

# Humán immundeficiencia vírus korai replikációs ciklusának molekuláris elemzése

Doktori értekezés

**Kanizsai Szilvia**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nagy Károly, Ph.D., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Vásárhelyi Barna, DSc., egyetemi tanár  
Dr. Csire Márta, Ph.D., virológus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Cseh Károly, MTA doktora, egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Molnár Miklós, DSc., egyetemi docens  
Dr. Kiss Zoltán, Ph.D., virológus

Budapest  
2015

## Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	5
2. Bevezetés.....	9
2.1. A HIV és az AIDS 30 éve.....	9
2.1.1. A HIV eredete.....	14
2.1.2. A HIV taxonómiai elhelyezkedése és evolúciója.....	16
2.1.3. A HIV genetikai diverzitásának oka.....	18
2.2. A HIV szerkezete.....	20
2.3. A HIV replikációs ciklusa.....	23
2.3.1. HIV gp120, a CD4 receptor liganduma.....	24
2.3.2. HIVgp41 és a koreceptorok.....	24
2.3.3. Posztfúziós események.....	29
2.4. A HIV és az immunrendszer.....	32
2.5. Akut HIV infekció.....	34
2.6. Opportunista fertőzések.....	35
2.7. HIV fertőzés kimutatása.....	36
2.8. Terápia és a megelőzés lehetőségei.....	38
2.8.1. Pre- és posztexpozíciós profilaxis.....	40
2.8.2. Géninterferenciák.....	41
2.8.3. HIV vakcinák.....	42
3. Célkitűzések.....	44
4. Módszerek.....	45
4.1. A kísérlet során felhasznált sejtvonalak, vírustörzsek, virionok.....	45
4.1.1. Alkalmazott sejtvonalak.....	45
4.1.2. HIV-1 <sub>IIIB</sub> vírustörzs.....	46
4.1.3. HIV pszeudovirionok.....	46
4.1.3.1. HIV pszeudovirionok előállítása.....	47
4.1.4. Sejtvonalak HIV-1 <sub>IIIB</sub> vírustörzssel és HIV pszeudovirionokkal történő fertőzése.....	50
4.2. Politiolált oligonukleotidok antiretrovirális hatásának vizsgálata.....	51

4.2.1. A kísérleteinkben alkalmazott tiolált pirimidin vegyületek, mint HIV entry inhibitorok.....	51
4.3. HIV-1 <sub>III B</sub> és HIV pszeudovirion infektivitási vizsgálatok.....	53
4.3.1. Szincícium indukciós és inhibíciós assay.....	53
4.3.2. Kvantitatív p24 antigén assay.....	53
4.3.3. Riporter gének kvantitatív mérése.....	55
4.3.3.1. $\beta$ -galaktozidáz enzimaktivitás indukciós és gátlási vizsgálata sejtenyészeten - MAGI assay.....	56
4.3.3.2. Kvantitatív Luciferáz assay.....	57
4.3.3.2.1. A Luciferáz assay-hez felhasznált oldatok.....	60
4.4. Citotoxicitás mérése XTT assay segítségével.....	61
4.5. Antiretrovirális rezisztencia terápia-naïve magyarországi HIV-1 izolátumokban.....	62
4.5.1. Fertőzöttek szérum mintái.....	62
4.5.1.1. Trugene HIV-1 Genotyping Kit alkalmazása.....	63
4.5.1.2. Szekvencia elemzés.....	64
4.5.1.3. HIV-1 szubtypus meghatározás.....	65
5. Eredmények.....	66
5.1. HIV pszeudovirionok.....	66
5.1.1. Plazmid vektorok detektálása.....	66
5.1.2. HIV pszeudovirionok előállítása és kimutatása.....	67
5.2. A kísérleteinkben alkalmazott tiolált pirimidin vegyületek antiretrovirális hatása.....	71
5.2.1. Szincícium inhibíciós assay és kvantitatív p24 antigén assay vizsgálat eredménye MT2 és H9 sejteken.....	71
5.2.2. $\beta$ -galaktozidáz enzimaktivitás vizsgálata sejtenyészeten - a MAGI assay eredményei.....	73
5.2.3. Kvantitatív Luciferáz assay eredménye.....	75
5.2.4. XTT assay eredménye.....	78
5.3. Magyarországi terápia-naïve HIV-1 izolátumok antiretrovirális rezisztencia vizsgálatai.....	84
6. Megbeszélés.....	88

7. Következtetések.....	97
8. Összefoglalás.....	99
9. Summary.....	100
10. Irodalomjegyzék.....	101
11. Saját publikációk jegyzéke.....	121
11.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények.....	121
11.2. Egyéb témában megjelent közlemények.....	122
12. Köszönetnyilvánítás.....	123

## 1. Rövidítések jegyzéke

AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
AP	aspartic protease
APJ	7-transmembrane, apelin receptor
APOBEC3G	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G
ART	antiretroviral therapy
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BIV	bovine immunodeficiency virus
Bob/Gpr15	brother of Bonzo / G protein-coupled receptor
bp	bázispár
CA	kapszid
CAEV	caprine arthritis-encephalitis virus
CC	chemokine
CCR	chemokine receptor
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CDC	cyclin-dependent kinase
cDNS	complementary DNA, komplementer DNS
ChemR23	chemokine-like receptor 1
CD4	cluster of differentiation 4
CD8	cluster of differentiation 8
CMV	cytomegalovirus
CNS	central nervous system
CP	coat protein
CRF	circulating recombinant forms
CTL	cytotoxic T lymphocyte, citotoxikus T limfocita
CXC	C-X-C chemokine
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dsDNS	double-stranded DNA - dupla szálú DNS
eGFP	enhanced green fluorescent protein
EIA	enzyme immunoassay
EIAV	equine infectious anemia virus
EN/env	envelop - burok
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Fas, FasL	apoptosis stimulating fragment, apoptosis stimulating fragment ligand
FCS	fetal calf serum
FIV	feline immunodeficiency virus
Fkn	fractalkine
Gag, <i>gag</i>	group-specifikus antigén és a fehérjét kódoló gén
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenase
Gpr15/Bob	G protein-coupled receptor / brother of Bonzo
gp	glikoprotein
HAART	highly active antiretroviral therapy
HEK293T	transfected Human Embryonic Kidney 293 cells
HLA	human leukocyte antigen
HTLV-III	human T-cell leukemia/lymphoma virus
ICAM	intercellular adhesion molecules
IC	inhibitory concentration
IDU	intravenous drug use, intravénás droghasználók
IgM	Immunoglobulin M
IL	interleukin
INT, <i>int</i>	integráz
LFA-1	ICAM féle
L-Glu	L-Glutamine
LAV	lymphadenopathy associated virus
LESTR/fusin	leukocyte-derived 7-transmembrane domain receptor
LTR	long terminal repeat - hosszú végismétlődés
MA	mátrix
MAGI	multinuclear activation of galactosidase inhibition

MAPK	mitogen-activated protein kinases
MENA	Middle East and North Africa
MIP-1 $\alpha$	macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$
MIP-1 $\beta$	macrophage inflammatory protein-1 $\beta$
MMWR	Morbidity and Mortality Weekly Report
moi	multiplicity of infection
MP	movement protein
MPER	membrane proximal external regio
mRNS	messenger RNA, hírvivő RNS
MSM	males having sex with males - homoszexuális férfiak
MW	molecular weight, molekula súly
NAT	nucleic acid test
NC	nukleocapsid
Nef, <i>nef</i>	negative regulator factor protein és gén
NELF	negative elongation factor
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NNRTI	non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors
NRTI	nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors
PBS	primer binding site
PCP	<i>Pneumocystis carinii</i> pneumonia
PCR	polymerase chain reaction
PDI	protein disulfide isomerase
PEP	post-exposure prophylaxis
PI	proteáz inhibitor
PML	progressive multifocal leukoencephalopathy
pol	polimeráz
PrEP	pre-exposure prophylaxis
PR, PRoteáz	proteáz
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RdDpol	RNS-függő DNS polimeráz
<i>rev</i>	regulator of expression of virus protein, gén
RH, RNáz-H	ribonukleáz-H

RLU	relative luminescence unit
RNS	ribonukleinsav
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT	reverz transzkriptáz
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SIV	simian immunodeficiency virus
SDF	stromal cell derived factor
siRNS	small interfering RNA, kis interferáló RNS
SIV	simian immunodeficiency virus
ssRNS	single stranded RNS, szimpla szálú RNS
STD	sexually transmitted diseases, szexuális úton terjedő megbetegedések
STRL33	"Bonzo" seven-transmembrane domain orphan receptor-like
SU	surface glycoprotein, felszíni glikoprotein
TAR	trans-activation response element
Tat, <i>tat</i>	transzaktivátor és a fehérjét kódoló gén
TATA-box	5'-TATAAA-3' változata, Goldberg-Hogness box, cisz-regulátoros elem
T <sub>H</sub> 1, T <sub>H</sub> 2	T helper 1, T helper 2
TNF	tumor necrosis factor
TRIM5 $\alpha$	T cell receptor interacting molecule
TM	transzmembrán poliprotein
TP	tranzit protein
TRAIL	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
tRNS	transzfer RNS
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS
XTT assay	Xenometrix cytotoxicity test
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside
Vif, <i>vif</i>	vírus infektivitási faktor és a fehérjét kódoló gén
<i>Vpr</i> , <i>vpr</i>	vírus protein R és a fehérjét kódoló gén
Vpu, <i>vpu</i>	vírus protein U és a fehérjét kódoló gén
Vpx, <i>vpx</i>	vírus protein, HIV-2 provirális DNS importjáért felelős és a kódoló gén
V3	gp120 variábilis régiója
WHO	World Health Organization



## 2. Bevezetés

"Weaving together differing genders, races, ethnicities and generations, *ALTERNATE ENDINGS* depicts a fresh perspective on the ongoing HIV/AIDS crisis. One that is not only focused on preserving, remembering and honoring the past losses from HIV/AIDS, but also imagines a glimpse at the future."  
– Emily Colucci, review of *Alternate Endings* produced by Visual AIDS for the 25th Anniversary of Day With(out) Art

### 2.1. A HIV és az AIDS 30 éve



Az elmúlt immár több, mint 30 év egyik legpusztítóbb járványát okozó HIV a becslések szerint napjainkig körülbelül 39 millió ember halálát okozta. Az AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) a HIV (human immunodeficiency virus) által kiváltott tünetegyüttes. A HIV pandémia kezdete óta a világon eddig 78 millió embert fertőzött meg [Joint UNAIDS 2013].

A HIV egy retrovírus, amely elsősorban az immunrendszer sejtjeit támadja, ezáltal az nem tud hatékonyan fellépni a fertőzésekkel, daganatos megbetegedésekkel szemben. A vírus működésképtelenné teszi az immunsejteket, a fertőzöttek immundeficiens állapotba kerülnek. Az AIDS-nek számos klinikai megnyilvánulási formája lehet, kezdődően a különféle mikrobiális eredetű megbetegedéstől egészen a tumorokig. A kezdeti influenza szerű tünetek között van a fejfájás, izom- és ízületi fájdalmak, torokfájás, láz. Gyakori a kiütések megjelenése. Idővel a páciens immunrendszere egyre gyengül, a nyirokcsomók megnagyobbodnak, testsúlyvesztés, hasmenés, köhögés jelentkezik. Akut tuberkulózis, Cryptococcus okozta meningitis, Pneumocystis pneumonia vagy akár Kaposi-szarkóma is kialakulhat. Az egyre előrehaladottabb stádiumban a szervezet védekező rendszere gyengébb lesz, a csökkent immunválaszú fertőzöttek fogékonyabbá válnak az oportunistá patogénekkal és számos betegséggel szemben, ami az egészséges populációban esetleg nem okoz tüneteket. A mikrobiális kórokozók szerepe nagy jelentőséggel bír a kialakuló oportunistá fertőzésekben. A HIV fertőzés legelőrehaladottabb stádiumában jelenik

meg az AIDS. Az időtartam individuumból függően pár évtől akár másfél évtizedig is eltarthat, ami antiretrovirális terápiával növelhető. A HIV fertőzöttek leginkább a fertőzésüket követő első pár hónapban adják tovább a vírust, mivel nincsenek tisztában a ténnyel, hogy hordozók [Brooks et al. 2009, Cohen et al. 2011].

1981 június 5-én a CDC közzétett egy cikket a Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) című folyóiratban. A tanulmány 5 fiatal, kórelőzménnyel nem rendelkező, homoszexuális férfi esetét írja le Los Angelesből, akiket szokatlan megbetegedésekkel diagnosztizáltak, amely immunrendszerük nem megfelelő működésére hívta fel a figyelmet. Közülük ketten meghaltak, mire a cikk megjelent [CDC 1981]. Szinte azonos időben, 1981-ben New Yorkban és Californiában egészségesnek látszó homoszexuális férfiakon ritka betegségek újfajta megjelenési formáit vették észre az orvosok. Ezek voltak a *Cryptococcus neoformans* okozta meningitis, *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) és egyfajta daganatos megbetegedés, amely Kaposi-sarcoma néven ismert. Kaposi Mór (Kaposvár 1837–Bécs 1902) a kórképet ismeretlen eredetű multiplex pigmentált szarkóma (*idiopathic multiple pigmented sarcoma of the skin*) néven írta le, melyet később róla neveztek el [Kaposi 1872].

1981 decemberére az MMWR már több, mint 22, csecsemőkben előfordult, ismeretlen eredetű immundeficiens és opportunista fertőzéses esetet közölt, köztük egy vérátömlesztéssel fertőződöttét is [CDC 1982]. Hemofíliások, intravénás kábítószeresek, vérátömlesztésben részesültek, szexmunkások, homo- és heteroszexuálisok és szexpartnereik fertőződése hívta fel a figyelmet arra, hogy mikrobiális kórokozó lehet az elsődleges oka az immunrendszer nem megfelelő működésének, defektusának. A HIV átvitelének módja lehet a védekezés nélküli szex, közös tű használata, anyáról magzatra történő átvitel, fertőzött vérrel történt transfúzió, fertőzött szervekkel, szövetekkel történt transzplantáció [Marcus et al. 1989].

Két évvel az AIDS leírását követően citopátiás hatást kiváltó retrovírust izoláltak a betegekből, valamint krónikus limfadenopátiában szenvedőktől származó mintákból. Luc Montagnier párizsi kutatócsoportjától fényképes illusztráció is megjelent a "Lymphadenopathy Associated Virus" (LAV) által okozott megbetegedésről. Igazolódott a vírus AIDS-el való kapcsolata [Barré-Sinoussi et al. 1983]. A következő évben az Egyesült Államokból, Robert Gallo kutatócsoportja

meggyőző bizonyítékkal szolgált arról, hogy egy retrovírus, a HTLV-III az AIDS kórokozója [Gallo et al. 1984]. 1984 júniusában Gallo és Montagnier egy közös konferencián egyetértettek, hogy az általuk felfedezett HTLV-III és LAV egyezők és valószínűsíthető, hogy az AIDS-et okozzák.

Emberjogi szempontból nagy jelentőségű eset 1983-ban történt Amerikában. Az első olyan bírósági pert, ami egy HIV fertőzöttet is érintett egy orvos, Joseph Sonnabend nyerte. Bérloí meg akarták tiltani praxisának folytatását az épületben, ahol AIDS-es betegeket kezelt. A per eredményeként törvényellenes cselekedetté vált AIDS betegek, HIV fertőzöttek negatív diszkriminációja, az ítélet a fertőzötteket személyiségi jogaik érvényesítésében is segítette a későbbiekben. Az orvosnak nem kellett elhagynia az épületet, ahol gyógyító tevékenységét tovább folytathatta [Lambda Legal 1984].

1985-ben megjelentek az első HIV-ELISA tesztek, a Pentagon pedig elrendelte az újonc katonák szűrővizsgálatát. Ugyanebben az évben Atlanta, Georgia volt a színhelye az első Nemzetközi AIDS konferenciának (1. ábra).

James W. Bunn és Thomas Netter a WHO genfi székhelyének munkatársai 1987-ben felterjesztették az AIDS világnap ötletét igazgatójuk Dr. Mann féle. A gondolat elismerést és elfogadást nyert. Azért lett december 1. a kiválasztott nap, mert ez az időpont a választási kampányoktól már elég távol esett és karácsony még arrébb volt. 1988 december 1. az első AIDS világnap dátuma [W3].



1. ábra. Az első és legutóbbi Nemzetközi AIDS Konferencia

- a.) Az első Nemzetközi AIDS Konferencia 1985-ben az Egyesült Államokbeli Atlantában, Georgia államban került megrendezésre a CDC, a WHO és az Emory Egyetem közös megrendezésében.  
 b.) 2014, Melbourne, Ausztrália. 20. Nemzetközi AIDS Konferencia résztvevőinek felvonulása [W11, W8].

Az International Committee on the Taxonomy of Viruses 1986 májusában hivatalosan is elfogadta, hogy a vírus, ami az AIDS-et okozza a HIV [Case 1986]. Egy

évvel később a WHO megkezdte figyelemfelhívó kampányát, amely tényeken alapuló irányelveket fogalmazott meg. Technikai, pénzügyi háttérbázist biztosítva országoknak támogatta a szociális, társas viselkedési és orvostudományai kapcsolatos kutatásokat. Segítette a nem kormányzati szervezetek működését, valamint a HIV fertőzöttek személyiségi jogainak érvényesítését.

1991-ben Freddy Mercury meghalt AIDS-ben, Earvi "Magic" Johnson pedig bejelentette, hogy HIV fertőzött. Az ezredforduló előtt tíz évvel már majdnem kétszer annyi amerikai vesztette életét AIDS-ben, mint ahányan a vietnámi háborúban meghaltak. A WHO becslései szerint a világon ekkor már több, mint 10 millió volt a HIV fertőzöttek száma. A probléma megoldása egyre sürgetőbbé vált. A kérdés egyre jobban a figyelem központjába került, többek között azzal is, hogy a média által is egyre nagyobb publicitást kapott. Patric O'Connel a Visual AIDS Artist's Caucus kreatív vezetője, aki maga is AIDS beteg volt elindította a "The Red Ribbon Project" kampányt. Szimbóluma egy 6 hüvelyk hosszú, visszahajtott, közepén tűzött piros szalag, ami az öbölháború emlékére hordott sárga szalag analógiájára készült, és mint annak is többféle jelentés tulajdonítható. A piros szalag is számos eszme hirdetője lett. "Kapcsolatot a vérrrel és a szenvedéllyel, nemcsak a gyűlöletet, de a szeretetet is jelenti..." 1991-es Tony-díj átadóján a Broadway-en Jeremy Irons viselte nyilvánosan először, kamerák előtt, ezzel szinte lavinát indítva el. A világon mindenütt ismertté vált, mint az AIDS-ellenes küzdelem jelképe [W14].

Az ezredfordulóra a UNAIDS adatai szerint az AIDS lett a halálozások első számú okozója Afrikában, míg a világon a negyedik helyen állt. Az afrikai országokban a halálozások miatt az átlagéletkor drasztikusan lecsökkent. Mivel a szokások szerint az árva gyerekeket rokon családok nevelték, a nagymértékű népességcsökkenés miatt ez már nem valósulhatott meg. Egyre megsaporodtak az addig még sok helyen ismeretlen intézmények, az árvaházak. Az afrikai árvák száma elérte a 12 milliót. A Szaharától délre eső afrikai országokban az egyre növekvő halálozási arány miatt az átlagéletkor 67 évről 47 éves korra csökkent. Világviszonylatban ezek az adatok szintén elkéserítőek, 2000-re 34,3 millió volt a HIV/AIDS betegek száma [UNAIDS 2000].

A HIV felfedezése óta évente több millió megbetegedés és haláleset történik. A világméretű epidemiológiai probléma egyre csak növekszik. Évente közel 3 millió új

fertőzést regisztrálnak. A legutóbbi időben Kelet-Európa és Ázsia országaiban egyre növekvő epidemiológiai probléma hívta fel magára a figyelmet (2. ábra).

