lehet, hogy a kísérletekben más-más HIV-1 törzseket használtak, illetve, hogy eltérő módszereket alkalmaztak a vírusfertőzés kimutatására. Kísérleteink során a syncytiotrophoblast sejtek szabad HIV-1 virionokkal történő fertőzésének lehetőségét a vesicularis stomatitis vírus (VSV) pszeudotípusaival kívántuk tisztázni. Ha a HIV-vel krónikusan fertőzött sejteket VSV-vel felülfertőzzük, létrejönnek olyan VSV(HIV-1) pszeudotípusok is, melyek burka retrovirális glikoproteineket hordoz, és így rezisztensek az anti-VSV szérum neutralizáló hatásával szemben. Ezek a vírusok csak olyan sejtekbe képesek bejutni, melyek rendelkeznek HIV-1-specifikus receptorokkal. A penetráció után a replikáció további szakaszai is végbemennek, és új, nem pszeudotípus (a HIV-1 burokantigének ugyanis nem genetikailag kódoltak a pszeudotípus esetén) VSV virionok jönnek létre. Ezek jól látható citopátiás elváltozást okoznak: a sejtek lekerekednek és elpusztulnak. Így a HIV-1 buroknak a penetrációban betöltött szerepére egyszerűen a VSV által okozott citopátiás hatás alapján következtethetünk.

In situ immunhisztokémiai és *in vitro* vizsgálatok is kimutatták, hogy a HCMV képes megfertőzni az ST sejteket. Nem tisztázott azonban, hogyan tud a vírus átjutni a syncytiotrophoblast rétegen. Ezekben a sejtekben ugyanis HCMV replikációs ciklusa – a

legtöbb megfigyelés szerint – abortív. A fertőzött ST sejtekben általában csak nagyon korai vírusfehérjék mutathatók ki.

Az *in vitro* HCMV-vel, illetve HIV-vel fertőzött syncytiotrophoblast kultúrákban vírusürítés általában nem figyelhető meg, vagy annak mértéke a legjobb esetben is csak igen csekély. A trophoblastok *in vivo* produktív fertőzése valószínűleg csak meghatározott feltételek mellett mehet végbe, és különböző kofaktorok befolyásolhatják.

A placenta macrophagok és a syncytiotrophoblastok közötti közvetlen sejt-sejt kölcsönhatások szerepét a HCMV és a HIV-1 vertikális átvitelében még nem tanulmányozták. Ezeknek a kölcsönhatásoknak kiemelt jelentősége lehet, mivel a Hofbauer sejtek a placenta kötőszöveti állományában nagyszámban jelenlévő és mobilis elemek. *In vivo* és *in vitro* vizsgálatok is igazolják, hogy a HCMV és a HIV-1 is képes megfertőzni ezeket a sejteket, amelyek tehát vektorai lehetnek a vírusok anyáról magzatra való terjedésének.

Több tanulmány számol be arról, hogy különböző sejtek közötti adhezív kölcsönhatás fokozhatja mind a HCMV, mind a HIV-1 replikációját. Kísérleteink során arra voltunk kíváncsiak, hogy a Hofbauer sejtek képesek-e stimulálni a két vírus szaporodását az előzetesen megfertőzött ST sejtekben, illetve a fertőzött syncytiotrophoblastok átadják-e a vírust a szomszédos macrophagoknak. Mivel a közvetlen sejt-sejt kölcsönhatás különböző citokinek képződését indukálja, azt feltételeztük, hogy a kokultivált sejtek által termelt citokineknek kulcsszerepe lehet a HCMV és HIV-1 génexpressziójának fokozásában. Ezért megvizsgáltuk, hogy hatással van-e a kokultiváció a syncytiotrophoblastok és a placenta macrophagok citokintermelésére. Amennyiben igen, befolyásolják-e ezek a HCMV és a HIV replikációját.

Az epidemiológiai vizsgálatok alapján a HIV-1 átjutása a magzatba a terhességnek vagy a korai, vagy a késői fázisában történik meg. Számos tanulmány közvetett bizonyítékot szolgáltatott arra vonatkozóan, hogy a késői intrauterin fertőződésnek van nagyobb szerepe a HIV-1 transzplacentális átvitelében. A HCMV anyáról magzatra való terjedésének valószínűségét nem befolyásolja, hogy a terhesség során mikor fertőződik meg az anya.

Ezekből a megfigyelésekből kiindulva a HCMV, és a HIV transzplacentális átvitelét modellező kísérleteinkhez szülésből származó placentából szeparáltunk trophoblast és Hofbauer sejteket.

Módszerek

Vírusok

A HCMV AD169 törzsét humán embrionális fibroblast sejtkultúrán termeltük. A felülúszót ultracentrifugáltuk, majd a vírust az eredeti térfogat harmincad részét képező tápfolyadékban vettük fel. A VSV Indiana törzsét WISH sejtekben szaporítottuk, és a titrálásra is ezt a sejtvonalat használtuk. Az infektiiv virionok mennyiségének meghatározása plakk-képző módszerrel történt, a VSV titerét PFU (plaque forming unit)/ml egységben adtuk meg.

A HIV-1 IIIB, RF és MN törzseit H9 sejtekben szaporítottuk, a Ba-L és Ada-M törzseket pedig monocytá eredetű macrophagokban. Koncentrált HIV-1 Ba-L preparátumot ultracentrifugálással állítottunk elő.

