

A Herpes simplex és a Vesicularis stomatitis vírusok hatása a p63 és a Bax proteinek expressziós mintázatára epitheliális sejtekben

Ph.D. Tézis

Dr. Orosz László

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvosi Kar,
Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet

2010

BEVEZETÉS

A vírusok szaporodásuk során számos, szigorúan szabályozott sejtélettani folyamatra hatással vannak. Ezek megzavarásával olyan mélyreható szerkezeti és funkcionális károsodásokat okoznak, melyek a fertőzött sejtek pusztulásához vezethetnek. Ez kiemelkedően fontos szerepet játszik a vírusbetegségek patogenezisében, mivel az egyes szövetek működési és szerkezeti integritását is megbonthatja. Azonban néhány vírus esetében ez a sejtkárosító hatás kiaknázható, például virális onkolitikus terápia formájában.

A **Herpes simplex vírusok** (HSV-k) által okozott fertőzésekben megfigyelhető jelentős sejtkárosító hatás mechanizmusa is komplex, melyben nekrozis, apoptózis és autofágia/xenofágia is szerepet játszik. A HSV-k behatolási kapui a bőr sejtei, a nyálkahártyák, illetve az okuláris felszín szövetei. A vírusok itt replikálódnak, majd a keletkező utódvirionok az érintett terület szenzoros idegsejtjeibe jutva, ún. retrográd axonális transzporttal kerülnek az érzőganglionokba, a bulbus olfactoriusba, az agytörzsbe és a temporális lebenybe. Az idegrendszer sejtjeiben a virionok ún. látens infekciót alakítanak ki, melyet az apoptózis inhibíciója, és ennek következtében a gazdasejt túlélése jellemez. Különböző szisztémás vagy lokális stresszorok hatására azonban a virionok reaktiválódnak és a fertőzés kiújul. A HSV-1 és a HSV-2 számos enyhe és igen súlyos betegség kórokozója is lehet, mint például a herpes labialis, a gingivostomatitis herpetica, a herpes genitalis vagy a keratitis herpetica. A különböző HSV által okozott megbetegedések patomechanizmusa komplex, a kialakuló szövetkárosodásokban ugyanúgy szerepe van a vírus direkt citopátiás hatásának, mint az indirekt, immunrendszer által mediált eseményeknek. Habár a HSV-k által okozott kórképek igen gyakoriak és komoly következményekkel is járhatnak, e vírusok sejtkárosító hatásának pontos molekuláris mechanizmusa egyelőre nem teljesen tisztázott.

Számos érdekes tudományos közlemény bemutatta a **Vesicularis stomatitis vírus** (VSV) erőteljes, inherens onkolitikus aktivitását, melyet a rosszindulatú daganatok terápiájában is ki lehet használni. A vírus replikációja tumorsejtekben igen hatékony, míg a normál szövetek interferon (IFN) válasza megakadályozza a szaporodását. A VSV-mediált onkolízis apoptotikus mechanizmusokhoz kapcsolatosan valósul meg. A fertőzés következtében a mitokondriumok integritása megbomlik, a kiszabaduló mediátorok pro-apoptotikus hatása miatt pedig bekövetkezik a sejthalál. Szakirodalmi adatok igazolták azt is, hogy a VSV által előidézett apoptózis háttérében a vírusnak az ún. Bcl-2 szabályozó proteinekre gyakorolt hatása állhat. Számos daganatos eredetű sejtvonalban sikerült igazolni a VSV sejtkárosító hatását, így többek közt tüdő, vese, bél, kötőhártya, petefészek, emlő, endometrium, prosztata, központi idegrendszeri és hematológiai tumorok esetében. Mindezek ellenére még számos más szöveti típusú daganatban nem vizsgálták a VSV hatását, továbbá az annak alapját képező molekuláris mechanizmusok sem maradéktalanul felderítettek.