2013 global and regional statistics \*

Region	People living with HIV 2013		New HIV infections 2013		AIDS-related deaths 2013 (total)
	total	children	total	children	
Sub-Saharan Africa	24.7 million [23.5 million–26.1 million]	2.9 million [2.6 million–3.2 million]	1.5 million [1.3 million–1.6 million]	210 000 [180 000–250 000]	1.1 million [1.0 million–1.3 million]
Asia and the Pacific	4.8 million [4.1 million–5.5 million]	210 000 [190 000–270 000]	350 000 [250 000–510 000]	22 000 [18 000–32 000]	250 000 [210 000–290 000]
Latin America	1.6 million [1.4 million–2.1 million]	35 000 [27 000–54 000]	94 000 [71 000–170 000]	1800 [<1000–7400]	47 000 [39 000–75 000]
Western and Central Europe and North America	2.3 million [2.0 million–3.0 million]	2800 [2300–3600]	88 000 [44 000–160 000]	<500 [<200–<500]	27 000 [23 000–34 000]
Eastern Europe and Central Asia	1.1 million [980 000–1.3 million]	14 000 [13 000–14 000]	110 000 [86 000–130 000]	<1000 [86 000–1200]	53 000 [43 000–69 000]
Caribbean	250 000 [230 000–280 000]	17 000 [14 000–20 000]	12 000 [9400–14 000]	<1000 [<500–<1000]	11 000 [8300–14 000]
Middle East and North Africa	230 000 [160 000–330 000]	16 000 [11 000–22 000]	25 000 [14 000–41 000]	2300 [1500–3400]	15 000 [10 000–21 000]
Global	35 million [33.2 million–37.2 million]	3.2 million [2.9 million–3.5 million]	2.1 million [1.9 million–2.4 million]	240 000 [210 000–280 000]	1.5 million [1.4 million–1.7 million]

\*Some numbers may not add up due to rounding

2. ábra. AIDS epidemiológiai adatok a UNAIDS 2013. globális és regionális statisztikák [W13]

A kezdeti időszakban újabb és újabb esetismertetések láttak napvilágot. Sokszor azonos diagnosztikus lépéseket használtak, ezzel mintegy megadva a lehetőséget, hogy nem mindig kerültek felismerésre a tünetek. Mindezek mellett sok ország adoptálta a különböző stratégiai lépéseket a populációs prevalencia monitorozására.

Az elmúlt években a kutatók figyelemreméltó felfedezéseket tettek annak irányában, hogy a HIV miképp hat az immunrendszerre, hogyan befolyásolja annak működését. A szó szoros értelmében kimeríti azzal, hogy folyamatos készütségben tartja. Nem mindenki szervezete reagál egyformán a fertőzésre, más és más lehet egyes emberek immunreakciója, még akkor is, ha az elsődleges fertőzés forrása azonos [Liu et al. 1997].

A kutatók egyre közelebb kerülnek a megoldáshoz. Egyre nagyobb lehetőség van arra, hogy lassan, de biztosan létrehozzanak egy olyan antitestet, ami neutralizálja a vírust, vagy létrehozzanak egy preventív védőoltást, ami megvéd a HIV fertőzéssel szemben. Sok ötlet egészen változatos forrásokból származhat, kezdve az őserdei

majmoktól az afrikai szexmunkásokon át a hemofiliásokig a világ bármely országában. Az antiretrovirális terápia megjelenésével a HIV fertőzöttek várható élettartama napjainkban szinte megegyezik a nem fertőzöttekével, mégis elengedhetetlen a vírus folyton változó természetének pontosabb megismerése. Erre nemcsak a megfelelő antiretrovirális szerek kombinációinak alkalmazása miatt van szükség, hanem azért is, hogy tudjuk mikor kezdjük el a terápiát.

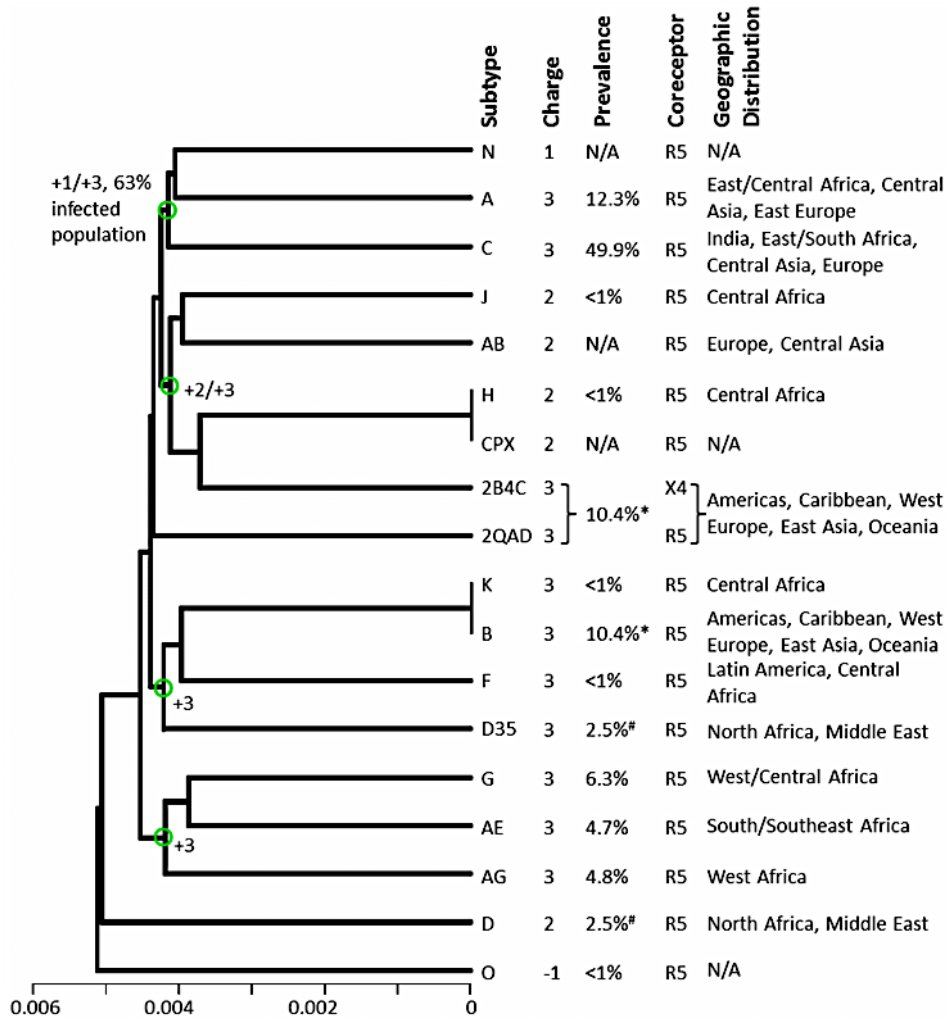
Elérkezett az idő, hogy visszatekintsünk a múltba, tanuljunk a tényekből és újult szemlélettel határozzuk el, hogy véget vetünk a HIV/AIDS epidémiának. Kreatív gondolkodásmóddal, multidiszciplináris szemlélettel a megfelelő irányba kell hogy haladjunk, folytatnunk kell összefogva (1.ábra).

### **2.1.1. A HIV eredete**

Vérminták szerológiai vizsgálatával kimutatták, hogy a HIV a múlt század második felében már jelen volt az afrikai kontinensen (1959 Zaire, 1972 Uganda, 1974 Malawi). Utalások születtek arra is, hogy a vírus valószínűleg már valamikor 1884 körül ott lehetett a populációban. Az AIDS pandémia előtti minták HIV-1 filogenetikai analizisét követően nagyfokú különbözőséget figyelhetek meg. Az eredmények az M főcsoporton belül a B és D szubtípusokhoz mutattak leginkább hasonlóságot (3. ábra). A HIV-1 szubtípusok (A-K) genetikai állományában nagyfokú eltérések vannak.

1959-ben egy matróz Manchesterben AIDS-szerű tünetekkel halálozott el. A eset fertőzőes eredetét azonban nem konfirmálták. Ezt követően, egy norvég családtól 1971-ből származó mintából egy újabb HIV-1 csoportba tartozó vírust izoláltak. Ez egy outlier (O) főcsoportba tartozó vírus volt. Ennek megjelenése napjainkban is leginkább Nyugat-Afrikára jellemző [Zhu et al. 1998, Lemey et al. 2003, Worobey et al. 2008].

HIV-2 fertőzéssel kapcsolatos első bizonyított, humán esetek 1963-1974-re nyúlnak vissza. HIV-2 fertőzött, portugál háborús veteránokban találtak ugyanazon típusú vírusokat, amik fertőzéseket okoztak és okoznak az akkor még portugál gyarmati Nyugat-afrikai országokban. Sokan közülük vérátömlesztéssel, vagy helyi lakosokkal létesített szexuális kontaktus, valamint prostituáltak útján fertőződtek [Lemey et al. 2003].



3. ábra. HIV szubtypusok konzervatív szekvencia analízise, 2009-es adatok alapján

A dendrogram horizontális tengelye az egyes szekvenciák filogenetikai távolságát jelöli. Az ábrán jelölve vannak az egyes szubtypusok a földrajzi előfordulás és koreceptor megjelenítés szerint [López et al. 2012].

Az AIDS kórokozói a HIV-1 és a HIV-2. A HIV-1-et 1983-ban, míg a HIV-2-t 1986-ban írták le először [Barré-Sinoussi et al. 1983, Clavel et al. 1986]. A HIV-2 kevésbé került a figyelem középpontjába, mint a HIV-1. Talán azért is, mert míg a világjárványokat inkább a HIV-1 különböző csoportjai és azok szubtypusai okozzák, a HIV-2 elterjedése leginkább Nyugat-Afrikára jellemző. A fertőzés zoonotikus átvitele a HIV-1 és a HIV-2 esetében a kezdetekben azonos módon történhetett. Ezt számos tanulmány is alátámasztja.

Az első két HIV fertőzött hazai esetet a páciensek savójában levő ellenanyagok segítségével sikerült kimutatni 1985 októberében indirekt immunfluoreszcens eljárás segítségével. A HIV termelő H9 sejtek Robert Gallo laboratóriumából származtak. A

legelső magyarországi HIV-1 izolálások 1988 márciusában három AIDS és három ARC-es férfi beteg limfocitáiból történtek [Nagy et al. 1988, Nagy et al. 1990, Albert et al. 1990].

### 2.1.2. A HIV taxonómiai elhelyezkedése és evolúciója

Taxonómiaiilag a HIV, amelynek két változata van a HIV-1 és a HIV-2 a Retroviridae családba tartozik. A vírusokat az általuk alkalmazott különböző replikációs, transzkripció és transláció stratégiák jellegzetességei és nukleinsav szerkezetük szerint a Baltimore-féle (David Baltimore 1971) genetikai rendszer csoportosítja. A Retroviridae család a rendszerezés VI. csoportjának tagja. A név arra utal, hogy ezek a vírusok egy olyan replikációs enzimet, reverz transzkriptázt hordoznak, amely képes RNS-ről DNS-t szintetizálni. Az enzim neve lefordítva annyit jelent "visszafelé átíró" [Adams et al. 2013]. A Retroviridae családba két alcsalád, az Orthoretrovirinae és a Spumavirinae tartozik. Az alcsaládokon belül összesen 7 genus van. Az Orthoretrovirinae alcsaládba tartozik a Lentivírus genus, ahova a HIV-1 és HIV-2 taxonómiaiilag sorolandó.

A HIV-1 vírusok többsége az M (Major) főcsoportba tartozik, ezen belül altípusok (A-K) ismertek. Emellett megkülönböztethetjük az N (Non pathogenic – nem erősen patogén) és O (Outliner – az előbbiekre nem sorolható) főcsoportokat is. A HIV-2 nyolc alcsoportra osztható (3. ábra, 4. ábra, 5. ábra).

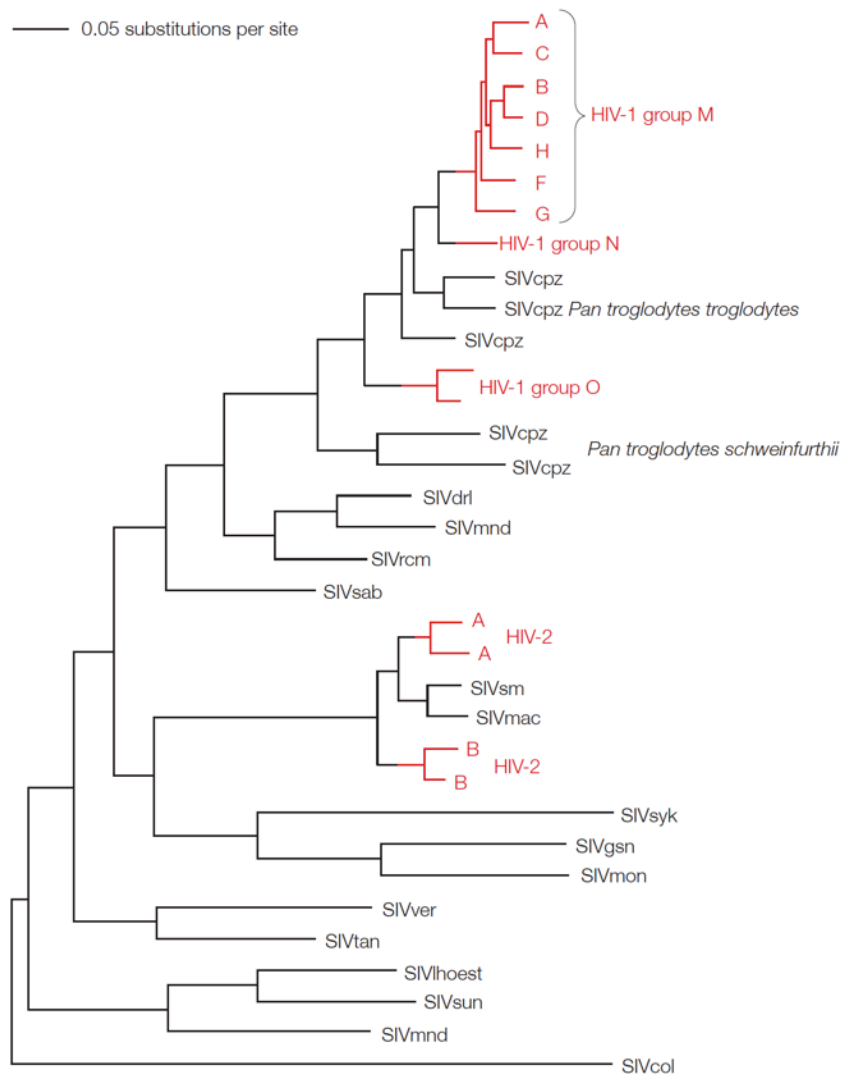
A lentivirális infekciók krónikus lefolyásúak, hosszú klinikai látenciaidő, perzisztens vírusreplikáció és a központi idegrendszer érintettsége jellemzi. Lentivirális fertőzés tipikus példája a macskafélék immundeficienciát okozó vírusa (FIV), szarvasmarhák immundeficiencia vírus fertőzése (BIV), majmok immundeficiencia vírusának fertőzése (SIV), kecskék arthritis/encephalitis vírus fertőzése (CAEV), lovak kevésvérűségét okozó vírus (EIAV) és a Visna/Maedi vírus okozta fertőzések is.

Genetikai vizsgálatok szerint a HIV-1 és HIV-2 majmokból, gazdafaj váltással került az emberre. A HIV-1 és HIV-2 bár elektronmikroszkópos vizsgálattal nagy hasonlóságot mutat, azonban fehérjéik molekulásúlyában és genomjaikban található kiegészítő génjeikben különböznek egymástól. A csimpánz (*Pan troglodytes* és a *Pan*



*trogodytes schweinfurthii*), az afrikai zöldmajom (*Chlorocebus aethiops*, közönséges nevén Vervet Monkey) és a kormos mangábe (*Cercocebus atys lunulatus*) vírusának hosszúra nyúló evolúciós történelme van gazdafajával, amely során a majmok adaptálódhattak vírusukhoz vagy a vírusok a majmokhoz. A vírus nagy számban lehet jelen vérükben, de mindazonáltal csak enyhe immunreakciót vált ki. Nem jönnek létre náluk az AIDS-hez hasonló immunhiányos tünetek, valamint nem is történik bennük olyan nagymértékű mutáció, mint az a HIV fertőzött embereknél megfigyelhető. A HIV-1 evolúciós tekintetben a csimpánz SIVcpz-re emlékeztető genetikai szerkezetű, míg a HIV-2 eredete leginkább a kormos mangábe SIVsm-el mutat hasonlóságot (4. ábra).

A csimpánz SIV (SIVcpz) filogenetikai vizsgálatok kimutatták, hogy a vírus úgy 150-200 évvel ezelőtt került a csimpánzokba, majd genetikai módosulásuk után a humán populációra. Mivel a csimpánzok nem adaptálódtak még az új vírusukhoz, így ezek esetében AIDS-szerű tünetek fejlődnek ki. A HIV-2 genomja egy cercóf majmokat fertőző vírus a SIVsm genomjához áll a legközelebb [Sharp et al. 1999, Marx 2005, Keele et al. 2009].



#### 4. ábra. Főemlős lentivírusok evolúciós kapcsolatai

HIV-1 és HIV-2 származása SIV-ből. Független kereszteződések általi evolúciós vonalak figyelhetők meg, amely által létrejöttek az M, N, O főcsoportok. A filogenetikai dendrogram a "Maximum likelihood method" (maximális valószínűség módszere) segítségével készült, összehasonlítva a GeneBank-ban megtalálható, random kiválasztott 34 virális *pol* gén nukleotid szekvenciáját [Rambaut et al. 2004].

#### 2.1.3. A HIV genetikai diverzitásának oka

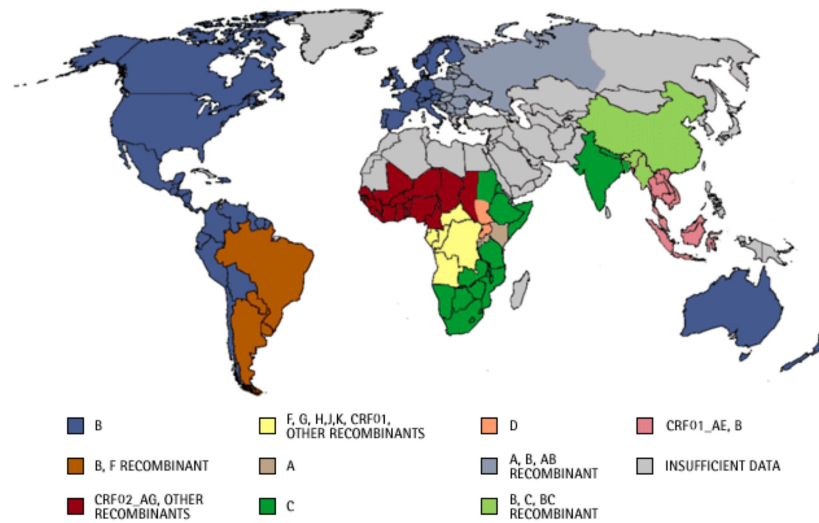
A HIV-1 és HIV-2 előfordulása földrajzilag is elkülöníthető, mindamellett hasonló klinikai megjelenési formát hoznak létre fertőzöttekben. A vírus felfedezése után hamar fény derült arra is, hogy szoros rokonsági kapcsolatba hozhatók különféle főemlős immundeficiencia vírusokkal, tehát evolúciós szempontból hasonló eredetűek. A vírus kialakulása a rekombinációs események eredményeként jött létre. Molekuláris

filogenetikai vizsgálatokkal is bizonyították az új törzsek kialakulását. HIV-1 a csimpánzok immundeficiencia vírusához (SIVcpz) áll genetikailag a legközelebb. A HIV-1 genetikai diverzitása Afrikában figyelhető meg legjobban. A HIV-2 leginkább a kormos mangábe immundeficiencia vírusával hozható evolúciós rokonságba. Genetikai vizsgálatokkal bizonyították HIV-2 és SIV rekombinációs vírusmegjelenést is humán esetekből. A minták vizsgálata arra pontosan nem adott eredményt, hogy hányféle vírus kereszteződhetett, de a HIV-2 esetében eddig legalább négy bizonyított [Chen et al. 1996].

