

**B-sejtek és vírusok kölcsönhatásainak vizsgálata patogén
(EBV) általi transzformáció és lentivirális vektor (HIV-1)
általi transzdukció segítségével**

Dr. Kvell Krisztián

PhD tézis

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Immunológiai és Biotechnológiai Intézet**

2007

B-sejtek és vírusok kölcsönhatásainak vizsgálata patogén (EBV) általi transzformáció és lentivirális vektor (HIV-1) általi transzdukció segítségével

Dr. Kvell Krisztián

PhD tézis

Program-vezető: Prof. Dr. Németh Péter PhD

Témavezetők: Dr. Balogh Péter PhD¹, Prof. Rudolf H. Zubler MD PhD²
és Prof. Dr. Németh Péter PhD¹

1: Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

2: Research and Development Unit, Division of Hematology
Department of Internal Medicine, Geneva University Hospitals, Switzerland

BEVEZETÉS

Az Epstein-Barr vírus (EBV) a herpesvírus-család tagja, humán patogén kettősláncú DNS vírus kiterjedt genetikai állománnyal (172 kb) és programmal (85 gén). Az EBV kifejezett humán B-sejt tropizmussal rendelkezik. A felnőtt lakosság több mint 90%-a fertőzött a vírussal. A vírus élete bifázisos: a kezdeti lítikus ciklust követő gyors replikáció utáni latens fázisban a hosszú-életű memória B-sejtekben szunnyad. Az első fázisban kifejezett, míg a latencia-programok alatt visszafogott a virális gének aktivitása. Változatos kórképekért felelős: mononukleózis, Burkitt-limfóma, nazopharingeális karcinóma, Hodgkin-kór és az AIDS-betegekben illetve transzplantáltakban megfigyelt limfoproliferációs betegség (PTLD) kialakulásáért. A PTLD betegség erős és tartós immun-szuppresszió esetén megfigyelhető EBV reaktiváció következménye. PTLD betegséget nem csak endogén EBV reaktiváció, hanem EBV szuperinfekció is kiválthat immunhiányos állapotban. Az egyes kórképekben; lítikus fázisban és latens programok esetén jellegzetes, egymástól jelentősen eltérő EBV gén-expressziós mintázatok figyelhetők meg. Az EBV alapú virális vektorok alkalmazása már létező, azonban ma még kiforratlan technika. Továbbá valószínűleg még a technika jelentős fejlődése esetén is kétes értékű lenne egy EBV-alapú virális vektor (mint a vizsgálat szempontjából inert(?) vektor) használata egyes EBV-gének illetve komplett EBV gén-expressziós mintázatok vizsgálatára humán primer B-sejtekben.

A humán immun-deficiencia vírus-1 (HIV-1) humán patogén retrovírus, mely a lentivírusok családjába sorolható RNS vírus. Biotechnológiai módszerekkel a vad típusú vírustól kiindulva HIV-1 alapú mesterséges virális vektorok készíthetők. Az eredeti HIV genom virulenciáért és replikációért felelős génjének eltávolításával létrehozott vektor biztonságosan használható standard P2 laboratóriumi körülmények között. Amennyiben a vad típusú vírus felszínén levő gp120 sejt felszíni ligand helyett VSV-G (vezikuláris stomatitis vírus G-protein) fehérjét pszeudotipizálunk, akkor a vektor tropizmusát jelentősen

kiterjesztjük és az így gyakorlatilag bármely emlős faj tetszőleges szövetének sejtjeihez képes kapcsolódni. A leírt módosításoknak köszönhetően egy biztonságos, nagyon sokoldalú és rugalmas vektort kapunk, mellyel tetszőleges gént vagy géneket építhetünk osztódó és nyugvó, sejtvonalak és primer sejtek magjába tartósan. A lentivirális vektorok kutatási és génterápiás célzattal történő *in vitro* és *in vivo* felhasználása egyaránt rendkívül ígéretes. Ha sikerülne olyan humán primer B-sejt monokultúra rendszert létrehozni, melyben hatékonyan használhatók lentivirális vektorok, az lehetőséget adna többek között egyes EBV-gének illetve részenként összeillesztve komplett EBV gén-expressziós programok (lítikus és latens) humán primer B-sejtre kifejtett hatásának vizsgálatára, a kísérlet szempontjából inert karrier vektor (HIV-1 alapú lentivirális vektor) felhasználásával.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Az endogén EBV reaktiváció következtében kialakuló humán B-sejtes PTLD betegség állatkísérletes modellezése ember-egér (hu-SCID) kiméra rendszerben.
2. A PTLD betegség állatkísérletes modelljének standardizálása ismert EBV törzs *in vivo* elvégzett szuperinfekciójával, a bevitt exogén EBV törzs dominanciájának kimutatása.
3. Lentivirális vektor hatékony felhasználására alkalmas humán primer B-sejt monokultúra rendszer létrehozása, génbeviteli hatékonyság vizsgálata marker gén (GFP) felhasználásával.
4. GFP mellett funkcionálisan aktív intracelluláris (vFLIP) és szekretált (IL-4) transzgén bevitele és funkcionalitásuk vizsgálata humán primer B-sejtekben ('proof of principle').