A **p63 transzkripció faktor** család tagjai számos fontos sejtélettani funkciót szabályoznak, mint például a sejtciklus progresszióját, a proliferációt, az adhéziót, a sejtek öregedését és pusztulásuk bizonyos formáit is, például az apoptózist. Különböző p63 izoformák ismertek, melyek alapvetően két különböző promoterről való transzkripció és alternatív splicing következtében alakulnak ki. Az első

promóterről átíródó variánsok az N-terminálisukon ún. transzaktiváló domént is tartalmazó (TA), míg a másodikról származók ezt a domént nélkülöző (Δ N) izoformák. Mind a TA, mind pedig a Δ N transzkriptumok alternatív splicing révén legalább további három-három, eltérő C-terminálissal bíró α , β és γ izoformát alakíthatnak ki. A TAp63 variánsokról bebizonyosodott, hogy a sejtciklus leállításában és az apoptózis indukcióban játszanak szerepet. Ezzel szemben a Δ Np63 izoformák mind a TAp63, mind pedig a p53 proteinek hatását ellensúlyozzák, sejtproliferációt indukálnak. Számos tudományos közlemény igazolta, hogy a p63 transzkripciós faktor családnak alapvető szerepe van a hámszövetek, így a bőr és a szem sejtjeinek differenciálódásában és életciklusának szabályozásában is. Ezek a fehérjék szerepet játszanak továbbá az epitélium daganatainak kialakulásában, valamint egyéb fiziológiás és patológiás folyamatokban, melyek e szövettípust érintik.

A **Bcl-2-asszociált X protein**, vagy **Bax** a Bcl-2 géncsalád terméke, pro-apoptotikus funkciója ma már számos szakirodalmi adattal igazolt. A bax gén – hasonlóan a p63 génjéhez – számos izoformát kódol, melyek közül a Bax- α jól ismert, mint az apoptózis indukció egyik kulcsfontosságú komponense. Ez a variáns a mitokondriumok külső membránjának permeabilizációjában játszik szerepet, amelynek következtében pro-apoptotikus hatású molekulák szabadulnak ki az organellumból, és ez kaszpáz-aktivációhoz valamint apoptózishoz vezet. Egy másik izoforma, a Bax- β konstitutív expresszióját számos emberi sejtben kimutatták. A variáns szintjét proteaszomális degradáció kontrollálja. A Bax- α -hoz hasonlóan ez a protein is indukálja az intrinszik apoptotikus útvonalat, továbbá serkenti magának a Bax- α -nak az aktivitását is. Számos szakirodalmi adat igazolja, hogy a Bax- α proteolitikus hasítása még tovább növeli a lehetséges variánsok számát. Az apoptózis késői fázisában bekövetkező, celluláris enzimek által katalizált reakció a p21 Bax-ból p18 Bax keletkezéséhez vezet. Utóbbi felhalmozódása pedig igen fontos az apoptózis erősítése és gyorsítása szempontjából.

A bőr és a szem hámsejtjei számos károsító hatásnak vannak kitéve, többek közt humán patogén mikroorganizmusok behatolási kapujaként is szolgálnak. A pro-apoptotikus TAp63 és a sejtek túlélését mediáló Δ Np63 izoformák mennyisége közti finom egyensúly megzavarásával ezek a stresszorok mélyreható változásokat okozhatnak a keratinociták és az okuláris felszín epiteliális sejtjeinek életképességében. Mindezek ellenére a mikroorganizmusok által okozott fertőzések hatása a p63 és a Bax fehérjék expressziós mintázatára még nem teljesen tisztázott.

CÉLKITŰZÉSEK

- A p63, p73 és a Bax fehérjék kifejeződési mintázatának tanulmányozása HSV-vel fertőzött primér keratinocitákban és HaCaT keratinocita sejtekben.
- A p63 és a Bax fehérjék expressziós mintázatának meghatározása HSV-1-el fertőzött, nyúl szaruhártya eredetű SIRC sejtvonalon.
- A p63 és a Bax fehérjék kifejeződési mintázatának tanulmányozása VSV-vel fertőzött HaCaT keratinocita sejtvonalon.

EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A HSV fertőzés hatása a p63, a p73 és a Bax fehérjék expressziós mintázatára HaCaT és SIRC sejtekben

Eredményeink alapján a HSV-1 hatékonyan szaporodik és erőteljes sejtkárosító hatást vált ki a HaCaT és SIRC epiteliális sejtvonalakon, továbbá az apoptózis fontos szerepet játszik a fertőzött keratinociták és korneális sejtek károsodásában.

A korábbi szakirodalmi adatokkal összhangban a kísérleteinkben különböző p63 izoformák jelenlétét tudtuk kimutatni a HaCaT sejtekben és a primér keratinocitákban. Sikerült továbbá megállapítanunk, hogy ezek közül a $\Delta Np63\alpha$ a predominánsan jelen lévő variáns, melyet valószínűleg a foszforiláció általi poszttranszlációs modifikációja miatt dupla sávként azonosítottunk a Western blot analízis során. Kísérleteink elsőként igazolták a $\Delta Np63\alpha$ konstitutív expresszióját a nyúl szaruhártya eredetű SIRC sejtvonalon. A HSV-1 fertőzés szignifikáns csökkenést eredményezett a $\Delta Np63\alpha$, és igen jelentős emelkedést a TAp63 γ expressziójában. Ezek a változások szoros korrelációban álltak a vírus replikációjával. Eredményeink alapján a TAp63 γ mennyiségének génlecsendesítés módszerrel történő csökkentése növelte a fertőzött sejtek életképességét, ami arra utal, hogy ez a p63 variáns szerepet játszhat a HSV-1 komplex sejtkárosító hatásában. Számos érdekes tudományos közlemény bemutatta, hogy a HSV nukleinsav szintézise aktiválja a sejten belül az ún. DNS-károsodási válasz útvonalat (DDR). Más eredmények pedig igazolták, hogy a genotoxikus stressz fokozott $\Delta Np63$ degradációval és TAp63 akkumulációval jár együtt, mely valószínűleg a DDR részeként időt biztosít a sejteknek, hogy kijavítsák a károsodott nukleinsavat vagy apoptózissal elpusztuljanak. Kísérleteinkben a virális DNS replikációját gátló ACG teljesen megszüntette a HSV által kiváltott TAp63 γ akkumulációt mind a HaCaT, mind pedig a SIRC sejtekben, ami arra utal, hogy ez a folyamat szükséges a p63 expressziós mintázatában bekövetkező változásokhoz. Ez a megfigyelés felveti a lehetőséget annak, hogy a p63 kifejeződésében tapasztalt eltérések a DDR következményei lehetnek, azonban nem zárják ki a különböző, HSV-1 által kódolt proteinek szerepét sem.

Ezen megfigyelések alapján további kísérleteinkben a szintén a p63 transzkripciós faktor családba tartozó p73 expressziós mintázatának változásait is megvizsgáltuk. Hasonlóan a p63-hoz, a p73 is két transzkripciós starthellyel rendelkezik, ezáltal TA és ΔN izoformák kialakulására van lehetőség az amino-terminálison. A karboxi-terminális variánsai itt is alternatív splicing révén képződnek; ezek közül az α , β , γ , δ , ϵ , ζ és η ismertek. A TAp73 izoformák számos p53 és p73 által kontrollált gént transzaktiválnak, ezáltal az apoptózis-indukcióban is részt vesznek. Ezzel szemben a $\Delta Np73$ variánsok kisebb transzkripciós aktivitással rendelkeznek, és főleg negatív hatásokat közvetítenek, mint például az apoptózis inhibícióját. Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az 50 kDa molekulatömegű p73 izoforma expressziója csökkent, míg a 44,5 kDa tömegűé emelkedett a HSV-1-el fertőzött HaCaT sejtekben. Szakirodalmi adatok alapján az 50 kDa molekulatömegű variáns a $\Delta Np73\beta$ -nak, a 44,5 kDa tömegű pedig a TAp73 δ -nak felel meg. A detektált p73 izoformák pontosabb azonosításához további vizsgálatokra van szükség. Mindezek ellenére adataink bizonyítják, hogy a