A lentivírusok rendkívül magas genetikai variabilitással rendelkező vírusok. Ez a nagyfokú változékonyság leginkább a hipervariábilis régiókban, legfőképp a burokproteineket kódoló *env* génben figyelhető meg. A mutációnak a rekombinációs eseményeken kívül még számos más oka is lehet. A választ a vírus szaporodási folyamatában kereshetjük. Az egyik legfontosabb, replikációért felelős enzim a reverz transzkriptáz körülbelül 2000 bázispáronként előforduló, replikációs hibát követ el szaporodási ciklusonként. A további hibalehetőségek a DNS transzkripció folyamatainál történhetnek meg a gazdasejt eredetű RNS polimeráz II által. A vírus nagyon gyors replikációs dinamizmussal bír, generációs ideje 2,5 nap körül van, amikor is naponta  $10^{10}$ - $10^{12}$  új virion képződésére van lehetőség.

Antigén csuszamlás, az úgynevezett "genetic shift" is bekövetkezhet a gazdasejten belüli szaporodási folyamatok során. Ekkor az előnyös tulajdonságokra szert tett új virionok, a pozitív evolúciós eredményeket kihasználva új vírus populációt alakítanak ki [Perelson et al. 1996, Frost et al. 2001].

Nemcsak gazdaszervezeten belüli evolúciós, mutációs hatásokról beszélhetünk. *In vitro* kutatási eredmények bizonyították, hogy például a "C" szubtípus sejtenyészeteken mutatott virális fitness tulajdonságai sokkal gyengébbek voltak, mint a "B" szubtípusé. Mégis Afrikában a "C" szubtípus jobban elterjedt, melynek következménye az adott kontinensen ebben a szubtípusban megfigyelhető nagymértékű mutációs ráta. Az ok a kontinensen jellemző szexuális szokásokban keresendő.



5 . ábra. A HIV genetikai diverzitása, szubtípusok földrészek szerinti előfordulása

Az amerikai kontinensen és Európában a "B" szubtípus, Dél-Amerikában leginkább a "B" és "F" és rekombinánsaik megjelenése jellemző. Kelet-Európában az "A", "B" és "AB" rekombinánsok dominanciája figyelhető meg. Ázsiában a "C", "B" és "BC" a leggyakoribb. Ausztráliában a "B" szubtípus dominál. A világosszürke régiók az adatok hiányossága miatt nem értékelhetők. Ide tartoznak az úgynevezett MENA országok is, ahol politikai, ideológiai okokból a fertőzés tényét nem publikálják [W12].

A genetikai diverzitás és rezisztencia kialakulásában a terjedési módok - vertikális, parenterális és szexuális - nagy jelentőséggel bírnak. Migrációk, a globális prostitúció, a szexturizmus, az országok, ahol a parenterális és szexuális átvitel a - droghasználat vagy prostitúció - létének tagadásával, vagy diszkriminálásával, stigmatizálással nehezítik a terjedés kontrollját, elősegítve az epidemiológiai heterogenitás kialakulását.

Természetesen nemcsak pozitív szelekciós mutációk alakulhatnak ki, hanem olyanok is, amelyek nem kedveznek a vírus szaporodásának [Marcus et al. 1989, Ball et al. 2003].

## 2.2. A HIV szerkezete

A lipoprotein burokba csomagolt, néhány leírás szerint pleomorf, más leírás szerint ikozahedrális alakú tulajdonsággal bíró HIV vírusrészecskék 80-120 nm átmérőjűek. Méretük a vörösvértestek 60-ad részét teszi ki. Minden vírusrészecske 72

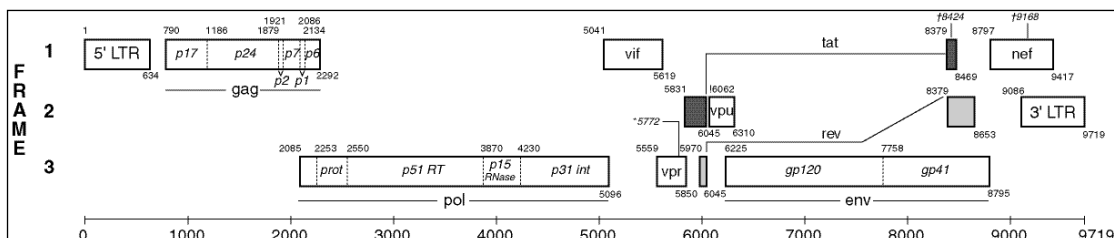
glikoprotein komplexet tartalmaz, melyek a lipidmembránnak az integrált részei. A lipidmembrán gazdasejt eredetű lipid kettős réteg, külső felületén glikozilált virális proteinekkel. HIV-1 és HIV-2 a bimbózás során tesznek szert a specifikus lipidkomponensekre. A gp120 és gp41 is a virális glikoproteinek közé tartozik. Ezek egymással és a burokkal létesített kötése viszonylag laza szerkezetű, ezért a gp120 könnyen leválhat. HIV fertőzöttekben a szérumban, valamint szövetekben a jelenléte kimutatható. A vírus gazdasejtből történt kiszabadulását követően a vírusburok sejtes eredetű HLA-I és HLA-II osztályú fehérjéket és más, úgynevezett adhéziós fehérjéket, mint pl. az ICAM-1 tartalmazhat, ezek segítségével a későbbiekben újabb sejteket fertőzhet. A vírus burkán belül található a mátrix réteg, amely a nukleokapszidon kívül helyezkedik el. A kapszidon belül van a diploid +ssRNS tartalmú vírusgenom [Aiola et al.1993, Weiss 2001, McGovern et al. 2002].

A HIV vírusnak 9 génje van. A 2n, diploid genom két, egyszálú +ssRNS-t hordoz (9 181 bp). A retrovírusok mindegyikében megtalálható a következő három gén:

- (1) A *gag* gén (*group specific antigen*) a vírus fehérje-alapállományát (matrix, kapszid - MA, CA) és az RNS szálat védő fehérjéket (p17, p24, p15, p7, p9) kódolja.
- (2) A *pol* gén (*polymerase*, polimeráz) három funkcionális enzim gént kódol: az RT-enzim génjét (reverz transzkriptáz; RNS-függő DNS polimeráz: RdDpol) (p65 és p51), a proteáz enzim (p10) génjét, amely feldarabolja a Gag nyers fehérjét a három funkcionális egységre, valamint az integráz enzim (p32) génjét. Ez utóbbi segítségével épül be a gazdaszervezet DNS-ébe a teljes vírus genom cDNS.
- (3) Az *env* gén (*envelop*, lipid burokból kitüremkedő GP-ek), két felületi glikoproteint kódol, amely a gp120 (SU) felszíni glikoprotein és a gp41 (TM) transzmembrán poliprotein.

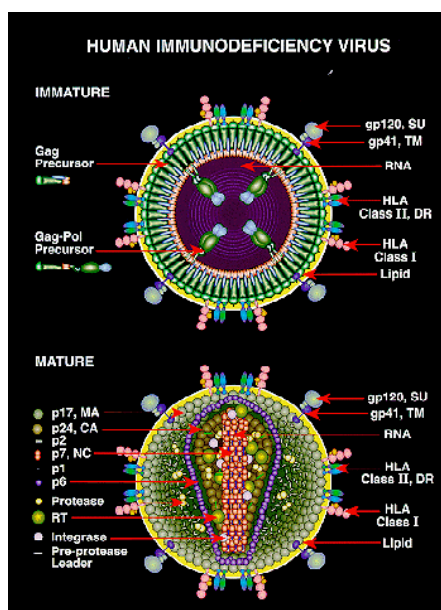
A többi virális szabályzó proteint kódoló gén, mint a *tat* egy RNS-hez kötő fehérjét a transzaktivátor proteint kódolja, a *rev* által kódolt fehérje elősegíti az egyszeresen vágott és vágatlan mRNS-ek kijutását a sejtmagból a citoplazmába, a *vif* megvédi a vírust a sejten belül az APOBEC3G-nek a cDNS degradációt és hipermutációt okozó hatásától. A *nef* egy olyan aktivátor faktor, amely hatására csökken a fertőzött gazdasejt felszínén az MHC-I és a CD4 receptor kifejeződése. Elősegíti a CD4 receptor endocitózist és lizoszómális degradációját, így a sejt nem tud újra fertőződni. A *vpr* a virális replikációhoz nélkülözhetetlen. A kialakult integrációs

komplex nukleocitoplazmás transzportjában játszik szerepet, valamint befolyásolni tudja a gazdasejt osztódási folyamatait. A *vpu* a HIV-1-nél vagy a HIV-2 esetében a *vpx* géneken kódolt fehérjék a vírus fertőzött gazdasejtből való kijutását, a kész virionok leválását segíti [Oberlin et al. 1996, Peter 1998, Pion et al. 2006] (6. ábra, 7. ábra).



6. ábra. HIV vírus géntérképe

LTR (*Long terminal repeat* – hosszú végismétlődés), a *gag*, *pol*, *env*, valamint a *tat* (*transactivator protein*), a *rev* (*regulator of expression of virus protein*), a *vif* (*virus infectivity factor*), *nef* (*numerous effector functions*), a *vpr* (*virus protein R*) és a *vpu* (*virus protein U*). gének elhelyezkedése a HIV géntérképén [W10].

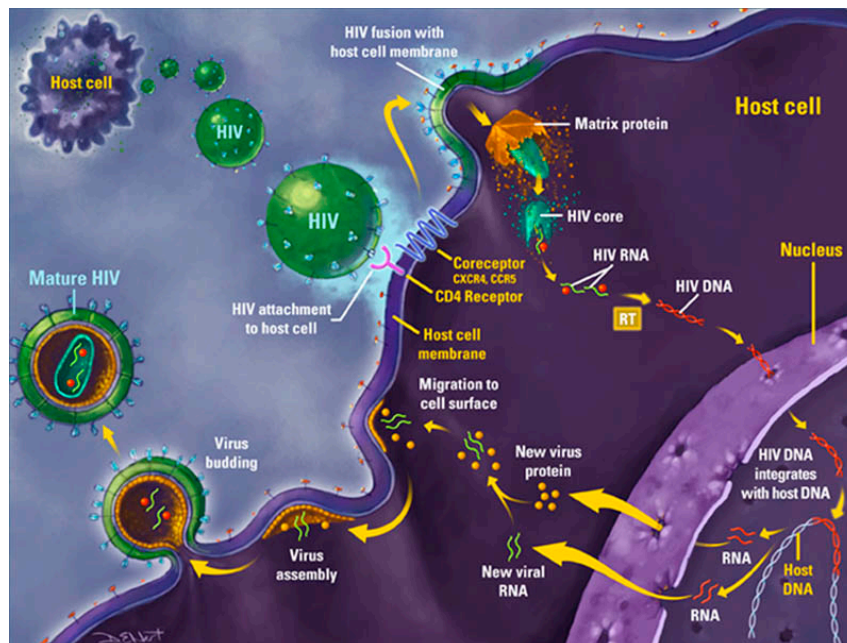


7. ábra. A HIV vírus felépítése

(Rövidítések: A *gag* (*Group-specific Antigen - csoport specifikus antigén*), a vírus burokfehérjéit kódoló gén. A vírus saját proteáza három fehérjére (doménre) hasítja: matrix (MA), kapszid (CA) és nukleokapszid (NC). Az *env* (*envelop* – burok). A vírus eredetű burokfehérje felelős a vírusnak a sejtfelszínhez való kötődéséért. Két doménje a SU (*surface - felszíni*) és a TM (*transmembrane - membránon átnyúló*). INT (*integrase*) a retrovírusnak a genomba történő visszaépüléséhez szükséges, endonukleáz hatású enzim, amely működése során két bázist emészt le az LTR vég-szekvenciájáról. PR, (*PRotease*), aszparaginsavban gazdag, az expresszált fehérjét funkcionális egységekre hasító enzim. RH, (*Ribonukleáz-H*, RNáz-H) RNS-bontó enzim amely elhidrolizálja az elkészült cDNS-ről a minta RNS-t. RT (*Reverz transzkriptáz*) egy RNS-függő DNS-polimeráz, amelyik RNS szekvenciáról szintetizál egyszálas cDNS-t (= *RdDp* = *RdDpol*). További magyarázat a szövegben [W2].

### 2.3. A HIV replikációs ciklusa

A lentivírusok replikációs ciklusa rendkívül összetett. A gazdasejt és a vírus között számos komplex kölcsönhatás jön létre. A fertőzés a virion sejtbe jutásával kezdődik. Ez egy több lépcsős folyamat, ami a HIV burokproteinjei és a gazdasejt membránján található specifikus receptorok kapcsolódásával történik. A virion a felszíni glikoprotein receptorokhoz először reverzibilisen, majd irreverzibilisen kapcsolódik, majd megtörténik a fúzió a gazdasejt membránnal. Ezt követően a virális nukleokapszid bejut a sejtbe és a vírus két kópiában jelen levő, diploid +ssRNS genomja kiszabadul. A vírus reverz transzkriptáz enzimje révén a virális genom dupla szálú, dsDNS formátummá íródik át. További virális eredetű enzimek által a vírus beépül a gazdasejt magjába, ahol gazdasejt eredetű enzimek segítik a provírus transzkripció folyamatát. A kialakult mRNS sejtes eredetű enzimek révén transzlálódik. A létrejött vírus proteinek pedig a virális enzimek révén hasítódnak. A vírus összeépülése után bimbózással szabadul ki a gazdasejtből. A kiszabadult, érett virion pedig új sejteket fertőzhet (8. ábra).



8. ábra. A HIV replikációs ciklusa [W1]

### 2.3.1. HIV gp120, a CD4 receptor liganduma

CD4, mint a HIV-1, a HIV-2 elsődleges receptora már 1984-ben megismerésre került. A HIV célsejtjei a CD4 receptorral rendelkező T-limfociták, monociták és makrofágok [Dalglish et al. 1984].

A lentivírusok burkán glikoprotein ligandumok találhatók, amik a virion és a gazdasejt kapcsolódásában játszanak nagy szerepet. A sejt felszíni CD4 molekula a virális gp120 elsődleges receptora. A celluláris receptorok és a gp120 interakciója napjainkra egyre nagyobb részletességgel vált ismertté. A virális gp120 a CD4 receptor specifikus epitópjaihoz kapcsolódva konformáció változást eredményez, miáltal gp120 V1/V2 és V3 hurok és a releváns koreceptor aktivitása megnyilvánulhat. Ahhoz, hogy a virion bejusson a sejtbe, a gp41 és a celluláris koreceptorok kölcsönhatásának is létre kell jönni. A gp41 a vírus felszínén található transzmembrán fehérje. A gp120-al együtt része a gp160-as komplexnek. A konformáció változás eredményeként gp41 inszertálja NH<sub>2</sub> terminálisát a gazdasejt membránjába, létrejön a koreceptor kölcsönhatás és megtörténik a membránfúzió [Nagy et al. 1996, Chan et al. 1997].

### 2.3.2. HIV gp41 és a koreceptorok

Sejttenyészetekben a HIV fertőzöttekből izolált CD8+ T sejtek olyan anyagot termelnek, amelyek képesek negatívan befolyásolni a HIV szaporodását. Ezek a HIV szuppresszív elemek a sejttenyészetek felülúszójából nyerhetők ki. Olyan humorális faktorokról van szó, amelyek az immunválasz szabályozásában játszanak szerepet, a sejtek citokin-receptoraihoz kapcsolódva fejtik ki hatásukat. A kemotaktikus citokinek aktiválják az immunológiailag kompetens sejteket, szabályozzák az immunválaszt, befolyásolják a termelődő ellenanyagok mennyiségét, izotípusát és más citokinek működését. A sejttenyészetekből izolált kemokinek csökkentik a HIV replikációs képességét [Nagy et al. 1983, Albert et al. 1990, Cocchi et al. 1995].

Ahhoz, hogy a lentivírusok, így a HIV is bejussanak a gazdasejtbe, a sejt felszíni CD4 receptor mellett szükségük van egy kofaktorra. Azok a HIV izolátumok, amelyek a makrofág/monocita kultúrákban szaporíthatók jól, az úgynevezett monocitotróp (M-



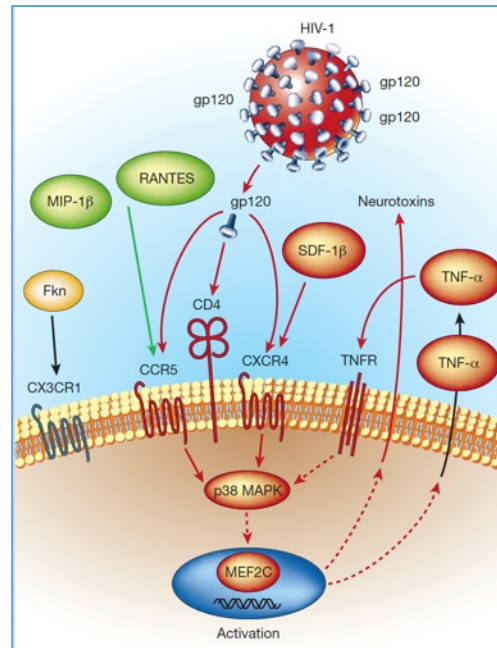
tróp) HIV izolátumok. Az M-tróp vírusok esetében a kérdéses koreceptor a CCR5. A CCR5 receptor természetes ligandumai a  $\beta$ -kemokinek csoportjába tartozó RANTES, MIP-1 $\alpha$  és a MIP-1 $\beta$ .

A CXCR4-es koreceptor nagy jelentőséggel bír a T-sejt kultúrákban jól szaporodó (T-tróp) HIV izolátumok korai replikációs folyamataiban. Bizonyítást nyert, hogy az  $\alpha$ -kemokinek csoportjába tartozó SDF-1 (cell derived factor-1), amely a CXCR4 receptor természetes liganduma egy rendkívül hatékony kemoattraktáns.

A kemokinek és receptoraik létezését már korábban ismerték. Szerepük a leukociták aktiválásában és migrációs folyamataiban volt bizonyított. A kemokinek négy csoportba oszthatók. Ezek a CXC ( $\alpha$ -kemokinek), a CC ( $\beta$ -kemokinek), a CX3C ( $\delta$ -kemokinek), mint a Fkn (fractalkine) és az XC kemokinek. Receptoraik a G-protein-kapcsolt, heptahelikális (7-transzmembrán) receptorok csoportjába tartoznak [Deng et al. 1996].

A T-tróp, HIV-izolátumok a LESTR/fusin (CXCR4) kemokin receptorokat részesítik előnyben, míg az M-tróp izolátumok főleg a CC ( $\beta$ -kemokinek) csoportba tartozó CCR5, CCR3 receptorokat. A CCR5 és CXCR4 kemokin receptorok mellett egyes HIV törzsek a sejtbe való bejutáshoz burokproteinjeik szerkezeti változásával egyéb koreceptorokat is képesek használni. Ilyenek lehetnek a CCR2, CCR8, CCR9, STRL33 (Bonzo), Gpr15 (Bob), Gpr1, APJ és ChemR23 (9. ábra) [Bleul et al. 1996, Feng et al. 1996, Deng et al. 1997].