ANYAG ÉS MÓDSZER

Humán sejtek izolálása

Egészséges donorok véréből előállított buffy-coatot Ficoll-gradiens centrifugálással tisztítottam tovább. A kapott fehérvérsejt-szuszpenzióból (PBMC) az adherens sejtek kitapasztása után (PBL) anti-CD19-beads technikával nagy tisztaságú (>97%) B-sejt szuszpenzió nyertünk.

SCID egerek

A C.B.17 scid/scid homozigóta egereket SPF körülmények között antibiotikus védelemben tartottuk. Az állatokat rendszeresen követtük, a 'leaky' egyedeket a kísérletekből kizártuk.

Hu-SCID kiméra létrehozása

Megfelelő mennyiségű ($3-6 \times 10^7$) PBMC i.p. injekciójával kimérizmus alakítható ki SCID egérben. A fajok közti immunológiai kimérizmus kb. 4 hét után funkcionális.

Exogén EBV törzs

A B95-8 selyemmajom sejtvonal EBV tartalmú felülűszója a Baranya Megyei ÁNTSZ Virologiai Laboratóriumából származik. A felülűszó infektív EBV virionokat tartalmaz, melyet i.p. injekcióval juttattunk 10 nappal korábban létrehozott hu-SCID kimérákba.

Hu-SCID kiméra rendszerek vizsgálata

A humán B-sejtes limfoproliferáció következtében moribund állapotú egerekből peritoneális sejteket és nyirokszerveket távolítottunk el. Sejtfelszíni és intracelluláris jelölést követően a sejteket **flow-cytometriás analízissel** vizsgáltuk. A nyirokszervekből (lép, nyirokcsomók) metszeteket készítettünk, melyeket fixálás után **immunhisztokémiai analízisnek** vetettünk

alá. Egyes állatok lépéből RNS izolálást követően aktív EBV törzseket azonosítottunk irodalomban közölt primerek és kereskedelmi forgalomban kapható reagensek felhasználásával **RT-PCR módszerrel**. Ismert EBV törzsek DNS-ét használtuk kontrollként.

B-sejt monokultúra rendszer

Nagy tisztaságban izolált (lásd fent) humán primer B-sejteket aktiváltunk CpG oligo, anti-humán Ig, humán rekombináns IL-2 és IL-10 jelenlétében. A sejtek a kultúra 3. napján hatékonyan fertőzhetők lentivirális vektorral. A kultúra időtartama maximum 10 nap, mialatt osztódás és Ig szekréció egyaránt mérhető.

Lentivirális vektorok készítése

A felhasznált mono- (GFP) és bicisztronos (vFLIP-GFP vagy IL-4-GFP) vektorok a Genfi Orvostudományi Egyetemen (CMU) és a Genfi Kantonális Kórházzal (HUG) kollaborációban készültek.

Transzfektált B-sejtek vizsgálata

A transzfektált sejtekben a transzgenikus fehérjék a kultúra 48 óra elteltével aktívak. Minden alkalmazott módszerhez kereskedelmi forgalomban kapható antitesteket és reagenseket használtunk. Sejtfelszíni és intracelluláris jelölést követően **flow-cytometriás analízissel** vizsgáltuk a sejteket transzgen expresszió tekintetében. A bevitt vFLIP transzgenikus fehérje jelenlétét **Western-blot módszerrel** is kimutattuk, védő hatását natív kultúrában és **flow cytometriás sortolással** dúsított sejteken is vizsgáltuk FasL jelenlétében. A transzfektált sejtek által szekretált IL-4 mennyiségét **ELISA módszerrel** határoztuk meg. A transzgenikus IL-4 funkcionalitását másodlagos kultúrákban bizonyítottuk (CD40L kultúrában fokozott proliferáció, EL4/B ko-kultúrában IgE termelés).