HSV-1 fertőzés jelentősen befolyásolja a p73 izoformák expressziós mintázatát a HaCaT keratinocitákban. A HSV-1 által kiváltott stressz válasz jobb megértése érdekében a pro-apoptotikus regulátor Bax expresszióját is tanulmányoztuk, melyről ismert, hogy szintjét a TAp63 α és a TAp63 γ emeli. Kísérleteinkben a Bax- α kifejeződésében semmilyen változást nem tapasztaltunk. Ezzel szemben a Bax- β expressziójában igen markáns emelkedést okozott a HSV-1 fertőzés a HaCaT és a SIRC sejtek esetében. Ezek alapján a Bax- β expresszió fokozódásának fontos szerepe lehet a keratinociták és a korneális sejtek HSV-1 infekcióra adott apoptotikus válaszában. Szakirodalmi adatok alapján a HSV genomja ubikvitináló és deubikvitináló enzimeket is kódol, melyek mind virális, mind celluláris fehérjék posztranszlációs módosítására alkalmasak. Ez alapján a Bax- β szubsztrátja lehet a HSV-1 deubikvitináló enzimének. A Bax- β stabilizálódásának pontos molekuláris mechanizmusa azonban egyelőre még nem teljesen felderített.

A HSV-1 és a HSV-2 nukleotid szekvenciájukban, reaktivációs rátájukban, a gazdasejtekből kiváltott transzkripciós válaszban és az általuk okozott kórképekben is különböznek. Számos tudományos közlemény bemutatta a két vírus apoptózist moduláló hatása közti eltéréseket is. Mindezek alapján kísérleteinkben megvizsgáltuk a HSV-2 által a HaCaT sejtekben kiváltott apoptózis mértékét és ehhez kapcsolódóan a p63, a p73 és a Bax proteinek expressziójában bekövetkező változásokat. Habár az apoptózis előfordulása arányaiban összevethető volt a két különböző vírussal fertőzött HaCaT sejtekben, mégis a HSV-1-el inokulált kultúrákban a korai apoptotikus választ mutató populáció jelentősebb volt, mint a HSV-2 esetében. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a HSV-1 által megfertőzött, igen magas TAp63 γ expressziós szinttel jellemezhető keratinociták hajlamosabbak apoptózisra, mint a HSV-2-vel fertőzött sejtek, melyek inkább nekrozis vagy autofágia révén pusztulhatnak el. Hasonlóan a HSV-1 esetében tapasztaltakhoz, a HSV-2-vel fertőzött HaCaT keratinociták is igen jelentős csökkenést mutattak a Δ Np63 α és az 50 kDa molekulatömegű p73 izoforma kifejeződésében. A HSV-1-től eltérően azonban a HSV-2 hatására a TAp63 γ szintje változatlan maradt, és a 44,5 kDa molekulatömegű p73 variáns expressziója pedig csökkent. A HSV-2 infekció további következménye volt a Bax- β szintjének igen enyhe emelkedése, melynek mértéke jóval elmaradt a HSV-1-el fertőzött sejteknél detektálttól.

Eredményeinket egybevetve elmondható, hogy a HSV-1 és a HSV-2 hatékonyan szaporodik és erőteljes sejtkárosító hatást vált ki a keratinocitákon és a szaruhártya eredetű hámsejteken, melyben az apoptózisnak komoly szerepe van. Első ízben sikerült kimutatnunk, hogy mindezekkel a változásokkal párhuzamosan a p63, a p73 és a Bax fehérjék expressziós mintázatát a HSV-1 és a HSV-2 eltérő módon befolyásolja. A fertőzött HaCaT és SIRC sejtekben megfigyelt deregulált p63 expresszió valószínűleg része lehet annak a folyamatnak, melynek során a HSV-k megzavarják az epiteliális sejtek funkcióit, és ez a pusztulásukhoz vezet. Ezek az eredmények hozzájárulhatnak a HSV-k által okozott kórképek patogenezisének jobb megértéséhez, tekintve a p63 transzkripciós faktor család alapvető szerepét a hámsejtek homeosztázisában.