HCMV titrálása

A HCMV-t humán embrionális fibroblast kultúrákban titráltuk plakk-képző módszerrel. A HCMV titerét a különböző hígításokban megfigyelhető plakkok száma alapján állapítottuk meg, és azt PFU/ml-ben fejeztük ki.

HIV titrálása

A HIV titrálása a kísérletek jellegétől függően három különböző módszerrel történt: a virionok reverz transzkriptáz aktivitásának mérésével, a vírusspecifikus p24 antigén ELISA módszerrel való mennyiségi meghatározásával és az infektiiv virionok titerének syncytiumképzés alapján történő meghatározásával.

Cytotrophoblastok és macrophagok (Hofbauer sejtek) szeparálása, tenyésztése

Kísérleteinkhez a cytotrophoblast sejteket, valamint a Hofbauer sejteket normál szülésből származó placentákból szeparáltuk. A cytotrophoblastokat immunmágneses technikával nyertük ki. A tenyésztés 2 mM glutaminnal, antibiotikumokkal és 15 % magzati borjúsavóval (FCS) komplettált KGM (keratinocyte growth medium) tápfolyadékban történt. A kultúrákban sejtfúziós folyamatok zajlottak le és a sejtek kiszélesztését követő 5. napon a tenyészeteket sokmagvú óriássejtek (syncytiotrophoblastok) alkották. A kísérletek során ezeket az 5 napos syncytiotrophoblast kultúrákat használtuk.

A placenta macrophagok szeparálásához először Ficoll-Hypaque, majd ezt követően Percoll sűrűség-grádiens centrifugálást végeztünk. A sejteket 2 mM glutamint, 10 % humán szérumot (HuSe) és antibiotikumokat tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékban tenyésztettük.

A kokultivációs vizsgálatokhoz a cytotrophoblastokat és a macrophagokat ugyanabból a placentából párhuzamosan nyertük ki.

A monocyta eredetű macrophagok szeparálása és tenyésztése

A perifériás vér mononukleáris sejtjeit (PBMC) Ficoll-Hypaque sűrűség-grádiens centrifugálással nyertük ki „buffy coat” preparátumokból. A sejteket 2 mM glutamint, 10 % HuSe-t és antibiotikumokat tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékban tenyésztettük. Kísérleteinkben 7 napos, monocyta eredetű macrophag kultúrákat fertőztünk

Sejtvonalak

A hám eredetű WISH és MDBK sejteket 10 % FCS-t tartalmazó Eagle MEM tápfolyadékban tenyésztettük. A lymphoid H9, Sup-T1 és CEM-SS sejteket, valamint a promonocyta U937 sejteket 10 % FCS-t tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékban tartottuk fenn. A tápfolyadékok 2 mM glutamint, 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint is tartalmaztak. A kísérleteinkhez használt víruskoncentrátumok, víruspreparátumok és sejtkultúrák midegyike az elvégzett tesztek alapján *Mycoplasma* fertőzéstől mentes volt.

Syncytiotrophoblastok fertőzése HCMV-vel

Az 5 napos ST kultúrák HCMV fertőzésekor a multiplicitása 1 PFU/sejt volt, amit a kiszélesztett cytotrophoblastok számának megfelelően állapítottunk meg. A sejteket a vírusszuspenzióval 37 °C-on 2 órán át inkubáltuk.

A pszeidotípus vírusok előállítása

A pszeidotípusok előállítása két lépésben történt: először HIV-vel fertőztünk sejteket, majd felülfertőztük VSV-vel. Abból a célból, hogy HIV-1-et folyamatosan ürítő sejteket állítsunk elő, U937 sejteket a HIV-1 IIIIB, RF vagy MN törzseivel, a Sup-T1 sejteket pedig Ba-L illetve Ada-M törzsekkel fertőztük. A HIV-vel krónikusan fertőzött U937 és Sup-T1 sejteket VSV-vel felülfertőztük, 10 PFU/sejt multiplicitással. A kultúrákat 12-18 óra múlva lecentrifugáltuk, a felülúszókat szétosztottuk és lefagyasztottuk -70°C-ra.

A pszeidotípus vírusok titrálása

A vizsgálandó mintákat 1 órán át, 37 °C-on inkubáltuk hővel inaktivált, nyúl anti-VSV szérum tízszeres feleslegével, amikor a pszeidotípusok mennyiségét akartuk meghatározni, illetve antiszérum nélkül, amikor az összes VSV-t titráltuk. A pszeidotípusok kialakulását VSV(HIV-1_{III B}), VSV(HIV-1_{RF}) és VSV (HIV-1_{MN}) pszeidotípusok esetén HIV neutralizáló szérum, VSV(HIV-1_{Ba-L}) és VSV(HIV-1_{Ada-M}) pszeidotípusoknál HIV-specifikus immunglobulin blokkoló hatásával ellenőriztük. A pszeidotípusok titerét a HIV-1 törzsek tropizmusának megfelelő sejt kultúrákon, III B, RF és MN HIV-1 törzssel pszeidotipizált VSV esetén poli-L-lizinnel letapasztott CEM-SS sejteken, míg Ada-M és Ba-L HIV-1 törzssel pszeidotipizált VSV esetén macrophag kultúrákon határoztuk meg. A 7 napos macrophagokat és 1 nappal a szélesztés után a CEM-SS sejteket azokkal a vírusmintákkal fertőztük meg, amelyeket előzetesen vagy anti-VSV szérummal, vagy anti-VSV és anti-HIV-1 szérumokkal együttesen blokkoltunk. A vírusadszorpció után a sejteket mostuk és feleslegben adott MDBK sejtekkel fedtük le. Az MDBK sejtek plakk-indikátorként szerepeltek az újonnan képződött VSV partikulák kimutatására. Két óra múlva, amikor az MDBK sejtek már letapadtak, a sejt kultúrákra agart tartalmazó tápfolyadékot öntöttünk. A keletkezett plakkok számát 1-2 nap múlva olvastuk le, és PFU/ml egységben adtuk meg.