EREDMÉNYEK

1. A hu-SCID kiméra rendszerben az endogén EBV reaktiváció következtében fatális humán B-sejtes limfoproliferáció alakul ki. Az elváltozás több jegye megegyezik a humán PTLD betegséggel. A kísérletes állatok túlélése nagymértékű időbeli varianciát mutat (46-67 nap).
2. A PTLD betegség modellje az állatok túlélése tekintetében jelentősen standardizálható (30-32 nap) ismert EBV törzs *in vivo* elvégzett szuperinfekciójával. Az exogén bevitt EBV törzs (B95-8) dominanciája a kiméra szerveiben bizonyítható.
3. CpG oligo, α -Ig, IL-2 és IL-10 aktivációval olyan maximum 10 nap időtartamú humán primer B-sejt monokultúra rendszer hozható létre, melyben a B-sejtek nagy hatékonysággal transzfektálhatók lentivirális monocisztronos vektorokkal (kb. 25-30% GFP+ populáció).
4. Lentivirális bicisztronos vektorral B-sejtekbe GFP mellett egyéb funkcionálisan aktív transzgenek is hatékonyan bejuttathatók (kb. 15% GFP+ populáció). A lentivirális vektorral bevitt vFLIP gén hatékonyan megvédte a GFP+ sejteket FasL mediálta apoptózis ellen. Amennyiben IL-4 gént juttattunk lentivirális vektorral B-sejtekbe, a GFP+ B-sejtek által szekretált transzgenikus IL-4 szintén funkcionálisan aktív volt (proliferáció-fokozás, IgE izotípus-váltás) másodlagos B-sejt kultúra rendszerekben.

MEGBESZÉLÉS

Hu-SCID kiméra rendszer létrehozásakor egészséges emberi donorokból származó fehérvérsejtekkel (PBMC) repopulálunk immunhiányos egereket (SCID törzs). A rendszerben az immunológiai kimérizmus működőképes, a limfocita-recirkuláció megtartott, immunológiai memória hívható elő és alakítható ki. A kimérában mégis súlyos immunhiányos állapotot idéző EBV reaktiváció következtében poliklonális, fatális kimenetelű humán B-sejtes limfoproliferáció alakul ki, akárcsak PTLD esetében. Reaktiváció során az EBV gén-expressziós mintázat ismerten jelentős változáson megy keresztül. A limitált EBV gén-expressziót mutató I-es latencia-programból rohamosan a III-as latencia programig bővül az aktív EBV gének köre. Az endogén reaktivációnál nagyobb eséllyel és ütemben fejlődik ki humán PTLD és modellje exogén EBV szuperinfekció esetén, mely rögtön a III-as latencia programot indítja el.

A korábban irodalomban leírt humán primer B-sejt transzfekciós rendszerek vagy csak kis hatékonysággal működtek (pl. CD40L rendszer), vagy csak kokultúra rendszerben voltak kellően hatékonyak (pl. EL4/B-sejt rendszer). A témában fontos előrelépés, hogy egyedülálló módon hatékony lentivirális transzfekciós módszer sikeres adaptálását végeztük egy humán primer B-sejtes monokultúra rendszerben (CpG rendszer). Marker gén mellett egyéb, modell értékű intracelluláris és szekretált transzgenikus fehérjék génjeit építettük be a célsejtekbe. A transzgenikus fehérjék funkcionálisan tökéletesen működőképesek voltak.

A lentivirális technikák hatékony adaptálása humán primer B-sejtes monokultúrában új távlatokat nyithat többek között az egyes EBV gének és komplett EBV gén-expresszió mintázatok kutatásában. Lehetővé teszi a humán primer B-sejteken végzett vizsgálatokat a genetikailag gyakran jelentősen (pl. endogén EBV következtében) megváltozott humán B-sejtvonalak használata helyett oly módon, hogy a kísérletekhez a vizsgált (pl. EBV) gének vagy géncsoportok szempontjából inert virális vektort (HIV-1 alapú vektor) alkalmazunk.

PUBLIKÁCIÓK

Összes impakt faktor: 27.35

A tézis alapját képező közlemények (impakt faktoruk: 23.64)

Kvell K, Nguyen TH, Salmon P, Glauser F, Werner-Favre C, Barnet M, Schneider P, Trono D, Zubler RH.

Transduction of CpG DNA-stimulated primary human B cells with bicistronic lentivectors.
Mol Ther. 2005 Nov;12(5):892-9. impakt faktor: 6.13

Bovia F, Salmon P, Matthes T, **Kvell K**, Nguyen TH, Werner-Favre C, Barnet M, Nagy M, Leuba F, Arrighi JF, Piguet V, Trono D, Zubler RH.

Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV-1-derived lentiviral vectors.

Blood. 2003 Mar 1;101(5):1727-33. impakt faktor: 10.12

Kvell K, Balogh P, Nemeth P.

[Clinical aspects of Epstein-Barr-virus-associated lymphoproliferative disease]
Orv Hetil. 2002 Apr 7;143(14):713-9. Review. Hungarian.

Kvell K, Balogh P, Nemeth P.

Fine-tuning the EBV+ hu-PBL-SCID xenogeneic chimera model using in vivo superinfection.
Pathol Oncol Res. 2000;6(4):280-6.

Cooper EL, **Kvell K**, Engelmann P, Nemeth P.

Still waiting for the toll?

Immunol Lett. 2006 Apr 15;104(1-2):18-28. impakt faktor: 1.71

Kvell K, Czompoly T, Pikkarainen T, Balogh P.

Species-specific restriction of cell surface expression of mouse MARCO glycoprotein in murine cell lines.

Biochem Biophys Res Commun. 2006 Mar 24;341(4):1193-202. impakt faktor: 2.84

Bartis D, Boldizsár F, **Kvell K**, Szabó M, Pálincás L, Németh P, Monostori E, Berki T.

Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90.

Biochem Biophys Res Commun. 2007 Mar 2;354(1):253-8. impakt faktor: 2.84

Kvell K, Cooper EL, Engelmann P, Nemeth P.

Blurring borders: innate immunity with adaptive features.

Clinical and Developmental Immunology 2007 (in press)

Egyéb közlemények (impakt faktoruk: 3.71)

Pal J, Nyarady Z, Marczinovits I, Par A, Ali YS, Berencsi G, **Kvell K**, Nemeth P.

Comprehensive regression analysis of hepatitis B virus X antigen level and anti-HBx antibody titer in the sera of patients with HBV infection.

Pathol Oncol Res. 2006;12(1):34-40.

Bagamery K, Landau R, **Kvell K**, Graham J.

Different platelet activation levels in non-pregnant, normotensive pregnant, pregnancy-induced hypertensive and pre-eclamptic women. A pilot study of flow cytometric analysis.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2005 Jul 1;121(1):117-8. impakt faktor: 1.00

Bagamery K, **Kvell K**, Landau R, Graham J.

Flow cytometric analysis of CD41-labeled platelets isolated by the rapid, one-step OptiPrep method from human blood.

Cytometry A. 2005 May;65(1):84-7. impakt faktor: 2.10

Bagamery K, **Kvell K**, Barnet M, Landau R, Graham J.

Are platelets activated after a rapid, one-step density gradient centrifugation? Evidence from flow cytometric analysis.

Clin Lab Haematol. 2005 Feb;27(1):75-7. impakt faktor: 0.61

Nagy G, Szekeres G, **Kvell K**, Berki T, Nemeth P.

Development and characterisation of a monoclonal antibody family against aquaporin 1 (AQP1) and aquaporin 4 (AQP4).

Pathol Oncol Res. 2002;8(2):115-24.

KONFERENCIÁK

Nemzetközi konferenciák

Nemzetközi Immunológiai Kongresszus (EFIS), Stockholm, 2001

Predictive Oncology and Intervention Strategies, Párizs, 2002

„Fresh air” Scientific Forum, Changins, 2002

„Fresh air” Scientific Forum, Prangins, 2003

Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology (FEBS), Budapest, 2005

Signals and Signal Processing in the Immune System (SASPITIS), Balatonöszöd, 2005

Hazai konferenciák

Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Debrecen, 2001

Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése, Szeged, 2001

Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztály, Sárospatak, 2001

Magyar Immunológiai Társaság Konferencia, Eger, 2001

Magyar Immunológiai Társaság Konferencia, Szeged, 2004

Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2005

Magyar Immunológiai Társaság Konferencia, Sopron, 2005

Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2006

Díjazott előadások, pályamunkák

TDK konferencia, III. díj, Pécs, 1999

Korányi Frigyes Tudományos Fórum, II. díj, Budapest, 1999

Rektori Pályamunka II. díj, Pécs, 1999

Pécsi Akadémiai Bizottság pályázata, II. díj, Pécs, 2000

TDK konferencia, I. díj és Németh Árpád különdíj, Pécs, 2001

OTDK konferencia, Hematológiai és Transzfüziológiai Társaság különdíja, Pécs, 2001

XXXVI. Membrán Transzport Konferencia, Kovács Tibor díj, Sümeg, 2006