A VSV fertőzés hatása a p63 és a Bax fehérjék expressziós mintázatára HaCaT sejtekben

Adataink alapján a VSV hatékonyan szaporodik és erőteljes sejtkárosító hatást vált ki a HaCaT keratinocita sejtvonalon. Megfigyeléseink szerint az apoptózis igen fontos szerepet játszik a kultúrák 72 órán belüli pusztulásában. Így kísérleteink első ízben igazolták az immortalizált keratinociták permisszivitását a VSV súlyos citopátiás effektust okozó replikációja iránt.

A VSV-vel fertőzött HaCaT keratinocitákban jelentősen lecsökkent a $\Delta Np63\alpha$ expressziója, ami szoros korrelációt mutatott a vírus replikáció kinetikájával és a kialakuló apoptózissal is. Ezek alapján a VSV által mediált $\Delta Np63\alpha$ expresszió-csökkenésnek kulcsszerepe lehet a fertőzött keratinociták apoptotikus válaszában.

A korábbi szakirodalmi adatokkal összhangban a kísérleteink során a HaCaT sejtekben jelentős mértékű p53^{mt} kifejeződést detektáltunk. A VSV fertőzés eredményeként viszont számos esetben csökkent a keratinociták p53^{mt} expressziója. Mivel azonban apoptózist azokban a fertőzött HaCaT kultúrákban is ki tudtunk mutatni, ahol a p53^{mt} szintje nem változott, így ennek a jelenségnek valószínűleg nem az apoptózis indukciójában, hanem inkább a súlyosan károsodott keratinocitákban bekövetkező sejthalál végső fázisában lehet szerepe.

Ezen megfigyelések alapján további kísérleteinkben a különböző Bax izoformák expresszióját tanulmányoztuk. Eredményeink szerint a HaCaT sejtek konstitutíven kifejezik a Bax- α variánst. A VSV-vel történő fertőzés után a HaCaT sejtekben igen jelentős Bax- α és p18 Bax expresszió fokozódást sikerült kimutatnunk. A p18 Bax valószínűleg a Bax- α hasítási terméke, mely az ún. érzékenyítő típusú BH3-only Bcl-2 fehérjékhez hasonlatos funkcióval bír. Ez a variáns sokkal hatékonyabban károsítja a mitokondriumok integritását, és ezáltal hatásosabban is indukál apoptózist, mint a Bax- α . Ezek alapján a Bax- α és a p18 Bax expressziójában a VSV fertőzés hatására bekövetkező igen jelentős emelkedés pro-apoptotikus folyamatok jelzője lehet, és talán szerepe van az apoptózis erősítésében, amely hozzájárul a vírus erőteljes sejtkárosító hatásához.

Mindent egybevetve, adataink első ízben demonstrálták, hogy a VSV hatékonyan szaporodik és apoptózist indukál az immortalizált HaCaT keratinocita sejtvonalon. A p63 és a Bax proteinek VSV-indukált expresszió változása valószínűleg a sejtek apoptotikus válaszában részét képezik, illetve egyéb pro-apoptotikus stimulusokra érzékenyítenek. Eredményeink így az immortalizált keratinocitákkal bővítik azon sejtípusok körét, melyek érzékenyek a VSV onkolitikus hatására. Ezek a megfigyelések reményeink szerint tovább serkentik a VSV-n alapuló viroterápiás módszerek fejlesztését, hogy ez az új terápiás lehetőség a bőr hámeredetű tumorainak gyógyításában is felhasználható legyen.