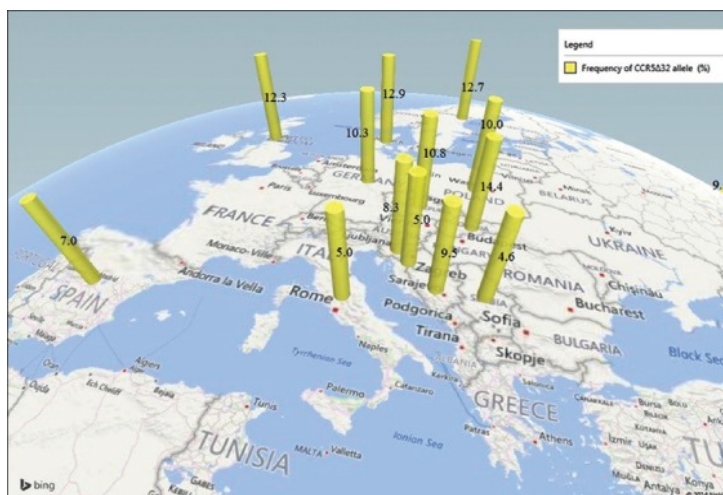
A fertőzés kezdeti szakaszában leginkább az M-tróp izolátumok jelenlétére számíthatunk, függetlenül attól, hogy a fertőző forrásban jelen voltak-e a T-tróp vírusok. Tanulmányok bizonyítják, hogy az M-tróp vírusok hamarabb és jobban el tudnak rejtőzni intracellulárisan a makrofágokban az immunrendszer válaszreakciójától. A HIV fertőzés előrehaladtával, amint a CD4 sejtszám egyre jobban csökken, a primer fertőzésben leggyakoribb CCR5 koreceptort használó vírusokat egyre inkább felváltja a CXCR4 koreceptort preferáló virion populáció. A CCR5 megjelenése az effektor és memória sejteken gyakoribb, a CXCR4 leginkább a T-sejtek felszínén jellemző [Simmons et al. 1997].



9. ábra. HIV-gazdasejt interakciók

HIV gazdasejtbe történő bejutásához a gp120 és CD4 receptor kölcsönhatása után gp120 egy olyan konformáció változáson megy át, amely által gp120 hozzá tud kapcsolódni a vírus tropizmusának megfelelő, specifikus koreceptorokhoz. CXCR4 és CCR5 koreceptoroknak természetes ligandjai is vannak. Ezek az  $\alpha$ -kemokinekhez tartozó SDF-1, a  $\beta$ -kemokinek csoportjában levő MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, valamint a  $\delta$ -kemokinekhez tartozó Fkn (fractalkine). Ez utóbbi a neuronokkal és mikrogliaival való kölcsönhatásokért felelős. A virális gp120 kapcsolódása egy p38 MAPK mediálta kaszkárendszerrel indítja el a sejtben [Kaul et al. 2001].

A CCR5 egy domináns sejtfelszíni koreceptor, ami jelentős szerepet játszik a primer HIV fertőzésekben. Azok a genetikai mutációval rendelkező egyének, akiknél a CCR5 koreceptor nem fejeződik ki limfociták felszínén, rezisztensek az M-tróp vírus fertőzésre. A T-tróp HIV fertőzéseknél ez a genetikai mutáció nem befolyásoló tényező. Azok 32 bázispárnyi génkieséssel magyarázható. A deléció homozigóta és heterozigóta formában is jelen lehet. A  $\Delta 32$  géndeléció változat leggyakoribb az Észak-európai populációban. Amennyiben a 32 bázispárnyi géndeléció heterozigóta formában van jelen, a CCR5 kifejeződése jelentősen csökkent mértékű lesz, a fertőzés progressziója lényegesen lassúbb. Homozigóta CCR5- $\Delta 32$  mutációt hordozók szubpopulációjában egy esetleges M-tróp HIV fertőzés nem történik meg, a páciens az antiretrovirális terápiára jobban reagál (10. ábra) [Winkler et al. 1998].



10. ábra. A CCR5 koreceptor kifejeződéséért felelős  $\Delta$ 32 allél gyakorisága Európában [Adler et al. 2014]

A CCR5 receptort kódoló lokusz  $\Delta$ 32 mutációja az ember természetes szelekciójának vizsgálatában széleskörűen tanulmányozott kérdés. A mutáció leginkább Észak-Európa, Nyugat-Ázsia országaiban, valamint a Volga-Ural régióban igen gyakori. Számos elméleti tanulmány írja le az előnyös tulajdonságokat kódoló allélek populáción belüli előfordulását, de kevés olyan kutatási eredmény áll rendelkezésünkre amelyben emberekben vizsgálták a bizonyos szempontból kedvező tulajdonságokat hordozó allélnak a geográfiai előfordulását. A CCR5 receptort kódoló gén  $\Delta$ 32 mutációja jó példa a földrajzi megjelenés változó eloszlására [Novembre et al. 2005].

Magyarországon ennek a genetikai markernek a vizsgálata először egészséges populációban, valamint HIV fertőzöttek és szeronegatív szexuális partnereik vérmintáiból történt. A mintákból szeparált limfociták DNS-ének izolálása után kapott vizsgálati eredmények szerint hazánk ezen genetikai marker alapján is a Közép - Európában előforduló allél variánsok eloszlásának gyakoriságával jellemezhető. A vizsgált HIV fertőzött populáció még két további csoportra osztható, a HIV progresszor és HIV nonprogresszor csoportra. A vizsgálatok kimutatták, hogy a nonprogresszorok csoportjában jóval nagyobb volt a CCR5 receptort kódoló gén  $\Delta$ 32 mutációjának gyakorisága, mint a standard betegség progressziójúaknál. Ez utalhat arra is, hogy ez a mutáció segítheti a tünetmentes időszak meghosszabbodását [Kemény et al. 1998, Kemény et al. 2000]. További genetikai vizsgálatok eredményeként képet kaphattunk a magyarországi legnagyobb kisebbség, a oláh cigány populáció CCR5 receptort kódoló

génjéről, valamint a CCR2-64I és SDF1-3'A kódoló allélok eloszlásáról. A vizsgált csoportban a CCR5 receptort kódoló gén  $\Delta 32$  mutációjának gyakorisága szignifikánsan magasabb volt a magyar populációval összehasonlítva, valamint tízszer nagyobb előfordulási gyakoriságot mutatott az Észak-Nyugat-Indiában élőknél előforduló allél gyakorisággal. A feltételezések szerint az európai cigány populáció földrajzi eredete az észak-indiai földrész, a népvándorlásuk során alakulhatott ki bennük az allélpolimorfizmus. A CCR2-64I kódoló gének polimorfizmusa szintén magas eltérést mutatott, míg az SDF1-3'A kódoló régiók sokkal kisebb számban mutatkoztak meg a magyar és indiai populációhoz képest [Juhász et al. 2012].

A CCR5 receptort kódoló gén  $\Delta 32$  mutációnak az eredete még a HIV fertőzés előtti időkre nyúlik vissza. Ezt az időszakot valahol 700-2900 évvel ezelőttire becsülik.

A történelem folyamán a fekete himlő lehetett, ami Európában nagy szerepet játszott ennek a mutáns allélnek az elterjedésében. Ez a feltételezés széleskörűen elfogadott lett a populáció genetikával foglalkozók körében is. Vannak más feltételezések, miszerint az allél variáns kialakulása a bubópestis genetikai szelekciós hatásának tulajdonítható [Stephens et al. 1998]. A fekete himlőt vírus, a *Variola major* okozza, míg a pestist a *Yersinia pestis* nevű baktérium. Mindkét mikroorganizmus használja a CCR5 receptort a sejtbe való bejutáshoz [Galvani et al. 2003, Elvin et al. 2004, Cohn et al. 2006].

Létezik egy úgynevezett "Viking hipotézis" is a mutáns allél létrejöttéről. Ez egészen a VIII.-X. századig vezet minket vissza. A  $\Delta 32$  előfordulási gyakorisága észak-dél irányú grádiens mutat Európában. Magas előfordulási gyakorisággal bír a skandináv, izlandi, mordvinföldi, valamint spanyol populációban. Valószínűleg itt is a szelekciós tényező valamely járványos megbetegedés lehetett. Az allél gyakori megjelenését a Viking hódítók útvonalai is kapcsolatba hozták. A  $\Delta 32$  elterjedésének okaként megjelölt "Viking elmélet" jól alátámasztható történelmi és földrajzi adatokkal. A Viking korban Skandinávia és Észak-Európa nagy részét a viking hódítók uralták. Portyáik, hódító hadjárataik során eljutottak a Balti régió különböző területeire, így a mai Svédországba, Finnországba, Fehéroroszországba, Litvániába, Észtországba, Franciaország északi részeire, Dániába, Oroszország számos részére, valamint Spanyolországba. Ha ez a szelekciós mutáció már több száz évvel ezelőtt megjelent,

akkor valószínűsíthető, hogy valamely más patogén is használja/használta a CCR5 koreceptort a gazdasejtbe való bejutáshoz [Lucotte et al. 1998, Novembre et al. 2005].

Az Észak-európai, Ashkenázi zsidó populációban is magas a  $\Delta 32$  előfordulási gyakorisága. Náluk inkább hagyományokra alapuló magyarázat a valószínűbb, mint más populációban az előforduló szóródás [Lucotte et al. 2003]. Ugyanakkor más tanulmányok bizonyították, hogy CCR5 szerepet játszik a reuma kialakulása, valamint a Nyugat-nílusi vírus elleni védekezésben, ami arra enged következtetni, hogy a CCR5 nem minden funkciója kompenzálható más sejtfelszíni molekulák által [Glass et al. 2006].

A természetes rezisztencia egy másik formája afrikai prostituáltak esetében dokumentált. Éveken át, naponta többször is különféle HIV kládok fertőzésének vannak kitéve és annak ellenére, hogy HIV-specifikus immunválasz megfigyelhető náluk, - így a Th-1 helper sejtek, citotoxikus T limfociták (CTL), mukozális IgA válaszreakció, - mégis szeronegátívok maradnak, valamint a HIV RNS sem mutatható ki a szérumban. A kialakulás sem viselkedésbeli, sem pedig demográfiai faktorokkal nem magyarázható, hanem leginkább egyes HLA haplotípusokkal hozható összefüggésbe. A tanulmányokban HLA-A\*6802 és HLA-B18 kapcsolata merült fel a rezisztenciával. Ennek ismerete a terápiás szerek, vakcinák kutatásánál fontos kiinduló alap lehet [Mazzoli et al. 1997, Rowland-Jones et al. 1998].

### **2.3.3. Posztfúziós események**

A replikációs folyamatok korai- és késői fázisra oszthatók. A korai fázis receptor mediált endocitózissal kezdődik, amely során a HIV burka membránfúzióval egyesül a gazdasejt membránjával. A nukleokapszid bejut a citoplazmába és megtörténik a dekapzidáció. Ezt összetett folyamatok követik, aminek az eredményeként a virális cDNS integrálódik a gazdasejt genomjába.

A késői fázis a virális gének transzkripciójával, a transzkriptumok transzlátódásával, struktúr proteinek kialakulásával, víruséréssel és a vírus bimbózás útján történő kiszabadulásával megy végbe.

TRIM5 $\alpha$  egy főemlősökben is kimutatott, faj-specifikus blokkoló faktor, ami képes gátolni a lentivírusok korai replikációs folyamatait. TRIM5 $\alpha$  a természetes immunrendszer fajspecifikus mediátora, amely szerepe dekapozidáció gátlásában van. A sejten belüli antigénfelismerésben és a természetes immunreakció aktiválásában vesz részt. Pontos működése még nem tisztázott [Stremlau et al. 2004].

A dekapozidáció után a két kópiában jelen levő, virális +ssRNS egy virális enzim, a reverz transzkriptáz által kerül átírásra. Először erre a templátra egy negatív irányultságú DNS szintetizálódik a vírusgenom 5' végéig, egy gazdasejt eredetű tRNS, mint indító szekvencia segítségével, ami egy specifikus kötőhelyhez kapcsolódik. A virális LTR, mint promóter játszik szerepet a folyamatban. A következő lépésben a reverz transzkriptáz aktivitása által a primerként funkcionáló RNS szakasz lebomlik, majd a virális templátot használva, a DNS szál 3' irányban kiegészítődik. A reverz transzkriptáz ribonukleáz H aktivitása révén a templát RNS és a kialakult DNS szál elválik egymástól egy kis szakasz kivételével, ami primerként szolgál a komplementer DNS szál kialakulásához. A reverz transzkripció eredményeként kialakul egy duplaszálú DNS molekula, mindkét végén LTR szekvenciákkal [Baltimore 1970, Temin et Mizutani 1970].

A reverz transzkripció az integrációs komplexben megy végbe, aminek részei a a virális nukleinsav, a reverz transzkriptáz és az integráz enzim, a provirális DNS szállításában szerepet játszó p17 mátrix protein és többek között a provirális DNS nukleo-citoplazmás szállításáért felelős vpr regulátor fehérje. A gazdasejt genomjába az integráz enzim segítségével beékelődött virális cDNS a provírus [Brown et al. 1989, Piller et al. 2003]. A virális DNS beépüléséért sejtes eredetű faktorok is felelősek. A vírus burkán levő gp120 egy kaszkádrendszer által szintén aktiválhatja a sejtet, hogy létrejöjjön az integráció [Bukrinsky et al. 1991].

A provirális DNS transzkripcióját a sejt eredetű RNS-polimeráz II enzim végzi. A transzkripció folyamatok iniciációjában az LTR szekvenciának nagy szerepe van. Az LTR TATA-box régiója köti meg a celluláris eredetű RNS polimeráz II-t. Ide kötődnek még a TATA binding proteinek is. HIV-1 LTR számos kötőhellyel rendelkezik a celluláris transzkripció aktivátor faktorok SP-1-ek számára [Rittner et al. 1995]. A core promoter régió transzkripciót szabályozó, NF- $\kappa$ B kötőhelyekkel is rendelkezik [Nabel et al. 1987]. A transzkripció során először rövid, többszörösen vágott mRNS-ek

képződnek, amik a virális Tat és Rev, Nef regulációs proteinek kódoló gének transzkriptjei. Később megjelennek a nagyobb méretű, részlegesen hasított mRNS-ek is. Ezek az Env, a Vif, a Vpr és Vpu proteinek kódoló transzkriptek. Szintén kialakul egy nagyobb méretű, vágatlan transzkript, ami a virális RNS genomot, valamint a Gag és Pol fehérjék transzkriptjeit foglalja magába. A Tat egy virális transzaktivátor, ami a TAR-on (transactivation response region) keresztül szabályozza a transzkripciót. Tat specifikusan tud kötődni TAR régióhoz az RNS megfelelő konformációs változása után [Aboul-ela et al. 1995, Peter 1998]. A Tat aktivitását bizonyos celluláris faktorok CDK 9 és a ciklin T is befolyásolják, stabil komplexet hozva létre a TAR régióval. Kísérletekkel bizonyították, hogy Tat hiányában egy celluláris faktor a NELF (negative elongation factor) kapcsolódik az RNS TAR részéhez, ezzel gátolva a transzkripció elvégzését.

Ahhoz, hogy a HIV proteinek transzlációjához szükséges mRNS-ek létrejöjjenek, összetett splicing folyamatok sorozatára van szükség. Eredményeként több, mint 40 féle, vírus proteinek kódoló mRNS lesz jelen a fertőzött sejtben. Rev a keletkezett transzkriptumok nukleocitoplazmás transzportjában játszik szerepet. Tat és Rev egyaránt elengedhetetlen elemei a virális replikációnak, valamint annak, hogy a látens vírus aktiválódjon [Narita et al. 2003].

A hatékony virális replikációban a Vif proteineknek is jelentős szerepük van. Kivédik a gazdasejt eredetű APOBEC3G okozta hipermutációkat. A *pol* gén termékei a reverz transzkriptáz, a proteáz és az integráz enzimek jelentős szerepet játszanak a vírusreplikációs folyamatokban.

A Vpr az integrációs komplex transzportján kívül képes gátolni bizonyos mitotikus folyamatokat, a G2 fázisban tartva a sejtet azzal, hogy gátolja a G2/M fázisváltáshoz szükséges érést elősegítő faktorokat, valamint azok aktiváló kaszkádrendszerét. Így CDC2 kináz megfelelő funkcionális működésének hiányában nem lép be a sejt az M fázisba [Jowett et al. 1995].

A Nef és Vpu proteinek számos gazdasejt eredetű faktor gátlásával érik el, hogy a HIV fertőzött sejt elkerülje az immunrendszer válaszreakcióit. Hatásukra csökken a fertőzött sejtek felszínén a CD4 receptor kifejeződése is. Vpu intracelluláris aktivitásával a CD4 molekula degradációját idézi elő. Nef és Vpu a HIV fertőzött CD4 T-sejteket az antitest-függő sejt-közvetítette sejtlyízistől (ADCC) megvédik, ami az

egyik legfőbb védekező mechanizmusa a szervezetnek a HIV fertőzéssel szemben [Pham et al. 2014].

A vírus kiszabadulásában a vpu-nak van nagy szerepe. A bimbózás után a virális burok sejtes eredetű fehérjéket, szénhidrátokat, foszfolipideket, valamint koleszterolt tartalmazhat. A T-sejtekben történő vírusreplikáció eredményeként a virionok a szövetek közti térbe kerülnek, míg makrofág/monocita fertőzésekkor a keletkezett virionok celluláris vakuolumokban halmozódhatnak fel.

#### **2.4. A HIV és az immunrendszer**

A sejtről lefüződő virionok a gazdasejt membránjának egyes molekuláit is magukkal vihetik (pl.: HLA, CD4, CD44, LFA-1, ICAM-1, CD55, CD59), majd újabb sejteket fertőzhetnek. Azáltal, hogy gazdasejt eredetű összetevőket hordoznak védelemre tehetnek szert az immunrendszer válaszreakcióival szemben.

HIV fertőzésben a CD4 T-sejtek számának csökkenése nagyrészt a programozott sejthalál miatt történik. Az apoptózis létrejötté összetett folyamatok következménye. A vírus mennyisége nem áll arányban a sejthalál mértékével. Ennek oka lehet az is, hogy nem minden CD4 T-sejt apoptózist az aktív vírus replikáció váltja ki, vagy, hogy a keringő CD4 sejtek számának meghatározása - bár ez kétség kívül egyszerűen kivitelezhető - nem biztos, hogy fiziológiásan releváns ahhoz, hogy megbecsüljük a funkcionális CD4 sejtek veszteségét [Banda et al. 1992, Finkel et al. 1995, Jiao et al. 2009].

Az apoptózisnak számos induktora lehet, így például létrejöhet stressz, toxinok, növekedési faktorok, FasL, TRAIL vagy TNF hatására is. A perifériás keringésben és a nyirokcsomókban, a CD4 és CD8+ T-sejtekben, B-sejtekben, monocitákban, makrofágokban, NK sejteken magas Fas szint mérhető. A membránkötött és szolubilis Fas és FasL növekedett szintet mutat HIV páciensekben és a fertőzés előrehaladtával egyenes arányban növekszik [Mitra et al. 1996].

Kísérletekben bizonyították, hogy a virális Tat proteinek képesek fokozni a sejtek által termelt TRAIL mennyiségét, amik aztán a szomszédos, nem fertőzött T-sejtekben indukálhatnak sejthalált. TRAIL a TNF család tagja és a HIV fertőzött CD4



sejtekben a DR4 és DR5 receptorokhoz való kapcsolódása által indukál apoptózist. A sejtfelszínen megnövekedett mennyiségű receptor-ligand komplex figyelhető meg [Herbeuval et al. 2005].

Ahogy a HIV fertőzöttekben a CD4 T-sejtek száma Fas-függő és független mehanizmusok által csökken, úgy változik a CD8+ T-sejtek és a monociták aránya. HIV fertőzöttekben a megnövekedett aktiváció indukálta sejthalál nem csak a CD4, hanem a CD8+ T-sejtek kimerülését is eredményezi [Yang et al. 2003].

A HIV proteinek is szerepet játszanak a fertőzött sejtek pusztulásában. A Tat, Nef, Vpr, Vpu/Vpx, gp120 szerepelnek ezek között. Kaszkádrendszer indukálásával a gp120 képes sejthalált indukálni más sejttípusokban is, így az idegsejtekben, erek endoteliumában, szívizomsejtekben, a proximális vesetubulusokban, májsejtekben, tüdő endoteliális sejteiben, csontokban, stb.

A korai vírusreplikációs folyamatok egyik első génterméke a Nef fehérje, ami többek között a CD4 receptorok és az MHC-I molekulák kifejeződésének gátlásában játszik szerepet, valamint elősegíti a vírus szaporodását. Hatására Fas/FasL mennyisége növekszik és a lizoszómák permeabilitását okozva cahtepsin-D áramlik a sejtplazmába, mitokondriális membránkárosodást okozva [Zauli et al. 1999].