A syncytiotrophoblastok fertőzése VSV-vel és VSV(HIV-1) pszeidotípusokkal

Öt napos syncytiotrophoblast kultúrákat fertőztünk meg VSV-vel, illetve VSV(HIV-1) pszeidotípusokkal. A vírussal fertőzött és a kontrollként használt fertőzetlen sejt kultúrák tápfolyadékából különböző időpontokban mintát vettünk, és a VSV titert plakk-képző módszerrel WISH sejteken határoztuk meg. A VSV és a VSV(HIV-1) pszeidotípusok fertőzőképességének vizsgálatakor a syncytiotrophoblastokat a vírusadszorpció után mostuk és MDBK sejtekkel fedtük. Az MDBK sejtek letapadása után (2 óra), a sejt kultúrákra agart tartalmazó tápfolyadékot adtunk. A keletkezett plakkok számát 1-2 nappal a fertőzés után értékeltük.

Syncytiotrophoblastok fertőzése HIV-1_{Ba-L}-lal

Kísérleteinkhez 5 napos syncytiotrophoblast kultúrákat fertőztünk. A fertőzés multiplicitása 1 SFU/sejt volt, melyet a kiszélesztett cytotrophoblastok számának megfelelően állapítottunk meg. A HIV-1 Ba-L preparátumokat a fertőzés előtt DNáz enzimmel kezeltük. A vírusszuspenzió hozzáadását követően a sejteket 2 órán át inkubáltuk 37 °C-on.

Kokultiváció

A syncytiotrophoblastokat 4 nappal a fertőzés után 9 napos macrophagokkal kokultiváltuk. Ehhez a Hofbauer sejteket a tenyésztőpalackról leválasztottuk, és 1:1 arányban a syncytiotrophoblastokhoz adtuk.

Immunszérumok és konjugátumok

Monoklonális ellenanyagot (MAb) használtunk a HCMV nagyon korai (IE), valamint a korai-késői (pp65) proteinjének kimutatásához. A CD4 receptor, CXCR4, a CCR3 és a CCR5 koreceptorok blokkolására is monoklonális ellenanyagot használtunk. A HIV-specifikus immunglobulin és a HIV-neutralizáló szérum humán eredetű volt. Az anti-VSV antiszérum nyúlból származott. A HIV p24 antigén detektálására monoklonális, a Tat fehérje kimutatására poliklonális ellenanyagot alkalmaztunk. Az IL-1 β , az IL-6, az IL-8, a TGF- β 1, illetve a TNF- α citokinnel reagáló ellenanyagok monoklonálisak voltak.

A macrophagok CD68 antigénjére specifikus ellenanyag fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált MAb volt. Használtunk még tetrametilrodamin-izotiocianáttal (TRITC) jelzett, nyúl anti-egér immunglobulin (Ig) konjugátumot, TRITC-cel jelölt, sertés anti-nyúl Ig konjugátumot, FITC-cel jelzett, nyúl anti-egér- és sertés anti-nyúl-immunglobulint.

Immunfluoreszcens technikák (IFA)

A virális antigéneket kifejező, valamint citokineket termelő sejteket kettős immunfluoreszcenciával identifikáltuk. Ehhez először ezekre az antigénekre specifikus indirekt IFA-t, majd konjugált anti-CD68 MAb felhasználásával direkt IFA-t végeztünk.

A pszeudotípus vírusok előállításakor a perzisztensen fertőzött sejtekben a HIV-1 p24 fehérje expresszióját, valamint a fertőzött syncytiotrophoblast tenyészetekben a VSV proteinek megjelenését indirekt citoplazma IFA-val mutattuk ki.

Citokintermelés vizsgálata

Az IL-8 és TGF- β 1, illetve az IL-1 α , IL-1 β , IL-6, GM-CSF, M-CSF és TNF- α termelés kvantitatív kimutatásához szendvics ELISA módszeren alapuló kiteket használtunk.