ÖSSZEFOGLALÁS

A tézisben foglalt új eredmények:

1. Mind a HSV-1, mind a HSV-2 fertőzés jelentősen károsította a primér keratinocitákat, a HaCaT és a SIRC sejteket, de jelentős különbségeket tapasztaltunk a két HSV típus apoptózis-moduláló hatásában.

2. A HSV-1 és a HSV-2 típus-specifikusan változtatta meg a p63, a p73 és a Bax fehérjék expresszióját a HaCaT, illetve a SIRC sejtekben és a primér keratinocitákban. A pro-apoptotikus és a sejtek túlélését mediáló p63, p73 és Bax izoformák mennyisége közti finom egyensúly megzavarásával ezek a vírusok mélyreható változásokat okozhatnak a bőr és az okuláris felszín szöveti homeosztázisában.
3. A virális DNS-replikáció szükséges a $\Delta Np63\alpha$ szintjének csökkenéséhez, valamint a TAp63 γ és a Bax- β felhalmozódásához a HSV-1-el fertőzött HaCaT keratinocitákban és SIRC korneális sejtekben. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a HSV-1 által okozott p63 és Bax expresszió modulálása a celluláris DNS károsodási válasszal kapcsolatos, melyet a vírusgenom replikációja vált ki és a sejtek stressz reakciójának részét képezheti.
4. A VSV erőteljes onkolitikus aktivitást fejt ki az immortalizált keratinocitákra, amely apoptotikus mechanizmusokhoz kötött. Ezen megfigyelések alapján a VSV hatékony terápiás eszközzé fejleszthető a bőr hámeredetű daganatainak kezelésében.
5. A VSV modulálja a p63 és a Bax kifejeződési mintázatát az immortalizált keratinocitákban. A p63 és a Bax proteinek VSV-indukált expresszió változása valószínűleg igen fontos esemény a fertőzött sejtek apoptotikus válaszreakciójában, és egyéb pro-apoptotikus stimulusokra is érzékenyít.

A TÉZISHEZ KÖZVETLENÜL KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK:

- I. Megyeri, K., **Orosz, L.**, Kormos, B., Pásztor, K., Seprényi, G., Mándi, Y., Bata-Csörgő, Z., Kemény, L. (2009). The Herpes simplex virus-induced demise of keratinocytes is associated with a dysregulated pattern of p63 expression. *Microb. Infect.* **11**, 785-794. IF: 2.757.
- II. **Orosz, L.**, Gallyas, É., Kemény, L., Mándi, Y., Facskó, A., Megyeri, K. (2010). Involvement of p63 in the *Herpes simplex virus-1*-induced demise of corneal cells. *J. Biomed. Sci.* **17**:47. IF: 2.007.
- III. Megyeri, K., **Orosz, L.**, Kemény, L. (2007). Vesicular stomatitis virus infection triggers apoptosis associated with decreased $\Delta Np63\alpha$ and increased Bax levels in the immortalized HaCaT keratinocyte cell line. *Biomed. Pharmacother.* **61**, 254-260. IF: 1.418.

Összesített impakt faktor: 6.182

A TÉZISHEZ KÖZVETLENÜL NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK:

- I. Stiller, I., Pusztai, R., Sombor, E., **Orosz, L.**, Pál, A., Taródi, B. (2006). Prevalence and avidity of human herpesvirus-6 specific IgG antibodies in pregnant women in Hungary. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **53**, 25-34.
- II. Tizslavicz, Z., Endrész, V., Németh, B., Megyeri, K., **Orosz, L.**, Seprényi, G., Mándi, Y. (2010). Inducible expression of human β -defensin 2 by *Chlamydomonas pneumoniae* in brain capillary endothelial cells. *Innate Immun.* (In press.) IF: 2.206

Összesített impakt faktor: 2.206

Kumulatív impakt faktor: 8.388