A Vpr egy olyan HIV protein, amely számos funkcióval rendelkezik, többek között az NF- $\kappa$ B-függő proinflammatorikus citokin termelés, valamint Bax gátlásával fejti ki hatását, ugyanakkor Bcl-2 termelődését segíti. Összességében elmondható, hogy az alacsony szintű, intracelluláris Vpr protein jelenléte gátolja a T limfociták sejtosztódási folyamatait és segíti a HIV fennmaradását és replikációs lépéseit [Conti et al. 1998]. A citotoxikus T-sejtek (CTL) képesek felismerni a vírussal fertőzött sejtet, majd megsemmisítik azokat. A HIV Nef proteinje hatására a fertőzött sejt felszínén csökken a HLA-I mennyisége, így nehezebbé válik a CTL-nak ezeknek a sejteknek az eliminálása. Ennek ellenére HIV fertőzöttekben nagymértékű CTL aktivitás mérhető. Ugyanakkor kimutatták, hogy a HIV-specifikus CTL tevékenysége kapcsolatba hozható az interferon- $\gamma$  és TNF $\alpha$  termeléssel [Lichterfeld et al. 2004].

Az immunrendszer elemei által termelődő citokin mintázat hatására kialakulnak a T<sub>H</sub>1 és T<sub>H</sub>2 sejtek. Az előbbieket leginkább IL2-t és interferonokat termelnek, amelyek stimulálhatják az immunrendszer sejteit, így a CTL-kat, NK-sejteket, makrofágokat. A T<sub>H</sub>2 sejtekre leginkább az IL4, IL5, IL6, IL10, IL12 termelése jellemző, amik inkább a

humorális immunválaszt stimulálják [Clapham et al. 1983, Maggi et al. 1987, Clerici et al. 1992]. HIV fertőzésnél jelen vannak neutralizáló antitestek is, amelyek számos virális komponenssel szemben alakulhatnak ki. Gyakran mire az antitestek kifejlődnek már mutálódott, új típusú vírusok cirkulálnak a plazmában. Az immunhiányos állapot kialakulásakor egyre nagyobb titerben van jelen a p24 antigén [Gray et al. 2007].

Amint a CD4 T-sejtek száma egyre csökken a vírus mennyisége a plazmában egyre növekszik.

## 2.5. Akut HIV infekció

A HIV terjedése parenterális, szexuális és vertikális úton történhet. HIV fertőzést követő inkubációs idő pár naptól pár hétig tarthat. A fertőzés után gyors vírus szaporodás és a CD4 T-sejtek számának csökkenése figyelhető meg, megnövekedett CD8 szint és a CD4/CD8 arány csökkenése jellemzi a fertőzést.

A megnyilvánuló klinikai tünetek leginkább mononukleozisra emlékeztetnek. A fertőzésnek ez a stádiuma addig tart, amíg antitestek ki nem fejlődnek. Sokszor a kezdeti tünetek alapján nem gondolnak HIV fertőzés lehetőségére. Az esetek többségében virális eredetű léguti megbetegségekkel téveszthető össze a klinikai kép, de egyéntől függően számos tünet előfordulhat. A magas láz az esetek többségében jelen van, általában 2-3 nappal a láz kezdete után előfordulhatnak kiütések. Ezek körülbelül egy hétig vannak jelen. A szájban és a genitáliákon fekélyek jelentkezhetnek, valamint gyakran izom- és ízületi panaszok, levertség, torokfájás, izzadás, testsúlyvesztés tartozik a leggyakoribb tünetek közé [Cooper et al. 1985, Kahn et al. 1998]. A HIV fertőzés helyes diagnózisa rendkívül fontos, ugyanis a vírus az esetek legnagyobb részében ilyenkor adódik át. A magas rizikófaktorú életvitelt indikáló tényezőként kell figyelembe venni a tünetek megjelenésekor.

## 2.6. Opportunista fertőzések

A fejlett országokban a korábban magas prevalenciájú opportunistá fertőzések egyre kisebb számban jelennek meg, mint a HAART-éra előtti időben. Korábban az AIDS-el diagnosztizáltak várható élettartama pár év volt. Napjainkban a kombinált antiretrovirális terápiának köszönhetően évtizedekre nyúlhat ki ez az időszak.

A fertőzöttek nagy százalékában, akikben már kialakult az AIDS a súlyos opportunistá fertőzésekkel túl későn kerülnek orvoshoz, mert nincsenek tisztában a ténnyel, hogy fertőzöttek. Az opportunistá fertőzések megjelenése az immunszuppresszió mértékétől is függ, aminek diagnosztikus mutatói lehetnek a HIV-RNS szint a plazmában, valamint a CD4 T-sejtszám. Ugyanakkor a HIV-RNS mennyisége nehezebben hozható kapcsolatba bizonyos mikrobiális fertőzések megjelenésével, mint a CD4 T-sejtek száma. A HIV fertőzötteknél gyakran jelennek meg nem-specifikus tünetek, mint elesettség, izom- és ízületi fájdalmak, testsúlyvesztés, éjszakai izzadás. Azonban ezeket a tüneteket bizonyos opportunistá fertőzések is produkálhatják [Mellors et al. 1996, Brooks et al. 2009].

CD4 T-sejtszámtól függetlenül a HIV fertőzötteknél alsó- és felső léguti megbetegedések, valamint a hajás sejtés leukoplakia, a Kaposi-szarkóma megjelenése nagyon gyakori. Amint a CD4 T-sejtszám  $500/\text{mm}^3$  alá esik, megnő a tuberkulózis, candidiasis, valamint herpeszvírusok okozta fertőzések gyakorisága. Amint az érték  $200/\text{mm}^3$  alatt van a *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP), coccidiomycosis, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, *Molluscum contagiosum*, *Cryptococcus neoformans* okozta meningitis, *Toxoplasma gondii*, JC vírus okozta PML, *Mycobacterium avium* komplex és a non-Hodkin's lymphoma előfordulása is egyre gyakoribb. CD4 T-sejt szám  $50/\text{mm}^3$  alá süllyedésével *Pseudomonas* okozta pneumonia, CMV retinitis, CNS lymphoma, aspergillosis és histoplasmosis is előfordulhat. Természetesen ez alatt az érték alatt már bármilyen mikrobiális fertőzés jelentkezhet [Stahl et al. 1982, Jung et al. 1998].

A CD4 sejtszám csökkenésével a vakcinák hatásfoka is csökken, vagy az oltás be sem adható. Egyre nagyobb a kockázata az utazásokkal kapcsolatos fertőzéseknek, így az endémiás mikózisoknak, parazitás fertőzéseknek, STI-knek, enterális megbetegedéseknek. A malária és HIV, valamint terápiájuk során fellépő interakciók

egyre nagyobb hangsúlyt kapnak. HIV fertőzöttek maláriás tünetei gyakoribb lázrohamokkal és súlyosabb tünetekkel bírnak. 200/mm<sup>3</sup> alatti CD4 számnál az antimaláriás szerek hatékonysága jelentősen csökken. A proinflammatorikus citokinek hatására a HIV replikáció jelentősen megnövekszik. Az antimaláriás és HIV ellenes terápiás szerek farmakokinetikai kölcsönhatásai még nem teljes mértékben ismertek. A mefloquin hatását akár 30%-al is képes csökkenteni az ART. Súlyos maláriás esetekben a HIV terápiát akár meg is kell szakítani [Shah et al. 2006].

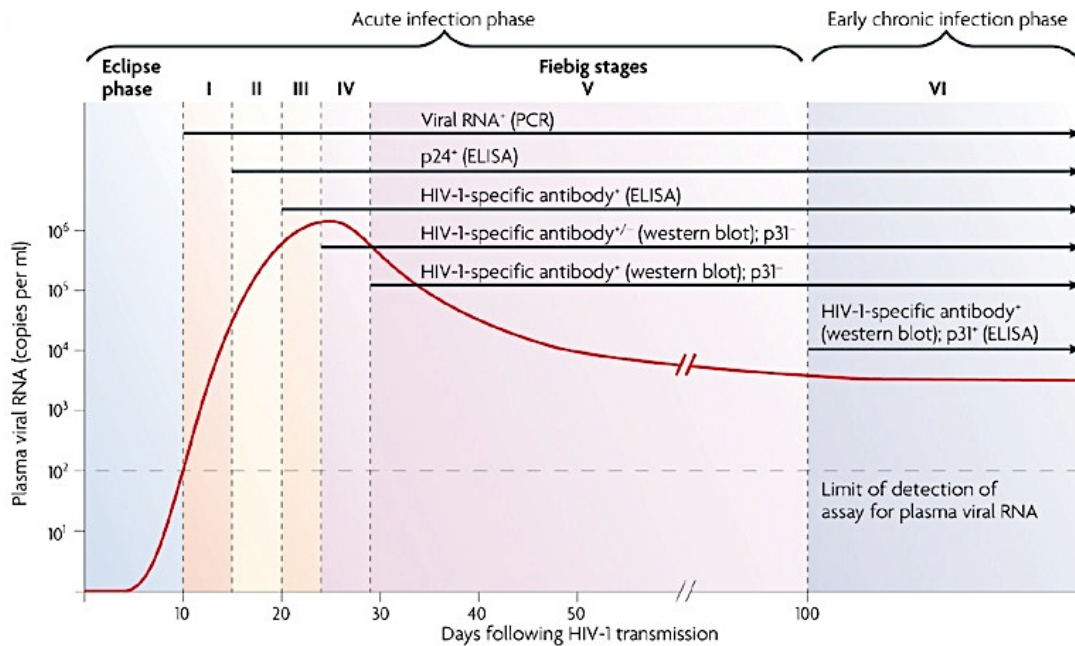
## 2.7. HIV fertőzés kimutatása

A HIV fertőzés kimutatásakor a virális nukleinsav, vagy a virális proteinek illetve az ellenanyagok kimutatása a cél. Az akut HIV fertőzöttek, akik nincsenek tisztában egészségügyi státuszukkal nagy eséllyel fő források a vírus terjesztésében.

A fertőzés kimutatására a korábbiakban kifejlesztett tesztek csak a szerokonverzió után adtak lehetőséget. A harmadik generációs EIA tesztek a specifikus IgM megjelenését mutatják ki. Nagy előrelépés volt a negyedik generációs EIA tesztek kifejlesztése, amely nemcsak a p24 antitestek, hanem kombináltan, a p24 antigének kimutatásával lehetőséget teremtettek a vírus szerokonverzió előtti kimutatására. Bár ennek a módszernek nagy hibája, hogy téves negatív eredményt ad, ha a p24 antigén és a p24 antitest equivalencia zónában van. Pozitív eredmény esetén mindenképpen megerősítő vizsgálatra van szükség [Weber et al. 1998]. Amint az antitestek szintje emelkedni kezd, egyre nehezebb kimutatni a p24 antigén jelenlétét egészen a fertőzés előrehaladott stádiumáig. A különféle ELISA módszerek segítségével szintén lehetőség van a fertőzés kimutatására, bár a kapott eredmény csak negatív esetben elfogadott. Amennyiben pozitív eredményt kapunk, azt Western-blot segítségével verifikálni kell. A Western-blotnál is specifikusabb eljárás, a RIBA (rekombináns immunoblot assay) segítségével végezhető el [Mas et al. 1997].

Érzékenyebb módszerek közé tartoznak azok a tesztek, amiket a virális nukleinsav kimutatására fejlesztettek ki. Az alkalmazott módszerek, így mint a "branched chain" DNS, NAT, PCR, RT-PCR és GeneProbe technikák nagy érzékenységgel bírnak, már a szerokonverzió előtt alkalmasak a plazma vírus RNS

kimutatására, de az esetek nagyon kis százalékában itt is előfordulhat ál-reaktív eredmény. Egyes esetekben a kimutatást megismételve ugyanazzal a módszerrel, ugyanabból a mintából már negatív eredményt adhat. A duplikált mérési eredmények már biztosabb információval szolgálnak (11. ábra).



11. ábra. HIV fertőzés kimutatási lehetőségei

A HIV fertőzést követően a plazma vírus RNS szintje egyre emelkedik. A csúcst a fertőzést követő 21-28. napon éri el. Ezután enyhe csökkenés figyelhető meg. A páciensek kategorizálása a Fiebig osztályozás alapján, I-VI-ig történhet, alapul véve a pozitív diagnosztikus kimutató módszereket. Ezek lehetnek a HIV-RNS kimutatása PCR segítségével, p24 és p31 virális antigének és egyéb HIV-specifikus antitestek kimutatása ELISA használatával, valamint HIV-1 specifikus antitestek jelenlétének vizsgálata Western blottal. A primer fertőzést után körülbelül 100 nappal a páciensek a Fiebig V. szintre kerülnek. A plazma viriontartalma itt állandósult fázist ér el [McMichael et al. 2010].

Említést tehetünk még különféle gyorsesztekről, amelyekkel vér- és nyálminták vizsgálhatók. Ezek viszonylag specifikusak, de gyakran adhatnak nem megbízható eredményt.

A UNAIDS és a WHO által kiadott etikai alapelvek szerint azoknak az embereknek, akik reaktív HIV teszt eredményt kapnak, biztosítani kell az alapvető emberi jogokat, elkerülve negatív megkülönböztetésüket, stigmatizációjukat a társadalomban.

## 2.8. Terápia és a megelőzés lehetőségei

Először, 1983-ban az Egyesült Államok Kongresszusa 12 millió dollárt utalt ki az Egyesült Államok Egészségügyi és Szociális Minisztériuma részére, AIDS kutatásra. 1985-ben ez az összeg még 70 millió dollárral emelkedett. Az első antiretrovirális hatású gyógyszer az AZT (ziduvudine, Retrovir®) 1986-ban jelent meg, amely nagy áttörés volt a HIV terápia terén. Azóta különféle eltérő hatásmechanizmusú szer kombinált alkalmazása valósult meg. Az ideális HIV ellenes vegyület azonban nem csak megfékezne a vírust, hanem megszüntetné jelenlétét a szervezetben belül.

Bár kezdetben reménykedtek egy monoterápia sikerességében, de később kiderült, hogy a különböző támadáspontot alkalmazó antiretrovirális szerek kombinációja megoldás lehet a keresett kérdésre. 1996-ban európai, ausztráliai és amerikai kutatócsoportok arra az eredményre jutottak, hogy két nukleozid analóg reverz transzkriptáz gátló (NRTI) kombinált alkalmazásával jobb eredményeket érnek el a terápia tekintetében, mint a monoterápiával [Hammer et al. 1996].

A reverz transzkriptáz aktivitására ható nukleozid analógok után megjelentek a HIV egy másik enzimjét, a proteázt gátló (PI - protease inhibitor) szerek [Nagy et al. 1994]. Az első a saquinavir, ezt követte a ritonavir, majd az indinavir következett. 1996 júniusában Vancouverben megrendezett "World AIDS Conference" alkalmat adott, hogy bemutassák az "új AIDS koktélt", ami már az említett PI-t is tartalmazta a kombinációs kezelés részeként. Ezzel kezdetét vette a HAART (highly active antiretroviral therapy) éra.

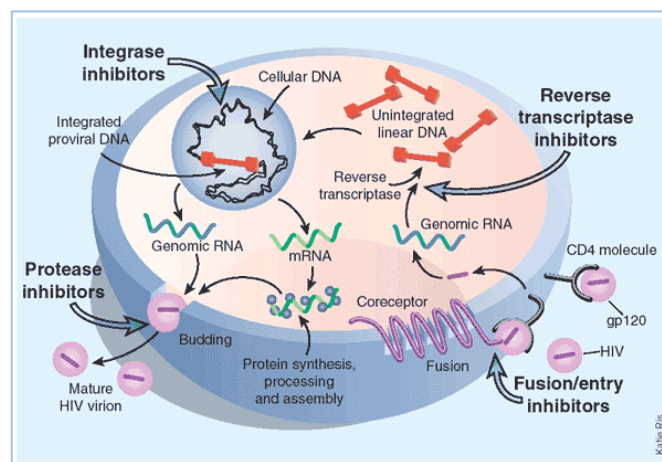
1996 júniusára megjelent az első nem-nukleozid analóg reverz transzkriptáz gátló (NNRTI) a nevirapine. A nagy lelkesedést kezdte beárnyékolni a terápiás szerek mellékhatásainak megjelenése.

A CCR5 antagonisták, mint a maraviroc, vagy az integráz inhibitor raltegravir, egyéb fúziós inhibitorok megjelenése egészen új alapokra helyezte az antiretrovirális terápiát. Kisebb mellékhatással rendelkeznek és alacsonyán képesek tartani a szérumban a vírus szintjét (12. ábra).

Napjainkban alkalmazott ART-val normál élettartamra számíthat a páciens, bár még mindig számolnunk kell a mellékhatásokkal, amely lehet gyógyszer allergia, mitokondriális toxicitás általi hatások, a máj, a vese, a szív, a csontok, így bármely

szerv- és szervrendszer érintettségével járó elváltozások. PI-nál hason felhalmozódó zsírlerek alakulnak ki, valamint a nyaki tájékon az úgynevezett "bölény púp" jelent meg, ugyanakkor elvékonyodott végtagok és beesett arc jellemzi a tüneteket. Az ART hatására férfiakban csökken a libidó, valamint a tesztoszteron termelés. Számolnunk kell egyéb gyógyszerekkel, táplálék kiegészítőkkel, fogamzásgátlókkal kialakított farmakokinetikai kölcsönhatásokkal is. A fogamzásgátlók hatékonyságát az antiretrovirális szerek jelentősen csökkenthetik, valamint teratogének lehetnek. Terhes nők esetében az ART célja a vírusszint maximális szuppressziója a terhesség alatt, valamint a perinatális transzmisszió elkerülése érdekében [Johnson 2008, Paredes 2010].

A kérdés, hogy mikor kezdjük el a terápiát. Erre 1996-os "Év embere" David Ho így adta meg a választ: "Hit hard, hit early". A klinikai alkalmazásban, egyéntől függően határozandó meg a HAART kezelés kezdete. Általánosságban elmondható, hogy a HIV RNS 50 000 - 100 000 kópia/ml, vagy  $<200 - 350/\text{mm}^3$  CD4 limfocita szám általában az irányadó.



12. ábra. Antiretrovirális szerek támadáspontjai

A HIV replikáció során a különböző támadáspontú antiretrovirális szerek a HIV korai és késői replikációs ciklusát gátolhatják. A fúziós és entry inhibitorok a vírus gazdasejtbe jutását gátolhatják meg. NRTI, NNRTI a reverz transzkriptáz enzimre hat, PI a virális proteázokat gátolja. Az integráz enzim gátlásával a provírus nem tud beépülni a gazdasejt genomjába [W7].

A széleskörű kutatások ellenére még mindig nem áll rendelkezésre olyan terápiás szer, ami teljes mértékben eliminálja a vírust a szervezetből.

### 2.8.1. Pre- és posztexpozíciós profilaxis

A HIV fertőzés elleni vakcinák kutatása rendkívül összetett folyamat, de nem egyszerű az alternatív megelőző lehetőségek megtalálása sem. Az ideális preventív stratégiának olcsónak, hatákonynak és egyszerűnek kell lennie. A tűcsereprogram sajnos nem minden országban alkalmazható megoldás az intravénás droghasználók körében. Pedig számuk egyre jobban terjed. A kábítószerélvezők inhaláció helyett a drogokat inkább intravénásan alkalmazzák, így olcsóbban jutnak hatásosabb adagokhoz.

Az óvszer megfelelne ezeknek a kritériumoknak, azonban sok férfi nem szívesen használja. A 90-es évek elején a kutatók olyan stratégiákon kezdtek el gondolkodni, amiket nők tudnának kontrollálni. Ígéretes pre-klinikai eredmények ellenére sajnálatos módon többféle mikrobicid hüvelyzselé nem bizonyult megfelelő hatásfokúnak. Sőt voltak olyanok is, amelyek inkább megnövelték a HIV terjedésének lehetőségét. 2010 elején megjelent a PRO2000 hüvelyzselé, amely ígéretesnek bizonyult. Az újabb generációs mikrobicidek antiretrovirális szerekkel kombináltak, mint például a tenofovir. Próbálkoznak még az úgynevezett vaginális gyűrű használatával, amely nemcsak fogamzásgátló, hanem antiretrovirális hatóanyagú vegyületeket is folyamatosan bocsájt ki a szervezetbe [Saxena et al. 2009].