Eredmények

I. Az önmagukban tenyésztett és cytomegalovírussal fertőzött syncytiotrophoblastok felülúszójában a fertőzést követő 18 napon belül vírust nem lehetett detektálni. Ezzel szemben a fertőzött ST sejtek és a placenta macrophagok kokultivációja infektív virionok termelődését eredményezte. A HCMV sejtekbe történő bejutásának és replikációjának bizonyítására, a vírus IE és pp65 fehérjéit immunfluoreszcenciás módszerrel vizsgáltuk. A sejtípusokat a macrophagokra jellemző CD68 antigének kimutatásával azonosítottuk. Az önmagukban tenyésztett, HCMV-vel fertőzött ST sejtekben a fertőzés után már 1 nappal detektálható volt az IE gén expressziója, de ezekben a tenyészetekben pp65 protein egyáltalán nem volt kimutatható. A kokultivált, HCMV-vel fertőzött ST sejtekben az IE fehérjék expresszióját követően a kokultiváció 3. napján a pp65 antigén megjelenését is észleltük. A kettős immunfluoreszcenciás vizsgálatok során kiderült, hogy az IE antigének a kokultiváció kezdete után 6 nappal a macrophagokban is megjelentek, és 2 nappal később a pp65 antigének is kimutathatóak voltak. Ezek a megfigyelések egyértelműen bizonyítják, hogy a ST sejtek által ürített virionok megfertőzték a kokultivált macrophagoknak.

Annak eldöntésére, hogy citokineknek van-e szerepe a vírusszaporodás indukálásában, az IL-8 és a TGF- β 1 szekrécióját vizsgáltuk fertőzetlen, HCMV-vel fertőzött és kokultivált sejt kultúrákban. A fertőzetlen syncytiotrophoblast kultúrákban kismennyiségű, folyamatos IL-8 szekréciót tapasztaltunk (0,8 ng/ml). A fertőzetlen macrophagok is termeltek IL-8-at közel 2,4 ng/ml mennyiségben. A HCMV-vel fertőzött ST sejtekben az IL-8 ürítés kissé fokozódott a fertőzetlen sejtekhez viszonyítva. A fertőzött ST sejtek és a placenta macrophagok együttes tenyésztésekor az IL-8 szekréciójának jelentős fokozódását tapasztaltuk a kultúrák felülúszójában. A citokintermelés a kokultiváció 3. napján volt a legnagyobb (17,8 ng/ml), majd fokozatosan csökkent a következő 6 nap alatt. Meglepő volt, hogy a fertőzetlen ST sejtek és a Hofbauer sejtek kokultivációs tenyészetében is hasonló nagyságú és kinetikájú IL-8 termelést detektáltunk. A konstitutívan termelt TGF- β 1 mennyisége a syncytiotrophoblastokban 3,6 ng/ml, a macrophagokban 2,8 ng/ml volt. Az ST sejtek TGF- β 1 ürítése nem növekedett számottevően a HCMV fertőzés hatására. Ezzel szemben a HCMV-fertőzött ST sejtek és a placenta macrophagok kokultivációja nagymértékű TGF- β 1 szekréciót eredményezett. A maximális TGF- β 1 kibocsátást a kokultiváció 3. napján észleltük (21,8 ng/ml). A citokin ürítése a 9. napra fokozatosan lecsökkent. Lényegében ugyanezeket az eredményeket kaptuk, amikor fertőzetlen ST sejteket és Hofbauer sejteket

tenyésztettünk együtt. Annak meghatározására, hogy a kokultivált tenyészetekben milyen sejtekben fokozódik az IL-8 és a TGF- β 1 termelés, kettős immunfluoreszcenciát alkalmaztunk. Eredményeink szerint mind az IL-8, mind a TGF- β 1 fokozott termeléséért az ST sejtekhez tapadt macrophagok a felelősek.

Az előbbi eredményeink alapján feltételeztük, hogy a kokultiváció hatására fokozódó citokintermelés indukálhatja a HCMV szaporodását. A kérdés megválaszolásához IL-8 és TGF- β 1 elleni neutralizáló ellenanyagokat használtuk hogy blokkoljuk a citokinek hatását. A blokkoló ellenanyagokat (a sejtek legnagyobb citokinszekrécióját alapul véve) tízszeres feleslegben adtuk a sejtekhez. A kezelés akkor kezdődött, amikor a macrophagokat hozzáadtuk a fertőzött ST sejtekhez, és további 10 napig folytatódott. Az anti-IL-8 kezelés hatására 24-ed, az anti-TGF- β 1 kezelés hatására 35-öd részére csökkent az infektív HCMV titere a sejt kultúrák felülúszójában. A kezelések hatására a HCMV ürítés időtartama is rövidebb lett. Amikor az anti-IL-8 és az anti-TGF- β 1 kezelést kombináltuk, nem tudtunk infektív viriont kimutatni a sejtek felülúszójában.

II. Kísérleteink során a syncytiotrophoblast sejtek szabad HIV-1 virionokkal történő fertőzésének lehetőségét a vesicularis stomatitis vírus pszeudotípusaival kívántuk tisztázni. Kimutattuk, hogy a VSV képes produktívan fertőzni a syncytiotrophoblast sejteket. A sejt kultúrák vírus termeltek, a VSV fertőzés hatására a syncytiotrophoblastok lekerekedtek és elpusztultak. Indirekt citoplazma IFA-val ki tudtuk mutatni a VSV proteinek expresszióját a fertőzött syncytiotrophoblastokban.

Kísérleteink következő szakaszában a T-lymphotróp IIIB és MN, a kettős tropizmusú RF és a macrophagtróp Ada-M és Ba-L HIV-1 törzsekkel VSV pszeudotípusokat állítottunk elő U937 és Sup-T1 sejttenyészetekben. Összehasonlítottuk a VSV és VSV(HIV-1) pszeudotípusok fertőzőképességét syncytiotrophoblastokban és a HIV-1 törzsek tropizmusának megfelelő célsejtekben (IIIB, MN és RF HIV-1 törzsekkel pszeudotipizált VSV esetében CEM-SS sejtekben, míg Ada-M és Ba-L törzsekkel pszeudotipizált VSV esetében macrophagokban). A VSV(HIV-1_{MN}), a VSV(HIV-1_{RF}) és a VSV(HIV-1_{Ada-M}) nem bizonyultak infektívnek syncytiotrophoblastok esetében. Ugyanakkor a IIIB és Ba-L HIV-1 törzsekkel pszeudotipizált VSV megfertőzte a syncytiotrophoblastokat.

Bebizonyítottuk, hogy e két pszeudotípusnak a syncytiotrophoblast sejtekbe való bejutásáért a IIIB, illetve a Ba-L HIV-1 törzsek burokantigénjei felelősek. A VSV(HIV-1_{Ba-L}) pszeudotípussal történő fertőzéskor a HIV-specifikus immunglobulin erősen gátolta a syncytiotrophoblastokba való bejutást. A HIV neutralizáló szérum ennek a pszeudotípusnak a

penetrációját nem akadályozta meg. A VSV(HIV-1_{IIIb}) pszeudotípus syncytiotrophoblastba való bejutását mindkét szérum gátolta.

A bejutás mechanizmusának vizsgálatához anti-CD4, anti-CXCR4, anti-CCR5 és anti-CCR3 monoklonális ellenanyagokat használtunk külön-külön, illetve a koreceptorokat és a CD4 receptort együttesen is blokkolva. VSV(HIV-1_{IIIb})-vel történő fertőzés esetén azt tapasztaltuk, hogy syncytiotrophoblast kultúrákban az anti-CD4, az anti-CXCR4 és az anti-CCR3 antitesteknek sem külön, sem kombináltan nem volt blokkoló hatása. Ugyanakkor a kontroll CEM-SS sejtek fertőzésénél az anti-CD4, az anti-CXCR4, az anti-CD4+anti-CXCR4 és az anti-CD4+anti-CCR3 is gátolta a penetrációt. Az önmagában alkalmazott anti-CCR3 azonban nem akadályozta meg a sejtbe való bejutást. VSV(HIV-1_{Ba-L}) pszeudotípussal történő fertőzéskor a syncytiotrophoblastokba való bejutást nem gátolta az anti-CD4, az anti-CCR5 és az anti-CCR3 szérumok egyenkénti alkalmazása, illetve a CD4 receptor és a koreceptorok együttes blokkolása sem. Ugyanakkor macrophagok esetében minden kezelés sikeresen gátolta a penetrációt, kivéve a CCR3 receptor önmagában történő blokkolását.

III. Megvizsgáltuk, hogy a placenta macrophagokkal történő kokultiváció hatással van-e a HIV-1 replikációjára a fertőzött syncytiotrophoblastokban. A vizsgálatokhoz a HIV-1 Ba-L törzsét használtuk, mivel transzplacentálisan főleg a macrophagtróp törzsek jutnak át, és a megelőző kísérletek szerint ez a törzs képes megfertőzni az ST sejteket. A HIV-vel fertőzött syncytiotrophoblast sejtek felülúszójában vírust nem tudtunk kimutatni a fertőzést követő 22 nap alatt. A fertőzött syncytiotrophoblastok és a Hofbauer sejtek kokultivációja azonban HIV-1 termelést eredményezett. A felülúszóban a kokultiváció utáni 5. napon volt először kimutatható a HIV-1 p24 antigén. Ennek a vírusspecifikus fehérjének a koncentrációja a kokultivációs tenyészet felülúszójában a 16. napon volt a legnagyobb. Mivel a p24 antigén jelenléte nem jelenti feltétlenül azt, hogy a sejtek fertőzőképes vírust ürítenek, ezért a felülúszók syncytiumképző aktivitását is vizsgáltuk. A HIV-1 p24 antigén mennyiségével összhangban azt kaptuk, hogy az infektív virionok ürítése a kokultiváció 16. napján volt a legnagyobb, majd fokozatosan csökkent.

A HIV-1 génexpressziójának tanulmányozásához immunfluoreszcenciás vizsgálatokat végeztünk, amelyek során a Tat és a p24 vírusspecifikus fehérjék megjelenésének kinetikáját követtük nyomon a különböző sejt kultúrákban. Az önmagukban tenyésztett, HIV-vel fertőzött ST sejtekben sem Tat, sem p24 protein nem volt kimutatható. A kettős immunfluoreszcenciás vizsgálatok alapján a placenta macrophagokkal kokultivált, fertőzött ST sejtekben a Tat fehérje már a kokultivációt követő 2. napon detektálható volt, és kifejeződése a 6 – 12. napon

volt a legnagyobb mértékű. A p24 protein a HIV-fertőzött ST sejtekben a kokultiváció 4. napján volt először kimutatható. A p24 antigén-pozitív sejtek aránya a 8. napon érte el a maximális értéket. A kettős immunfluoreszcenciával azt is sikerült kimutatnunk, hogy a kokultiváció 7. napján a Tat fehérje a macrophagokban is megjelent. A Tat proteint expresszáló sejtek száma azután gyorsan növekedett, a 12. napon a Hofbauer sejtek 81 %-a volt Tat-pozitív. A fertőzött ST sejtekkel kokultivált placenta macrophagokban a p24 antigén is detektálható volt. A 9. napon lehetett először kimutatni, és a 14 - 16. napon volt a legnagyobb a p24 antigén-specifikus fluoreszcenciát mutató sejtek aránya. Mindez azt bizonyítja, hogy a fertőzött ST sejtekből ürülő vírus megfertőzte a macrophagokat.