Három, egymástól független klinikai vizsgálat eredménye szerint a férfiak körülmetélése 50%-al csökkenti a HIV fertőzés átviteli lehetőségét. 2007-től a WHO HIV prevenciók ajánlásai között szerepel a cirkumcizió. Kínában egy speciális szerkezet, a ShangRing segítségével már 5 perc alatt el tudják végezni ezt a beavatkozást, varratokra sincs szükség, csak az eszközt kell tíz napig hordani.

A legjelentősebb HIV prevenciók lépés, hogy megfelelő tájékoztatást kapjanak az emberek, megtanulják elkerülni azokat az élethelyzeteket, amelyek kockázatot jelenthetnek számukra. Amennyiben valakinek akár egészségügyi ellátásban szerzett fertőzés, akár magas kockázatú magatartás (intravénás droghasználat, gyakori szexpartner csere, vagy egyéb nem foglalkozás körében szerzett fertőzés) miatt kerül a vírus a szervezetébe lehetőség van az úgynevezett PEP alkalmazására. A PEP (post exposure prophylaxis) egy olyan megelőzés, amelyet a feltételezett fertőzést követő legkésőbb 72 óráig meg kell kezdeni. Az alkalmazott antiretrovirális szerek ugyanazok, mint amiket egy adott fertőzés esetén a HAART során használnának. A fertőzés



forrásának ismeretében tisztában lehetünk az adott HIV törzs antiretrovirális rezisztenciájával, így a megfelelő kombinációs terápia alkalmazható. Ennek időtartama 28 nap.

A fertőzés létrejötte szempontjából, a magas kockázatot jelentő tevékenység előtt alkalmazott kombinációs antiretrovirális szerek megelőző alkalmazása a PrEP (pre-exposure prophylaxis) is lehetőségként áll fenn. Ugyanakkor számolnunk kell ezeknek a lehetőségeknek a negatív oldalával is. A magas kockázatú viselkedésmódok, így a vérrel, testnedvekkel terjedő kórokozók, valamint szexuális úton, így akár inszertív szexuális segédeszközökkel is terjedő egyéb megbetegedések elősegítői lehetnek [Krakower et al. 2015]. PrEP és PEP negatív hatással bírhat viselkedésmódokra, fennáll a veszélye, hogy ezzel megnőhet a HIV fertőzöttek száma. A lehetőséggel élve felelőtlenebb viselkedés alakulhat ki az emberekben. Ezért leginkább az életmódbeli változtatásokra, megelőző védekezésre kell fordítani a hangsúlyt.

Jelenleg Magyarországon csak az egészségügyi dolgozók részesülhetnek szigorú feltételek mellett PEP kezelésben.

### 2.8.2. Géninterferenciák

A géncsendesítés RNS interferenciával *in vivo* genetikai kísérletekben, T-sejtkultúrákon a vírus replikációs folyamatait csak időszakosan gátolta. Pontmutációk után a célszekvenciák már nem voltak elérhetőek az siRNS-ek számára [Boden et al. 2003, Berkhout et al. 2012].

Számos próbálkozás volt a CCR5 gén módosítására, ezzel gátolva a vírus korai replikációs fázisát. Az utóbbi időben zink-finger nukleázok segítségével végeznek génszerkesztést. A páciensből kinyert immunsejteket az enzimes kezelés után visszajuttatva a saját szervezetbe a keringő, CCR5 mutáns allét hordozó sejtek meggátolják a vírus további szaporodását. A sejtek átalakítása azonban egyenlőre csak alacsony hatékonysággal hajtható végre, a genetikai állományukban módosított sejtek fél-élettartama 48 hét [Tebas et al. 2014].

2008-ban Berlinben egy 40 éves, akut mieloid leukémiában szenvedő, HIV-1 fertőzöttnél allogénikus őssejt átültetést végeztek. A csontvelő donor nem volt rokoni kapcsolatban a recipiensevel, a transzplantátum HLA antigénjei megegyeztek a betegével. A transzplantátum a teszt után homozigótának bizonyult CCR5  $\Delta$ 32 mutációra. A transzplantáció után a recipiens perifériás vérében megjelentek a CCR5  $\Delta$ 32 allélre homozigóta genotípusú monociták. A recipiens saját CD4 T-sejtjei eltűntek, ami az immunszuppresszív terápiával magyarázható. Mivel a betegből X4 variáns vírusok jelenléte is kimutatható volt, ezért a HAART még 20 hónapon keresztül folytatódott. HIV-1 ezek után RNS és provirális DNS PCR-módszerekkel sem volt kimutatható a perifériás vérből, csontvelőből és a rektális mukózáról sem. Az antiretrovirális terápiát felfüggesztették [Hütter et al. 2009].

### **2.8.3. HIV vakcinák**

Számos próbálkozás történt már a HIV vakcinakutatás területén. Az RV144 olyan kifejlesztett, HIV fertőzés megelőzésére hivatott oltóanyag, amely hatásmechanizmusa azon alapul, hogy a HIV burokproteinjének V1/V2 régiójához kapcsolódó IgG antitestek által a fertőzés hatékonysága csökken. Vizsgálták azt is, hogy az immunglobulin indukció alapuló vakcina csak bizonyos törzsek megfékezésére képes-e. III. kísérleti fázisban levő, Thaiföldön tesztelt vakcináról bizonyították, hogy az oltottak fertőzöttségi aránya kevesebb volt a nem oltottakéhoz képest. A vakcina hatékonysága először magas volt, majd 12 hónap után nagymértékben csökkent. [Robb et al. 2012] RV305-el ismétlődő oltássorozatot végeztek Thaiföldön, azokon az önkénteseken, akik az RV144 kísérletben is részt vettek. 2013-ban RV306 ismétlődést alkalmaztak 306 RV144 önkéntesen [Yates et al. 2014] (1. táblázat). Hatékony HIV vakcina napjainkig nem áll rendelkezésre.

1.táblázat. Az AIDS VAX<sup>®</sup> program kísérleti stádiumai

AIDS VAX <sup>®</sup> B/E Clinical Trials						
Study Protocol	Phase	Study Location	Clinical Sponsor	Trial	Priming Vaccine	Study Status
RV 305	2	Thailand	US Surgeon General/Dept. of the Army		Sanofi Pasteur ALVAC vCP1521	On-going
RV 306	2	Thailand	US Surgeon General/Dept. of the Army		Sanofi Pasteur ALVAC vCP1521	On-going
RV 328	2	Thailand	US Surgeon General/Dept. of the Army		None - alone AIDS VAX	On-going
RV 403	2	Thailand / Uganda / Mozambique	US Surgeon General/Dept. of the Army		Sanofi Pasteur ALVAC vCP1521	Seeking Regulatory Approval (1)
HVTN 096	1	Switzerland	EuroVacc Foundation		EuroVacc NYVAC HIV-PT1, NYVAC HIV-PT4, iPox DNA- HIV-PT123	On-going
HVTN 097	1b	Republic of South Africa	NIH/NIAID/DAIDS		Sanofi Pasteur ALVAC vCP1521	On-going
HVTN 105	1b	USA	NIH/NIAID/DAIDS		iPox DNA-HIV-PT123	On-going
HVTN 110	1	USA	PaxVax		PaxVax Ad4 mgag/Env C150	On-going
HVTN 205	1	USA / Peru	NIH/NIAID/DAIDS		GeoVax MVA/HIV62B	Protocol development (1)
PXVX-HIV-100-001	1	USA	PaxVax		PaxVax Ad4 mgag/Env C150	On-going
EV06	1	Uganda	EuroVacc Foundation		iPox DNA-HIV-PT123	On-going

(1) Scheduled to start 2nd half 2015

A táblázat a jelenleg is folyó, valamint tervezett HIV vakcinákról ad tájékoztatást [W9].

### 3. Célkitűzések

"Prevention is most certainly better than cure.  
The best way to control HIV spread is to confront it, talk about it,  
and adopt safe behaviour for prevention.  
Youth participation will play a vital role in HIV prevention."  
- Dr Nimal Hettiaratchy  
UNICEF State Representative for Uttar Pradesh

Célkitűzésünk a HIV fertőzés korai replikációs ciklusának celluláris szinten történő molekuláris elemzése során olyan folyamatok átfogóbb megismerése volt, amelyek szelektíven befolyásolják a különböző tropizmussal rendelkező vírusok gazdasejtbe történő bejutásának lépéseit, a fertőzőképesség hatékonyságát.

Munkánk során ismereteink bővítése a következőkre terjedt ki:

- ❖ HIV fertőzést reprodukáló, inhibíciós kísérletekben a koreceptor preferencián alapuló lentivírus vektorokkal végzett infektivitási kísérletek információval szolgáló, kvantitatív eredményeket biztosítanak-e antiretrovirális hatású vegyületek vizsgálatában? HIV produktív fertőzéshez szükséges kemokin receptorok funkciójának vizsgálata.
- ❖ Új, alternatív mechanizmusok vizsgálata, amely eredményeként a sejt felszíni fehérjék diszulfid kötéseinek módosulása által befolyásolt redox folyamatok megváltoztatják a HIV korai replikációs folyamatát, az Env-mediált fúziót.
- ❖ Szintetikus úton előállított politolált oligonukleotidok HIV gazdasejtbe jutását gátló, antiretrovirális hatásának vizsgálata. A magas mutációs rátával rendelkező humán retrovírusok könnyen alakítanak ki rezisztenciát a jelenlegi terápiák során alkalmazott enzim inhibitorokkal szemben (NNRTI, NRTI, PI). Vajon a jövő terápiás szerepei a vírus gazdasejtbe való bejutását gátló "*entry inhibitor*" mechanizmusú vegyületek lehetnek?
- ❖ Miképp befolyásolja a fertőzés iránti fogékonyságot, ezáltal az antiretrovirális terápiát a HIV korai replikációs folyamataiban szerepet játszó receptorok funkcionális épsége, a kódoló gén mutációja?
- ❖ Magyarország Európa közepén levő migrációs pontban helyezkedik el. Az egyes földrajzi területekre jellemző cirkuláló HIV altípusok előfordulnak-e magyarországi terápia-naïve HIV fertőzöttekben?

## 4. Módszerek

"We have been climbing this epidemic one hill at a time.  
Now we must finish our journey with a final climb,  
and we cannot lose anyone along the way."  
- Michel Sidibé  
20th International AIDS Conference Opening Session,  
2014. Melbourne, Australia

### 4.1. A kísérlet során felhasznált sejtvonalak, vírustörzsek, virionok

A fertőzött sejtben interakciók játszódnak le a vírus és a gazdasejt között, a vírusfertőzés által kialakított klinikai kép molekuláris történései itt zajlanak le, valamint ez a prevenció és terápia helyszíne. A fejezetben leírt, szigorúan steril körülmények között felszaporított és fenntartott, homogén sejt kultúráinkon végeztük kísérleteinket.

#### 4.1.1. Alkalmazott sejtvonalak

A kísérleteink során használt sejtek CD4 receptort kifejező, humán H9 T-sejtvonal, MT-2 T-sejtvonal; a transzfektált monolayer sejtvonalak közül a HEK 293T humán embrionális vesesejtekből származó sejtvonal, valamint HeLaCD4-LTR- $\beta$ -gal immortalizált sejtvonal, melyek eredete a NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (Bethesda, MD).

A HEK 293T sejtek adenovírus, valamint SV40 virális promóterrel transzfektáltak, ami biztosítja az expressziós vektorok kifejeződését [Gillet et al. 2011]. A HeLaCD4-LTR- $\beta$ -gal sejtvonal HeLa sejtek transzfekciójával kialakított, monolayer sejtvonal. A sejtek felszínükön hordozzák a HIV kapcsolódásához szükséges CD4 receptort, valamint HIV LTR régiók között levő  $\beta$ -galaktozidáz enzim génjével is transzfektáltak. Jól modellezhetővé és kimutathatóvá teszik a primer HIV fertőzés folyamatát [Nagy et al. 1994]. A sejtvonalak fenntartása DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 10% FCS (fetal calf serum) és 0,1% Penicillin/Streptomycin összetételű tápfolyadékban történt (Sigma-Aldrich).

H9 és MT-2 limfocita sejtek fenntartására és szaporítására RPMI-1640

tápfolyadékot használtunk, 10% FCS (fetal calf serum), 0,1% Penicillin/Streptomycin hozzáadásával, valamint 2 mM L-glutaminnal kiegészítve (Sigma-Aldrich).

A 3T3.T4.CCR5 és 3T3.T4.CXCR4 egér fibroblaszt; P4-CCR5 transzfektált humán fibroblaszt sejtvonalakat Dr Christian Jassoy bocsájtotta rendelkezésünkre (Institute of Virology, University of Leipzig, Faculty of Medicine, Leipzig, Germany). A sejteken jelölésüknek megfelelően CCR5 vagy CXCR4 koreceptorok fejeződnek ki, melyek a vírus-sejt közötti kapcsolódásban, a vírus korai replikációs ciklus folyamatában nagy szerepet játszanak. A sejtvonalak fenntartása DMEM, 10% FCS, valamint 0,1% Penicillin/Streptomycin és összetételű tápfolyadékban történt. A P4-CCR5 sejtek tulajdonképpen transzfektált HeLaCD4-LTR- $\beta$ -gal sejt eredetűek, felszínükön hordozzák a CCR5 koreceptort, valamint genomjukban LTR szekvenciák között a *lacZ* gént [W5].

#### 4.1.2. HIV-1<sub>IIIB</sub> vírustörzs

A kísérleteink során használt HIV-1<sub>IIIB</sub> törzs (R. Weiss, London University) felszaporítása H9 permanens T limfocita sejtvonalon történt (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Bethesda, MD). A felszaporított humán perifériás mononukleáris sejtek HIV-1<sub>IIIB</sub> vírustörzsszel való fertőzése után, a fertőzést követő negyedik, ötödik és hatodik napon a sejtenyészet tápfolyadékát összegyűjtöttük. Ebben voltak az újonnan szintetizálódott virionok. Az infekciós titer meghatározása MT-2 humán T-sejtvonalat használtunk. A  $2,1 \times 10^5$  IU/ml felülűszót 0,45  $\mu$ m pórusátmérőjű szűrőn filtráltuk (Merck Millipore). A tárolás -80 °C-on történt.

#### 4.1.3. HIV pszeudovirionok

Plazmidok segítségével HIV pszeudovirionokat állítottunk elő. Fogékony sejteket fertőzve a létrehozott pszeudovirionok bejutnak a gazdasejtbe, de replikációra nem lesznek képesek. A HIV pszeudovirionok riporter géneket tartalmaznak, így kvantitatívan mérhető a gazdasejtet fertőző vírusok mennyisége. Az *env* gén nincs LTR

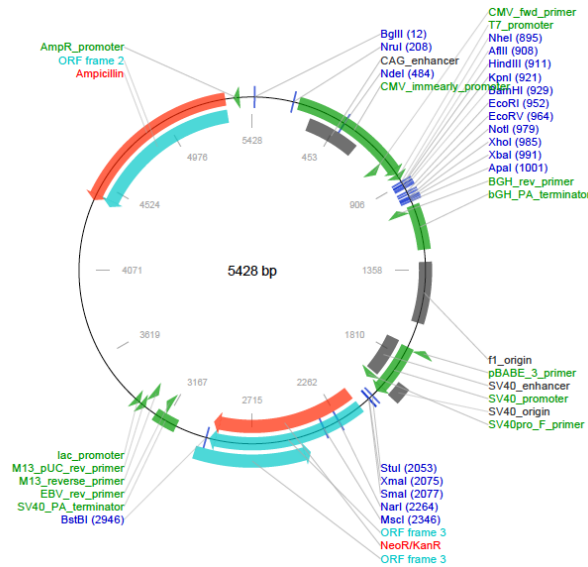
régiók közé ékelve, valamint az eltávolított regulátor és járulékos HIV gének és a 3'U3 régió miatt a HIV pszeudovirionok szaporodásra képtelenek.

A rekombináns technikával létrehozott, defektív HIV konstrukciók különböző típusú glikoprotein molekulákat fejeznek ki felszínükön, így a kemokin receptor preferenciájuk szerint lehetnek CCR5-tróp, CXCR4-tróp és Dual-tróp pszeudovirionok. Ez utóbbi be tud jutni mind a CCR5, mind pedig a CXCR4 típusú koreceptort hordozó sejtekbe. A pszeudovirionok gazdasejtet fertőző képességét CD4 receptort, valamint CCR5 vagy CXCR4 koreceptort kifejező, transzfektált humán és egér eredetű sejtvonalakon vizsgáltuk. A fertőzés mértékét a riporter gének mérésével végezhetjük [Jármy et al. 2001].

#### 4.1.3.1. HIV pszeudovirionok előállítása

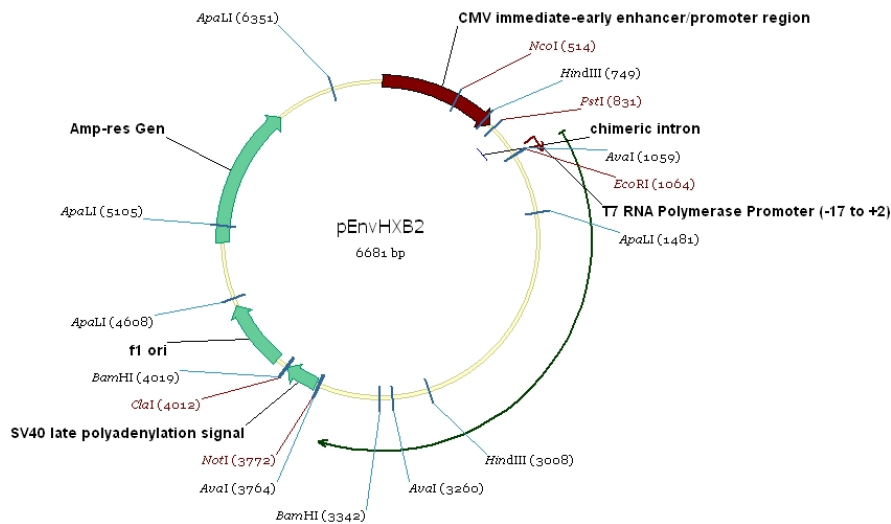
Hat féle plazmid típust alkalmaztunk a HIV pszeudovirionok előállításához. A kiméra vektorok a pcDNA3.1 (Addgene) plazmid módosításával lettek létrehozva. A vírus 5' régiójánál a CMV eredetű promóter egy transzkripció kezdőpont mellé van inszertálva (13. ábra) [W4]. Három féle, burokfehérjét kódoló génekkel inszertált plazmiddal; valamint három féle, LTR szekvenciák között riporter gént és HIV *gag-pol* géneket hordozó plazmiddal rendelkezünk.

A HIV burok proteineket kódoló géneket hordozó kiméra plazmidok klinikai izolátumokból, illetve laboratóriumi törzsekből származó HIV *env* géneket tartalmaznak. B szubtypusú, HIV-1 vírustörzs géneknek RT-PCR (Stratagene) amplifikációja után restrikciós endonukleázok segítségével történt meg a bejuttatása a vektorba. Ezáltal a plazmidok pEnvM-ad, CCR5-tróp burok glikoproteint kódoló gént, pEnvHXB2 CXCR4-tróp burok glikoproteint kódoló gént és pEnvM-ad/HXB2 dual-tróp burok glikoproteineket kódoló gént tartalmaznak (14. ábra) [Jármy et al. 2001].



13. ábra. pcDNA3.1 plazmid

A kísérlet során felhasznált pGJ3 plazmid az ábrán látható pcDNA3.1 plazmid átalakításával lett létrehozva. Markerként antibiotikum rezisztencia génet hordozó, pGJ3 plazmid kiméra vektorként szerepelt kísérleteinkben [W4].