Mivel a közvetlen sejt-sejt kapcsolat különböző citokinek képződését indukálhatja, azt feltételeztük, hogy a kokultivált sejtek által termelt citokineknek kulcsszerepe lehet a HIV-1 génexpressziójának fokozásában. Ezért fertőzetlen, HIV-fertőzött, valamint kokultivált sejt kultúrákban vizsgáltuk az IL-1 α , IL-1 β , IL-6, GM-CSF, M-CSF és a TNF- α szekréciónak. Egyetlen sejt kultúrában sem volt mérhető szintű az IL-1 α , a GM-CSF és az M-CSF szekréciónak.

A fertőzetlen ST sejtek és a placenta macrophagok folyamatosan termeltek IL-6-ot, de annak a mennyisége kevesebb volt mint 20 pg/ml. A syncytiotrophoblastok HIV-vel való fertőzése nem növelte meg a sejtek IL-6 szekréciónak. Ha azonban fertőzetlen ST sejteket Hofbauer sejtekkel tenyésztettünk együtt, a sejt kultúra felülúszójában jelentős IL-6 ürítést észleltünk. A kokultiváció által indukált IL-6 termelés az első napon volt a maximális (5175 pg/ml), majd meredeken csökkent. A kokultiváció 6. napjára IL-6 szekréciónak visszasüllyedt az alapszintre. A HIV-fertőzött ST sejtek és a placenta macrophagok kokultivációs tenyésztésében az IL-6 termelésnek egy második hulláma is kialakult, mely a 4. napon kezdődő ismételt növekedés után a 10. napon 7250 pg/ml értéket ért el. Az IL-6 termelés a következő négy napon nagyjából azonos szinten maradt, majd lecsökkent.

A fertőzetlen syncytiotrophoblastok és a Hofbauer sejtek konstitutív TNF- α termelése nem érte el a 10 pg/ml mennyiséget. A fertőzött ST sejtek tenyésztésében nem volt szignifikánsan nagyobb a TNF- α ürítés. A fertőzetlen ST sejtek és a placenta macrophagok kokultivációja azonban fokozta a TNF- α szekréciónak. A legnagyobb TNF- α koncentrációt az 1. napon mértük (480 pg/ml), majd a TNF- α szekréciónak a 7. napra visszaállt a konstitutív termelés szintjére. Ha fertőzött ST sejteket és placenta macrophagokat tenyésztettünk együtt a TNF- α ürítésben a kezdeti csúcs után a 10. napon egy második csúcsot (1250 pg/ml) tapasztaltunk. A 10. nap után a TNF- α termelés jelentősen csökkent.

A fertőzetlen és a fertőzött ST sejtek nem ürítettek spontán IL-1 β -t. Az önmagukban tenyésztett placenta macrophagok is csak kis mértékben (8 pg/ml) termelték a citokint. A

fertőzetlen syncytiotrophoblastok és a Hofbauer sejtek kokultivációja sem eredményezett fokozott IL-1 β kibocsátást. Ezzel szemben a HIV-fertőzött ST sejtek és a placenta macrophagok kokultivációja során a 6-10. nap között megnövekedett az IL-1 β termelés, a legnagyobb koncentráció 265 pg/ml volt. A 10. napot követően az IL-1 β szekréció lecsökkent.

Kettős immunfluoreszcenciával határoztuk meg, hogy a kokultivációs tenyészetekben mely sejtek felelősek a fokozott IL-1 β , IL-6 és TNF- α ürítésért. A fertőzetlen ST sejtek és a Hofbauer sejtek együttes tenyésztése esetén, a kokultiváció kezdete után 24 órával vizsgáltuk az IL-6 és a TNF- α termelést. A vizsgálat eredménye szerint a syncytiotrophoblastokhoz tapadó macrophagokban volt intenzív IL-6-specifikus fluoreszcencia látható. Az anti-TNF- α ellenanyagok is elsősorban a Hofbauer sejtekkel reagáltak, az ST sejtekben alig volt fluoreszcencia. HIV-fertőzött ST sejtek és a placenta macrophagok tenyésztésében a kokultiváció után 10 nappal határoztuk meg az IL-1 β -t, IL-6-ot és a TNF- α -t szekretáló sejteket. Az anti-IL-1 β ellenanyag főleg a macrophagokkal mutatott reaktivitást, az ST sejtekben halvány fluoreszcencia volt látható. Az anti-IL-6 és az anti-TNF- α ellenanyagokkal elvégzett vizsgálatok során lényegében ugyanezeket az eredményeket kaptuk.

Azt, hogy a citokineknek milyen szerepe lehet a HIV-1 replikációjának fokozódásában, blokkolós kísérletekkel vizsgáltuk. Ezek során az anti-IL-1 β , az anti-IL-6 és az anti-TNF- α neutralizáló ellenanyagokat tízszeres feleslegben alkalmaztuk. A HIV-fertőzött ST sejtek és a placenta macrophagok együttes tenyésztése során, először a kokultiváció kezdetekor, majd 6 napig naponta adtuk az antitesteket. A kezelést külön-külön, és az ellenanyagokat kombinálva is elvégeztük. Az anti-TNF- α kezelés 12-ed, az anti-IL-6 kezelés 35-öd részére csökkentette a sejtek felülszójában az infektív HIV-1 mennyiségét. A kombinált anti-IL-6 és anti-TNF- α kezeléskor a felülszóban nem lehetett infektív vírust kimutatni a 22 napos vizsgálati periódus alatt. Az anti-IL-1 β kezelés önmagában alkalmazva lényegében nem volt hatással a HIV-1 szaporodására a kokultivált tenyészetekben. A kombinált kezelésekből az anti-IL-1 β ellenanyag nem tudta fokozni sem az anti-IL-6, sem az anti-TNF- α antitestek blokkoló hatását.

Összefoglalás

1. Önmagukban tenyésztett és kokultivált syncytiotrophoblast sejtekben vizsgáltuk a HCMV szaporodását. Megállapítottuk, hogy a HCMV-vel fertőzött syncytiotrophoblastokban a fertőzetlen placenta macrophagokkal történő együttes tenyésztés hatására jelentős mértékben fokozódott a virális gének expressziója. A kultúrák felülúszójában nagymennyiségű infektiós HCMV volt kimutatható. Az ST sejtekből ürülő virionok a macrophagokat is megfertőzték, a vírusspecifikus antigének ezekben a sejtekben is megjelentek. A placenta különböző sejtjei közötti közvetlen kölcsönhatás a macrophagokban citokinek szekrécióját eredményezte. A kokultivált ST sejtekben a HCMV génexpressziójának fokozódása a macrophagok által termelt interleukin-8 és transzformáló növekedési faktor- β 1 hatására következett be.
2. A syncytiotrophoblast sejtek HIV-1 virionokkal történő fertőzésének lehetőségét VSV(HIV-1) pszeudotípusokkal tisztáztuk. Vizsgálataink eredményei szerint egyes HIV-1 törzsek képesek az ST sejtekbe bejutni. A penetráció képessége nincs összefüggésben a HIV-1 törzs T-sejtekre és macrophagokra vonatkoztatott tropizmusával, és a bejutás más mechanizmussal történik, mint T-lymphocyták vagy macrophagok esetében.
3. Kimutattuk, hogy az ST sejtek és a placenta macrophagok közötti kölcsönhatás eredményeként az syncytiotrophoblastok látens HIV fertőzése permisszívvé vált. A kokultiváció során az ST sejtek átadták a vírust a macrophagoknak, melyet a virális antigének expressziójának kinetikájával igazoltunk. Vizsgálataink szerint a közvetlen sejt-sejt kapcsolat hatására a macrophagokban termelt citokinek – az interleukin-6 és a tumor nekrozis faktor- α – indukálták a HIV-1 produktív szaporodási ciklusát az ST sejtekben.
4. Eredményeink arra utalnak, hogy az ST réteg és a placenta macrophagok kölcsönhatásának jelentős szerepe lehet mind a HCMV, mind a HIV anyáról magzatra történő terjedésében.

Az értekezésben felhasznált közlemények:

1. **Bácsi, A.**, Aranyosi, J., Beck, Z., Ebbesen, P., Andirkó, I., Szabó, J., Lampé, L., Kiss, J., Gergely, L., and D. Tóth, F.: Placental macrophage contact potentiates the complete replicative cycle of human cytomegalovirus in syncytiotrophoblast cells: role of interleukin-8 and transforming growth factor- β 1.
J. Interferon Cytokine Res. **19**, 1153-1160 (1999) IF: 2.171
2. **Bácsi, A.**, Ebbesen, P., Szabó, J., Beck, Z., Andirkó, I., Csoma, E., and D. Tóth, F.: Pseudotypes of vesicular stomatitis virus bearing envelope antigens of various HIV-1 strains permissively infect human syncytiotrophoblasts cultured in vitro: implications for in vivo infection of syncytiotrophoblasts by cell-free HIV-1.
J. Med. Virol. **64**, 1-11 (2001) IF: 2.867
3. **Bácsi, A.**, Csoma, E., Beck, Z., Andirkó, I., Kónya, J., Gergely, L., and D. Tóth, F.: Induction of human immunodeficiency virus type 1 replication in latently infected syncytiotrophoblast cells by contact with placental macrophages: role of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α .
J. Interferon Cytokine Res. (in press) (2001) IF: 2.171

Egyéb közlemények:

1. Szabó, J., **Bácsi, A.**, Andirkó, I., Kiss, J., Nemes, J., and D. Tóth, F.: Reciprocal interactions between human cytomegalovirus and human T cell leukemia-lymphoma virus type I in monocyte-derived macrophages cultured in vitro.
AIDS Res. Hum. Retroviruses **14**, 699-709 (1998) IF: 2.499
2. Beck, Z., **Bácsi, A.**, Kovács, E., Kiss, J., Kiss, A., Balogh, E., Telek, B., D. Tóth, F., Andirkó, I., Oláh, É., Udvardy, M., and Rák, K.: Changes in oncogene expression implicated in evolution of chronic granulocytic leukemia from its chronic phase to acceleration.
Leukemia and Lymphoma **30**, 293-306 (1998) IF: 1.140