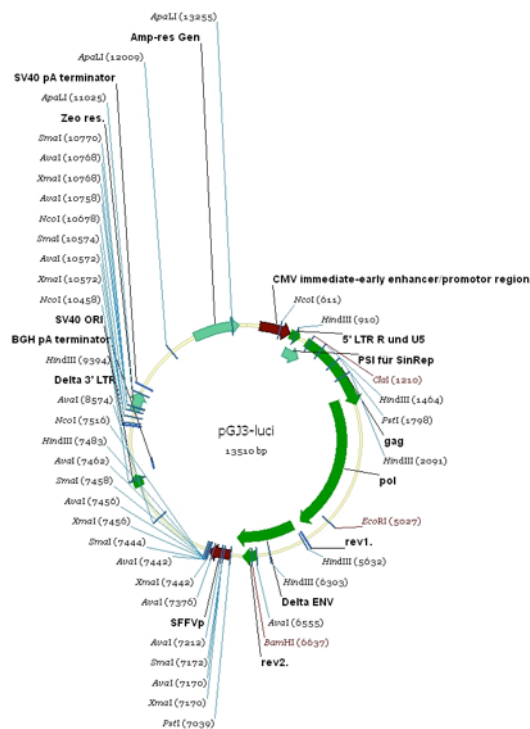


14. ábra. HIV burok glikoproteint kódoló gént hordozó plazmid

Az ábrán látható plazmid a HIV burok glikoproteint kódoló gént tartalmazza. A plazmid konstrukció kiméra intronként HIV felszíni glikoproteineket kódoló génet tartalmaz. Ezek a plazmidok CXCR4 koreceptort preferáló, X4-típusú, illetve CCR5 koreceptort használó R5-típusú és X4/R5-tropitású (Dual-trop) pseudovirionok előállítására alkalmasak.



A kísérleteinkben használt pGJ3 plazmid a pcDNA3.1 plazmid átalakításával jött létre. A plazmidok a HIV gén mellett antibiotikum rezisztencia marker gént és riporter géneket is tartalmaznak. A riporter gének alapján megkülönböztethetjük a pGJ3-luciferáz plazmidot, amely luciferáz enzim génjét, a pGJ3-eGFP (enhanced green fluorescent protein) plazmidot, ami a zöld fluorescens protein génjét és a pGJ3-lacZ plazmidot, ami az *E. coli lacZ* génjét hordozza. A pGJ3-luciferáz, pGJ3-eGFP és a pGJ3-lacZ típusú, riporter géneket tartalmazó bakteriális vektor konstrukciók LTR szekvenciák között HIV *gag-pol* géneket is tartalmaznak (15. ábra). (A plazmidok eredete: Institute of Virology, University of Leipzig, Faculty of Medicine, Leipzig, Germany.)



15. ábra. Riporter géneket, valamint HIV *env* és *pol* géneket hordozó plazmid

Az ábrán látható plazmid a luciferáz enzim génjét tartalmazza, mint riporter gént. Kísérleteinkben használt riporter gén lehet még az eGFP (enhanced green fluorescent protein) vagy a  $\beta$ -galaktozidáz enzim génje is. A riporter gén és az inszertált HIV gén LTR szekvenciák között vannak.

A vektor konstrukciók marker génje, az ampicillin rezisztencia gén jelentősége a plazmidok kompetens DH5 $\alpha$  *E. coli* sejtekben történő felszaporításánál van. Szelekciós markerként segít kiválasztani azokat a baktérium telepeket, amelyekben a plazmidok felszaporodtak. A plazmidok izolálását protokoll szerint a Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen) segítségével végeztük. A plazmidok tárolása -20 °C-on történik. Az izolált,

felszaporított plazmidok közül kiválasztottuk a tervezett kísérleteinkhez megfelelő ligandumot kódoló, *env* gént hordozó plazmidot, valamint a tervezett mérési módszernek megfelelő riporter gént és HIV core géneket tartalmazó plazmidot. A kiválasztott kétféle plazmid típusal HEK293T sejteket transzfektáltunk kalcium-foszfát protokoll szerint. 2-3 órával a plazmid DNS hozzáadás után megkezdődik a HIV pszeudovirionok összeépülése. A létrejött kiméra konstrukciókat a felülúszó összegűjtése után -80 °C-on tárolhatjuk. Mivel az *env* gének nincsenek LTR szekvenciák között és hiányoznak a HIV járulékos gének is, ezért a létrejött HIV pszeudovirionok replikáció inkompetensek. A kísérletekben használva fertőznek, de szaporodásra nem képesek. A fertőzés kvantitatív mérése a riporter gének alapján kerül megválasztásra. A releváns koreceptort hordozó sejtek pGJ3-luciferáz plazmiddal történt fertőzéskor luminometriás mérési módszert alkalmazunk, a pGJ3-eGFP plazmid esetében, ami a zöld fluorescens protein génjét hordozza, UV mikroszkóp segítségével határozhatjuk meg a fertőzőképességet. A pGJ3-lacZ plazmiddal történő fertőzés értékelése a  $\beta$ -galaktozidáz enzimaktivitás kimutatását igényli. (A metodikák részletes ismertetése MSc diploma dolgozatomban olvasható "Lentivírus-konstrukciók a géntechnológiában és a kutatásban" címmel.) [Kanizsai 2012].

R5-típusú (CCR5 koreceptort használó), X4-típusú (CXCR4 koreceptort használó) és dual-tróp (CCR5/CXCR4 koreceptort használó) HIV pszeudovirionokat különböztethetünk meg [Nagy et al. 1994].

#### **4.1.4. Sejtvonalak HIV-1<sub>III</sub>B vírustörzsszel és HIV pszeudovirionokkal történő fertőzése**

A sejtek kiültetése 24 lyukú tenyésztő lemezen sejttípustól függően 50 000 - 80 000 sejt/lyuk, 1 ml végtérfogatú tápfolyadékban; illetve 96 lyukú lemezen 30 000 - 50 000 sejt/lyuk, 125  $\mu$ l végtérfogatú tápfolyadékban történt. A kiültetett limfociták száma volt a magasabb érték, míg a nagyobb méretű monolayer sejtek kisebb számban kerültek a tenyésztőtálcára. A sejtszám a sejtenyészeti passzázs számától is függött. Az alacsonyabb passzázs számúaknál magasabb volt a kiültetett kezdő sejtszám érték a lassabb szaporodási ciklus miatt [ATTC 2010]. Tápfolyadék összetétele is sejttípus

függő volt (lásd 4.1.3. fejezet). 24 óra elteltével a sejtsűrűség elérte a 70-80%-ot lyukanként. Tápfolyadék eltávolítása, majd 24 lyukú tenyésztőtálcánál 150 µl, 96 lyukú tenyésztőtálcánál 25 µl friss tápfolyadékkal kiegészített térfogatra számolva megtörtént a sejtek HIV-1<sub>III<sub>B</sub></sub> vírus törzssel, vagy a fertőzendő sejtvonal koreceptoraink releváns ligandumokat hordozó HIV pszeudovirionokkal való fertőzése (5-10-20 µl). Korábban nagyobb mennyiséggel is próbálkoztunk, de a kísérletek értékelésénél az eredmények könnyen interpretálhatóak a kisebb mennyiséggel is. Kísérleteinkben teszteltük a sejtvonalak koreceptoraira nem releváns ligandumokat hordozó HIV pszeudovirionokat is. 20 µg/ml DEAE-dextrán mediálta vírus infekció 2 órás 37 °C-os inkubálása után 24 lyukú tenyésztőtálcánál 1 ml, 96 lyukú tenyésztőtálcánál 125 µl végtérfogatra egészítettük ki a lyukakat. 48 óra további inkubáció következett.

A politolált oligonukleotidok alkalmazása fél órával a vírusinfekciót megelőzően, vagy a fertőzéssel egyidőben, illetve más kísérletekben a fertőzést követő 30 perc múlva történt, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7,5, 10, 20 és 40 µg/ml mennyiségben [Kanizsai et al. 2012, Kanizsai et al. 2014].

## **4.2. Politolált oligonukleotidok antiretrovirális hatásának vizsgálata**

Politolált oligonukleotidok HIV-1<sub>III<sub>B</sub></sub> és HIV pszeudovirionok korai replikációs folyamatainak gátlását vizsgáltuk. A kísérleteink során alkalmazott kvantitatív, sejt-vírus alapú biológiai módszerek, mint a Szincícium indukciós és inhibíciós assay, a Kvantitatív p24 antigén assay, a MAGI assay (multinuclear activation of galactosidase inhibition) és a kvantitatív Luciferáz assay segítségével történtek. A vegyületek citotoxicitásának mérése a XTT assay szolgált.

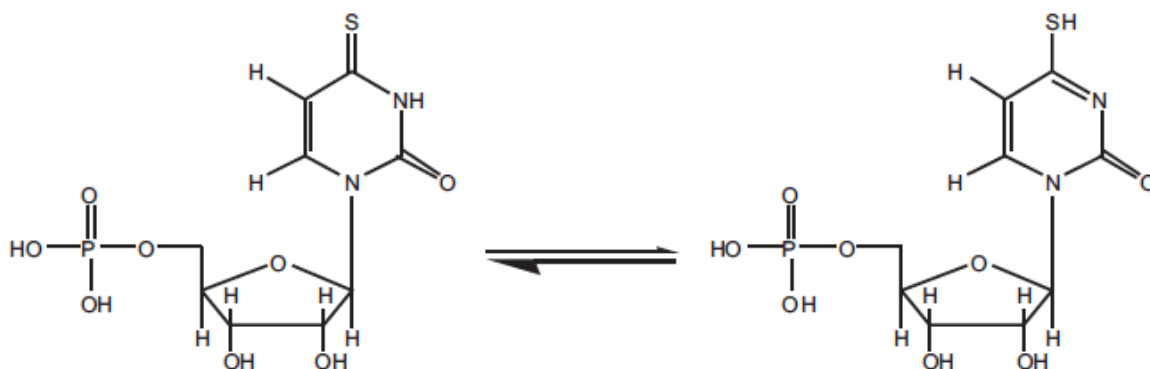
### **4.2.1. A kísérleteinkben alkalmazott tiolált pirimidin vegyületek, mint HIV entry inhibitorok**

Tiolált pirimidin oligonukleotidok klinikai HIV izolátumok, valamint replikáció inkompetens HIV pszeudovirionok korai replikációs ciklusaira kifejett, antiretrovirális

hatását tanulmányoztuk kísérleteinkben. A kiinduló vegyület egy 35-tagú 4-tiodezoxiuridilátból álló dezoxioligonukleotid ( $(s^4dU)_{35}$ ) volt. A 4-tio-uridilát (UD29 fantázia nevű) vegyület a citidin 5'-monofoszfát  $H_2S$  kezelésével lett előállítva [Horváth et al. 2005]. Az alapvegyület további kémiai módosításával, lánchossz változtatásával kapott újabb hat tiolált oligonukleotid (UD29-new, UD30, UD30-new, UD31, MOD-94 és MOD-2012 néven jelölt) HIV fertőzést gátló hatását, valamint citotoxicitását is vizsgáltuk. UD29-new (4-thio-uradilicacid), Mw: 385; UD30: módosított UD29, Mw:~390; UD31: módosított UD29, Mw:~395; MOD-94 specifikusan tiol csoportokhoz kapcsolódik, Mw:~1000; MOD-2012 tiol-csoportokat oxidáló tulajdonságú dimer.

A liofilizált vegyületek tápfolyadékban, illetve PBS-ben (phosphate-buffered saline - foszfát-pufferes sóoldat) oldódnak, tárolásuk  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -on történik. Felhasználás előtt a kívánt koncentrációra hígíthatóak. A 4-tio-dezoxiuridilát tautomer átalakulásokon mehet keresztül, ezáltal a létrejött tiol forma diszulfid-kötéseket alakíthat ki más, -SH csoportokat tartalmazó molekulákkal, például ciszteint tartalmazó fejtérjéssel (16. ábra) [Beck et al. 2009].

A tiolált oligonukleotidokat Dr. Aradi János (Debreceni Egyetem) bocsájtotta rendelkezésünkre.



16. ábra. 4-tio-uridilát keto- és enol-tautomerjei [Beck et al. 2009]

### **4.3. HIV-1<sub>IIIB</sub> és HIV pszeudovirion infektivitási vizsgálatok**

#### **4.3.1. Szincícium indukciós és inhibíciós assay**

Biológiailag aktív HIV-1<sub>IIIB</sub> és HIV pszeudovirionok szincícium formáló képességét vizsgáltuk H9 és MT-2 humán T-sejt vonalakon. A sejtek fenntartásához RPMI-1640 tápfolyadékot használtunk, 0,1% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS hozzáadásával és 2 mM L-glutaminnal kiegészítve (Sigma-Aldrich). Mindkét sejttípusnál  $8 \times 10^4$  sejtet ültettünk ki 1ml tápfolyadékban, 24 lyukú tenyésztő tálcára, majd 24 ótás inkubációt követően 5, 10 és 20  $\mu$ l vírusszuszpenziót adtunk a sejtekhez. A 20  $\mu$ g/ml DEAE-dextrán mediálta vírus infekció után 48 óra inkubáció következett. Kontrollként fertőzetlen sejteket használtunk.

A poliolált oligonukleotidok szincícium inhibíciós hatásának vizsgálata a vegyület különböző koncentrációinak (0,5, 1, 2, 3, 5, 7,5, 10, 20 és 40  $\mu$ g/ml) alkalmazása után történt. A vírusinfekciót megelőzően 30 perccel, a vírussal történt fertőzéssel egyidőben, illetve azt követő 30 perc múlva adtuk kísérleteinkben a vegyületeket a sejtekhez. Kontrollként fertőzött, de nem kezelt, valamint fertőzés nélküli kezeltlen sejteket használtunk. A fertőzést követő 48 óra 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> inkubálása után a szincíciumok száma információval szolgált. A sejteket 100x nagyítással, inverz mikroszkóp segítségével vizsgáltuk (Motic AE31) [Kanizsai et al. 2012, Kanizsai et al. 2014].

#### **4.3.2. Kvantitatív p24 antigén assay**

A HIV p24 antigén kvantitatív meghatározása a lentivirális infekció diagnosztikus lépésének egyik alapmódszere. A VIDAS<sup>®</sup> HIV p24 antigén teszt egy módosított ELISA technológia, amely a szendvics módszert egy végső fluorescens detektálással kombinálja. A tesztcsík első mélyedéseibe 200  $\mu$ l minta került bemérésre. A tesztcsíkot ezután a készülékbe helyeztük, ezt követően a minta további feldolgozása, analízise automata módszerrel történt. A mintában jelenlevő p24 antigén a tesztcsík szilárd fázis tartályának belsejét bevonó anti-p24 monoklonális (egér) ellenanyagokhoz

kötődik, ezt a biotinnal jelölt anti-humán immunglobulinok ismerik fel. A le nem kötődött komponensek a mosás során eltávolítódnak. A kialakult komplex jelölése alkalikus foszfatázzal konjugált streptavidinnel történik. Újabb mosás után a végső kimutatási lépés során a készülék a szubsztrátot (4-metil-umbelliferil-foszfat) a mintára juttatja. A konjugátum-enzim ennek a szubsztrátnak fluoreszkáló terméké (4metil-umbilliferon) történő hidrolízisét katalizálja (2. táblázat).

2. táblázat. A p24 tesztcsík tartalmának leírása

Mélyedés	Reagensek
1	Minta mélyedés
2	Konjugátum: biotinnal jelölt anti-p24 ellenanyag (nyúl) + TRIS puffer (100 mmol/l, pH 7,4) + Triton X 100 (2%) + fehérje- és kémiai stabilizálók + 0,2 g/l gentamicin-szulfát + 0,9 g/l nátrium-azid (300 µl)
3-4-5-7-8-9	Mosó oldat: TRIS puffer (200 mmol/l, pH 7,8) + Tween 20 + 0,9 g/l nátrium-azid (600 µl)
6	Nyomjelző: alkalikus foszfatázzal jelölt streptavidin + TRIS puffer (100 mmol/l, pH 7,4) + szarvasmarha albumin + Triton X 100 (0,25%) + fehérje- és kémiai stabilizálók + 0,2 g/l gentamicin-szulfát + 0,9 g/l nátrium-azid (400 µl)
10	Szubsztrátot tartalmazó leolvasó küvetta: 4-metil-umbelliferil-foszfat (0,6 mmol/l) + dietanolamin (DEA) (0,62 mol/l vagy 6,6% pH9,2) + 1 g/l nátrium-azid (300 µl)

A csík mélyedéseit vonalkóddal ellátott fóliazár fedi. A mélyedések a vizsgálathoz szükséges reagenseket tartalmazzák.

A fluoreszcencia intenzitása arányos a mintában levő p24 antigén koncentrációjával, mérése 450 nanométeren történik. A vizsgálat végén a készülék a memóriájában tárolt kalibrációs görbe alapján automatikusan kiszámítja, majd kinyomtatja az eredményeket (VIDAS<sup>®</sup> HIV p24 II (p24), BioMérieux).

HIV szeropozitív egyének immunreakciója során jelentős mennyiségű p24 antigén specifikus antitest képződik. A p24 teszt az alacsony érzékenységű módszerek közé tartozik, mivel a HIV fertőzöttek szérumában a p24 antigén antitestekhez kapcsolódva lehet jelen és a teszt az antigén-antitest komplexek kimutatására nem képes. Komplex disszociációs technikákkal is alacsony a hatékonyság [Ly et al. 2007]. Kísérletünkben a vizsgálatnak ezekkel a hátrányaival nem kellett számolnunk.

HIV-1<sub>IIIB</sub> p24 protein jelenlétét H9 és MT-2 sejtek felülúszóiból mutattuk ki. H9 és MT2 sejtek fenntartására és szaporítására RPMI-1640 tápfolyadékot használtunk, 0,1% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS hozzáadásával, valamint 2 mM L-glutaminnal kiegészítve (Sigma-Aldrich).

Mindkét sejttypusnál  $8 \times 10^4$  sejtet ültettünk ki 24 lyukú lemezre, 24 óra elteltével politiolált oligonukleotidokat adtunk a sejtekhez a kísérletnek megfelelően a

vírusfertőzést 30 perccel megelőzően, vagy a vírusfertőzéssel egyidőben, illetve a vírusfertőzést követően 30 perc múlva, különböző koncentrációban (0,5, 1, 2, 3, 5, 7,5, 10, 20 és 40 µg/ml). A fertőzéskor 5, 10 és 20 µl HIV-1<sub>IIIB</sub> vírusszuszpenziót alkalmaztunk. A 20 µg/ml DEAE-dextrán mediálta vírus infekció után 48 óra inkubáció következett. Kontrollként fertőzött és nem kezelt, valamint fertőzés nélküli kezeltlen sejteket használtunk. A p24 antigén mennyiségét kvantitatív módon mérhettük a HIV-1 p24 core antigén ELISA segítségével, a vizsgálati protokoll szerint (MiniVIDAS<sup>®</sup>, BioMérieux, France) (17. ábra) [Kanizsai et al. 2012]. A kapott eredményeket a gép kinyomtatja. A Szincícium indukciós és inhibíciós vizsgálatokhoz alkalmazott sejtenyészetek felülúszóiból is elvégeztük a p24 antigén assayt.



17. ábra. HIV p24 antigén ELISA kvantitatív kimutatásra használt készülék (MiniVIDAS<sup>®</sup>, BioMérieux, France)

#### 4.3.3. Riporter gének kvantitatív mérése

A  $\beta$ -galaktozidáz enzim génjét, mint riporter gént hordozó HeLaCD4-LTR- $\beta$ gal fertőzést követően a gén aktivitásának mérése a MAGI assay segítségével valósulhat meg. A luciferáz, az eGFP, vagy a  $\beta$ -galaktozidáz enzim génjének, mint riporter géneknek expresszációja kvantitatívan értékelhető. A luciferáz aktivitás relatív fluoreszcenciát mérve, luminométerrel történhet. (Victor 3 Multilabel plate reader, Perkin Elmer) Az eGFP a fertőződött sejtekben zölden fluoreszkál az UV hatására. A transzfekciót követő 24 és 48 óra múlva vizsgálhatjuk a fluoreszkáló sejtek jelenlétét, arányát.