3. Szabó, J., **Bácsi, A.**, Beck, Z., Kiss, J., Andirkó, I., and D. Tóth, F.: Role of interleukin 8 and transforming growth factor β 1 in enhancement of human cytomegalovirus replication by human T cell leukemia-lymphoma virus type I in macrophages coinfecting with both viruses.
J. Interferon Cytokine Res. **19**, 209-217 (1999) IF: 2.171

4. Szabó, J., Beck, Z., Csomán, É., Liu, X., Andirkó, I., Kiss, J., **Bácsi, A.**, Ebbesen, P., and D. Tóth, F.: Differential patterns of interaction between HIV type I and HTLV type I in monocyte-derived macrophages cultured in vitro: Implications for in vivo coinfection with HIV type I and HTLV type I.
AIDS Res. Hum. Retroviruses **15**, 1653-1666 (1999) IF: 2.499

5. Beck, Z., Kiss, A., D. Tóth, F., Szabó, J., **Bácsi, A.**, Balogh, E., Borbély, Á., Telek, B., Kovács, E., Oláh, É., and Rák, K.: Alterations of p53 and Rb genes and the evolution of the accelerated phase of chronic myeloid leukemia.
Leukemia and Lymphoma **38**, 587-597 (2000) IF: 1.140

6. Szabó, J., Cervenák, L., D. Tóth, F., Prohászka, Z., Horváth, L., Kerekes, K., Beck, Z., **Bácsi, A.**, Erdei, A., B. Peerschke, E.I., Füst, G., Ghebrehiwet, B.: Soluble gC1q-R/p33, a cell protein that binds to the globular „Heads” of C1q effectively inhibits the growth of HIV-1 strains in cell cultures.
Clin. Immunol. **99**, 202-211 (2001) IF: 2.242

7. Horváth, A., Bánhegyi, D., Bíró, A., Ujhelyi, E., Veres, A., Horváth, L., Prohászka, Z., **Bácsi, A.**, Tarján, V., Romics, L., Horváth, I., D. Tóth, F., Füst, G., and Karádi, I.: High level of anticholesterol antibodies (ACHA) in HIV patients. Normalization of serum ACHA concentration after introduction of HAART.
Immunobiology (in press) (2001) IF: 2.276

8. Tóth, F., **Bácsi, A.**, Beck, Z., Szabó, J.: Vertical transmission of human immunodeficiency virus. (A review)
Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica (in press) (2001) IF: 0.0

Fontosabb előadások, poszterek

1. **Bácsi, A.**, Aranyosi, J., Szabó, J., Beck, Z., Ebbesen, P., D. Tóth, F.: Placental macrophage contact potentiates the complete replicative cycle of human cytomegalovirus in syncytiotrophoblast cells.
International School for Molecular Biology and Microbiology (ISMBM), 1999, Smolenice, Szlovákia
2. **Bácsi, A.**, Aranyosi, J., Ebbesen, P., D. Tóth, F.: Placental macrophage contact potentiates the complete replicative cycle of human cytomegalovirus in syncytiotrophoblast cells.
3rd Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 1999, Budapest
3. **Bácsi, A.**, Aranyosi, J., Beck, Z., Szabó, J., D. Tóth, F.: Syncytiotrophoblast cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus by contact with placental macrophage.
13th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, 1999, Budapest
4. **Bácsi, A.**, Aranyosi, J., Szabó, J., Beck, Z., D. Tóth, F.: A placenta macrophagok lehetséges szerepe a human cytomegalovírus transzplacentális átvitelében.
Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 1998, Miskolc
5. **Bácsi, A.**, Szabó, J., Nemes, J., Kiss, J., D. Tóth, F.: A humán cytomegalovírus és a human T-sejtes leukaemia-lymphoma I. típusa közötti kölcsönhatás vizsgálata CD4⁺ T-lymphocytá sejtvonalakban.
Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 1996, Nyíregyháza
6. Szabó, J., Beck, Z., **Bácsi, A.**, D. Tóth, F.: Studies on the susceptibility of natural killer cells to HIV-1 strains of various tropism.
14th European Immunology Meeting EFIS 2000, Poznan, Lengyelország

7. Beck, Z., Szabó, J., **Bácsi, A.**, D. Tóth, F.: Induction of full replication cycle of human cytomegalovirus by Tax protein in CD4⁺ cells.
First Joint Meeting of the Slovenian Society for Microbiology and the Hungarian Society for Microbiology, 2000, Keszthely
8. Szabó, J., **Bácsi, A.**, Beck, Z., Kiss, J., Andirkó, I., D. Tóth, F.: Enhancement of human cytomegalovirus replication by HTLV-I in macrophages: Role of Tax-induced interleukin-8 and transforming growth factor- β 1 production.
Ninth International Conference on Human Retrovirology: HTLV 1999, Kagoshima, Japan
9. Szabó, J., Beck, Z., Csomán, É., Liu, X., Andirkó, I., Kiss, J., **Bácsi, A.**, Ebbesen, P., D. Tóth, F.: Differential patterns of interactions between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and human T-cell leukaemia-lymphoma virus type I (HTLV-I) in macrophages cultured *in vitro*: Implications for *in vivo* pathogenesis.
The Fourth European Conference on Experimental AIDS Research 1999, Tampere, Finnország