#### 4.3.3.1. $\beta$ -galaktozidáz enzimaktivitás indukciós és gátlási vizsgálata sejttenyészetben - MAGI assay

A protokoll alapján vírust titrálhatunk HeLaCD4-LTR- $\beta$ gal sejteken. A vírusfertőzött sejtek és szincíciumok magja kékre festődik, kvantitatív módon vizsgálható inverz mikroszkóp segítségével. A HIV Tat proteinje által a transzfektált HeLaCD4-LTR- $\beta$ gal sejtek  $\beta$ -galaktozidáz enzimet kódoló génje aktiválódik, az 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal) hatására a sejtek magja kék színű lesz. A MAGI assay egy érzékeny, végpont titráló módszer, amely alkalmas egyaránt HIV-1 és HIV-2 izolátumok vizsgálatára.

A vírusfertőzés előtt 24 órával  $5 \times 10^4$  HeLaCD4-LTR- $\beta$ gal sejtet ültettünk ki 24 lyukú tenyésztő tálcára. DMEM tápfolyadékot használtunk, 10% FCS, 0,1% Penicillin/Streptomycin, 0,1 mg/ml G418, 0,05 mg/ml hygromycin B-vel kiegészítve (Sigma-Aldrich). A fertőzés előtt a sejtek 70%-os folytonosságot mutatnak lyukanként.

A sejtek fertőzése előtt eltávolítottuk a tápfolyadékot, majd friss tápfolyadékkal 150  $\mu$ l térfogatra kiegészítve, 5-10-20  $\mu$ l vírust adtunk a sejtekhez (multiplicity of infection - moi.: 0,2; 0,4). A vírussal fertőzött sejtekhez lyukanként 20  $\mu$ g/ml DEAE-dextrán adunk a fertőzés hatékonyságának növelésére.

A vírust a fertőzött sejtekkel ilyen módon 2 órán át, 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> koncentrációban inkubáltuk, közben negyed óránként kissé megdöntögettük a lemezeket a fertőzés hatékonyságának növelése végett. Az adszorpciós időt követően 1 ml végtérfogatra kiegészítve, friss tápfolyadékot adtunk a sejtekhez. A víruszuszpenziót nem távolítottuk el. Ezt követően 48 óra 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> koncentrációban további inkubálás következett. Az inkubációs idő letelte után a tápfolyadékot eltávolítottuk, majd 1 ml fixáló oldattal inkubáltuk a sejteket 5 percig, szoba hőmérsékleten a megfelelő  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás elérése érdekében. A fixáló oldat 1% formaldehidet, 0,2% glutáraldehidet tartalmaz PBS-ben (phosphate-buffered saline - foszfát-pufferes sóoldatban) oldva. A fixáló oldat elárolítása után a sejteket kétszer PBS-sel mostuk, majd "staining solution" (festő oldat) került rá 50 percig. Az oldat 10 ml-re 200  $\mu$ l 0,2 M K-ferrocianidet, 200  $\mu$ l 0,2 M K-ferricianátot, 10  $\mu$ l 0,2 M Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-ot és 100  $\mu$ l oldott X-gal-t tartalmaz, 9500  $\mu$ l PBS-ben oldva. Az X-gal-t 40 mg/ml DMSO-ban oldottuk. A festéket kétszeri PBS-ben történő mosással eltávolítottuk. A festés után inverz



mikroszkóppal vizsgálhattuk a kékre szineződött sejteket. A festődés az 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal) hatására lesz kék színű [Nagy et al. 1994, W6].

A politiolált oligonukleotidok elemzése során kísérlettől függően a sejtek vírussal történt fertőzése előtt, vagy egy időben, illetve 30 perccel utána különböző koncentrációban (0,5, 1, 2, 3, 5, 7,5, 10, 20 és 40  $\mu$ g/ml) adtuk a vegyületeket a sejtekhez. Kontrollként fertőzés és kezelés nélküli sejteket, valamint fertőzött, kezelés nélküli sejteket alkalmaztunk.

A százalékos fertőzöttséget a kékre festődött sejtek kvantitatív értékéből kaptuk.  $IC_{50}$  és  $IC_{90}$  értékeket a Hill analízis szerint számoltuk ki. A további biostatistikai analízisek a Student féle t-próba szerint értékeltük [Kanizsai et al. 2012, Kanizsai et al. 2014].

A MAGI assay-hoz más sejtvonalat is használhattunk, ahol a HIV-1<sub>III</sub>B infektivitást és a fertőzés gátlását vizsgálhattuk. P4-CCR5 sejtvonalnál DMEM, 10% FCS, 0,1% Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich) tartalmú tápfolyadékot használtunk a MAGI assay-hoz előírt tápfolyadék összetétel helyett, ugyanis ezek a sejtvonalak nagyfokú érzékenységet mutatnak a MAGI assay-ban használt G418 és hygromycin B-vel szemben.

#### 4.3.3.2. Kvantitatív Luciferáz assay

A Luciferáz assay egy nagy érzékenységgű, gyors, kemiluminescenciás mérési módszer. A luciferin oxidációs folyamatai során képződött kémiai energiából, elektron átmenettel oxiluciferint képez. A luciferáz a luciferin oxidációs folyamatait katalizálja ATP-Mg<sup>2+</sup> ko-szubsztrát segítségével. Az enzim és szubsztrátja találkozásakor felvillanó fény keletkezik. A relatív fluoreszcencia értékek alapján elemezhetjük a kísérleteink kvantitatív eredményeit.

A Luciferáz assay-hoz a kísérletet 96 lyukú tenyésztő tálcán készítettük elő. A mérési eredmények értékelése luminométer segítségével történt (Victor3, Perkin Elmer). A kiültetett sejtek mennyisége  $3 \times 10^4$  sejt/lyuk. A kísérlethez a 3T3.T4.CCR5 és 3T3.T4.CXCR4 sejtvonalak mellett a P4-CCR5 sejtvonalat használtuk. A sejtvonalak

fenntartásához a Luciferáz assay során a tápfolyadék DMEM volt, 10% FCS, 0,1% Penicillin/Streptomycin-el kiegészítve (Sigma-Aldrich).

24 órával a sejtek kiültetését követően, a tápfolyadékot eltávolítottuk, majd friss tápfolyadékkal 25 µl térfogatra kiegészítve 5-10-20 µl HIV pszeudoviriont adtunk a sejtekhez. A felsorolt sejtvonalak mindegyikén alkalmaztuk az R5-tróp M-ad, a Dual-tróp HXB2/M-ad és X4-tróp HXB2 típusú pszeudovirionokkal történő fertőzést. A Luciferáz assay-hez használt pszeudovirionok riportergénként a luciferáz enzim génjét hordozzák. HIV-1<sub>III</sub>B vírus ennél a kísérletnél nem alkalmazható, mivel nincs reporter gén, ezért nem tudunk relatív fluoreszcenciát mérni. A fertőzött sejtekhez lyukanként 20 µg/ml DEAE-dextránt adunk a fertőzés hatékonyságának növelésére.

A fertőzött sejteket ilyen módon 2 órán át, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> inkubáltuk, közben negyed óránként kissé megdöntöttük a lemezeket a fertőzés hatékonyságának növelése végett. Az adszorpciós időt követően 125 µl végtérfogatra kiegészítve, friss tápfolyadékot adtunk a sejtekhez, a vírusszuszpenziót nem távolítottuk el. Ezt követően 48 óra 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> inkubálás következett. Az inkubációs idő letelte után a tápfolyadékot eltávolítottuk.

A politiolált oligonukleotidok vizsgálata során a sejtek vírussal történt fertőzése előtt 30 perccel, vagy a vírusfertőzéssel egyidőben, illetve 30 perccel a fertőzést követően 0,5 - 40 µg/ml koncentrációban adtuk a vegyületeket a sejtekhez. Kontrollként politiolált oligonukleotidok nélküli, különböző hígításokban alkalmazott pszeudovirionokat használtunk.

48 órával a sejtek kezelését és fertőzését követően a 96 lyukú tenyésztőtálca mélyedéseiből eltávolítottuk a tápfolyadékot, majd a sejteket PBS-el mostuk. Ezt követően a sejtekre 170 µl/lyuk lízis puffert mértünk, majd 30 percig inkubáltuk. A homogén lizátum kialakulását pipettázással segítettük elő.

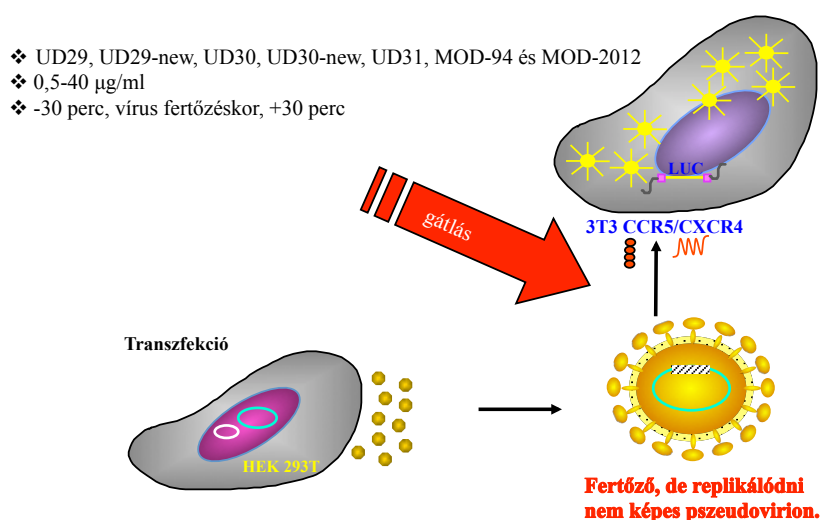
A Luciferáz assay-hoz 96 lyukú OptiPlate-96-ot (Perkin Elmer) használtunk. A lemez speciális anyagkivitele elősegíti az vizsgálat érzékenységének optimális működését. A 96 lyukú tenyésztő tálcánkról lyukanként átmérünk a lizátumból 50-50 µl mennyiséget. Mérési kontrollként 50 µl politiolált oligonukleotidokkal nem kezelt, pszeudovirionokkal nem fertőzött sejtlyizátumot használtunk.

A mérés előtt 50 µl assay puffert mérünk a lyukakba, majd a lemezt a luminométerbe helyezzük. A készülék (Victor3, Perkin Elmer) 100 µl luciferázferin

oldatot cseppent a mélyedésekbe az RLU (relative luminescence unit) mérésekor a protokoll szerint (18. ábra) (3.táblázat). A készülék az eredményeket exel táblázatban rögzíti.

A mérés elve:

- luciferázferin + ATP → luciferázferyladenyilat + PP<sub>i</sub>
- luciferázferyladenyilat + O<sub>2</sub> → oxyluciferázferin + AMP + fény



### 18. ábra. Politiolált oligonukleotidok antivirális hatásának vizsgálata

HEK293T sejteket transzfektáltunk HIV *gag-pol* és riporter géneket tartalmazó, valamint *env* gént hordozó plazmidokkal. A virionok összeépülésük után megjelentek a felülúszóban. Ezek a pszeudovirionok fertőzőképesek, de gendelációk miatt replikálódni nem tudnak. Riporter génként a luciferáz enzim génjét hordozó pszeudovirionokat használtuk a Luciferáz assay-hoz. A releváns koreceptorral rendelkező sejtvonalak fertőzése előtt, különböző koncentrációban politiolált oligonukleotidokkal kezeltük, majd R5-, Dual- és X4-tróp pszeudovirionokkal fertőztük a sejteket. A sejtekbe bejutott pszeudovirionok mennyisége luminométer segítségével kvantitatív módon mérhetővé vált.

### 3. táblázat. Protokoll beállítása a luminométeren.

Protocol name	HIV
Protocol number	N/A
Name of the plate type	Generic 8x12 size plate
Number of repeats	1
Delay between repeats	0 s
Measurement height	Default
Protocol notes	-
Injector	1
Speed	3
Volume	100 µL
Increment	0 µL

Replicate	1
Injection mode	aspVol=syringeVol
Repeated operation	Yes
Delay duration	0.2 s
Repeated operation	Yes
Kinetic repeats	3
Kinetic delay	0.1 s
Name of the label	mikrobiologia2
Label technology	Luminometry
Emission filter name	No filter
Emission filter slot	A7
Measurement time	1.0 s
Emission aperture	Large

#### 4.3.3.2.1. A Luciferáz assay-hez felhasznált oldatok

##### Lízis puffer

1000 µl 1 M Tris/1 M MES ( $c_{\text{end}} = 100 \text{ mM}$ )

10 µl 1 M DTT ( $c_{\text{end}} = 1 \text{ mM}$ )

100 µl 20% TritonX 100 ( $c_{\text{end}} = 0.2\%$ )

Desztillált vízben oldva, végtérfogat 10 ml, pH 7,8. Tárolása -20 °C-on.

##### Assay puffer

1250 µl 1M Tris / 1M MES ( $c_{\text{end}} = 125 \text{ mM}$ )

250 µl 1 M Mg<sub>2</sub>OAc ( $c_{\text{end}} = 25 \text{ mM}$ )

500 µl 100 mM ATP ( $c_{\text{end}} = 5 \text{ mM}$ ) (ATP-dinátriumsó MW: 551.1 g/mol desztillált vízben feloldva -20 °C-on tárolható)

Desztillált vízben oldva, végtérfogat 10 ml, pH 7,8. Tárolása -20 °C-on.

##### 1 M Tris/MES

1 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (MW: 121.14 g/mol)

1 M MES-Monohydrate (MW: 213.25 g/mol)

Desztillált vízben oldva, végtérfogat 10 ml, pH 7,8. Tárolása -20 °C-on.

##### 0.1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> törzsoldat

91,5 ml 0,2 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,348g/10 ml)

8,5 ml 0,2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,272g/10 ml)

Desztillált vízben oldva, végtérfogat 200 ml, pH 7,8. A munkaoldat 5 mM-os, 1:20 kell hígítani a törzsoldatot.

#### 25mM luciferázferin törzsoldat

Az 5 mg luciferázferint 625  $\mu\text{l}$  5 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  oldatban oldjuk fel. A vizsgálathoz a törzsoldatot 1:100 hígítjuk 5 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  oldatban.

#### **4.4. Citotoxicitás mérése XTT assay segítségével**

Az XTT *in vitro* Toxicology Assay Kit (Sigma-Aldrich) alkalmazásával képet kaphatunk az egyes politolált oligonukleotid vegyületek különböző koncentrációinak citotoxikus hatásáról. A vizsgálat során, a teszt segítségével az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáz aktivitását mérhetjük spektrofotométerrel. P4-CCR5, HeLaCD4-LTR- $\beta$ gal, MT-2, H9 sejt vonalakon vizsgáltuk a vegyületeink citotoxikus hatását HIV-1<sub>III<sub>B</sub></sub> vírussal, illetve M-ad, HXB2/M-ad, illetve HXB2 típusú HIV pszeudovirionokkal fertőzött (5-10-20  $\mu\text{l}$ ) és fertőzetlen sejteken. Kontrollként politolált oligonukleotid kezelés nélküli, fertőzött és fertőzetlen sejteket használtunk.

Az XTT assay-hez 96 lyukú tenyésztő tálcára  $3-5 \times 10^4$  sejtet ültettünk ki lyukanként. 24 óra elteltével a tápfolyadék eltávolítása után, 30 perccel a fertőzést megelőzően politolált oligonukleotidok különböző koncentrációval kezeltük a sejteket. A térfogat 25  $\mu\text{l}$  volt, a sejteknek megfelelő, friss tápfolyadékkal kiegészítve (H9 és MT-2 sejtelnél RPMI-1640, 2 mM L-glutamin, 10%FCS, 0,1% Pen/Str; P4-CCR5 és HeLaCD4-LTR- $\beta$ gal esetén DMEM, 10%FCS, 0,1% Pen/Str). A kezelést követő 30 perc múlva a sejteket HIV-1<sub>III<sub>B</sub></sub> vírus (moi: 0,2; 0,4) vagy HIV pszeudovirion különböző koncentrációival (5-10-20  $\mu\text{l}$ ) fertőztük. A fertőzött sejtekhez lyukanként 20  $\mu\text{g/ml}$  DEAE-dextrán adunk a fertőzés hatékonyságának növelésére. 37 °C-on, 5%  $\text{CO}_2$  koncentrációban, 2 óra inkubációs idő elteltével 125  $\mu\text{l}$  végtérfogatra kiegészítve tápfolyadékot adtunk a sejtekhez. Az eredmény leolvasása 24 óra és 48 óra múlva történt, addig a sejteket 37 °C-on, 5%  $\text{CO}_2$  koncentrációban inkubáltuk. A leolvasás előtt a tápfolyadékot eltávolítottuk, majd 100  $\mu\text{l}$  PBS-t és 20% XTT reagenst adtunk a

sejtekhez. 2,5 óra inkubáció után spektrofotométer segítségével az abszorbancia mérése 450 és 690 nanométeren történt. Az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáza redukálja az XTT reagens tetrazolium gyűrűjét (2,3-bis/2-Methoxy-4-nitro5-sulphophenyl/-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide inner salt), sárga színreakció kíséretében egy formazán származék alakul ki.

$IC_{50}$  és  $IC_{90}$  a Hill analízis szerint számoltuk ki. A további biostatistikai analíziseket a Student féle t-próba szerint értékeltük [Kanizsai et al. 2012, Kanizsai et al. 2014].

#### **4.5. Antiretrovirális rezisztencia terápia-naïve magyarországi HIV-1 izolátumokban**

Munkánk során a HIV-1 *pol* és *pr* génben olyan mutációkat kerestünk, amelyek kapcsolatba hozhatók az antiretrovirális terápia rezisztenciával terápia-naïve HIV fertőzöttekben. A vizsgált minták magyarországi páciensektől származnak, akik fertőzésüket afrikai, ázsiai és más európai országbeli partnereiktől kapták.

##### **4.5.1. Fertőzöttek szérumból mintái**

Az antiretrovirális rezisztencia egy rendkívül jelentős faktor, ami meghatározza a terápia kimenetelét a HIV fertőzöttekben.

56 tünetmentes HIV-1 fertőzött egyén mintáit vizsgáltuk. A HIV-1 teljes genotipizálását olyan páciensek mintáin végeztük, akik fertőzésüket külföldi partnereiktől kaphatták. A partnerek afrikai (60,5%), ázsiai (3,5%) és valamely európai (36%) országból származtak. A páciensek szűrése először ELISA módszerrel és egyéb immunkémiai módszerrel (Uniform HIV-1 Ag/Ab, Vidas HIV-1 Ag/Ab, Capillus Trinity HIV1/2) történt. A pozitív eredmények konfirmálása Western blot segítségével valósult meg (HIV-1 Diagnostic Biotechnology). A mintavétel utáni analízishez EDTA-s vér lett feldolgozva. A szeropozitív páciensek plazmájában 14.300-1.630.000 HIV kópia/ml volt. Meghatározása a Roche Amplicor HIV-1 Monitor Assay segítségével

történt. A plazmák tárolása -80 °C.

200 µl koncentrálatlan plazmából a virális RNS Qiaamp viral RNA Mini Kit (Quiagen Inc.) segítségével lett kivonva. 17 µl RNS extraktum került a reverz transzkriptáz-PCR készülékbe (ABI 9700 termocycler) RNáz inhibitor, Taq polimeráz, szekvencia specifikus primerek, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, magnézium dithiotreitol és puffer hozzáadásával. A szekvencia specifikus primerek segítségével amplifikáltuk a proteáz és reverz transzkriptáz enzimeket kódoló szekvenciákat. A reverz transzkriptáz reakció első lépése 90 °C-on 2 percig zajlott, amit 50 °C, 5 perc inkubáció követett. A reverz transzkriptáz enzim a folyamathoz adását követően, 55 perc inkubációs idő után 94 °C-on 2 percig folytattuk a reakciót. A következő lépések eredménye a cDNS amplifikáció. A tisztítatlan termékekből 5 µl-t használtunk a szekvenáló reakciókhoz a CLIP Sequencing, ABI 9700 termocycler segítségével 30 cikluson át, amit 70 °C-on történő terminális extenzió követett. Az alkalmazott Cy5-jelölt primerek a proteáz és reverz transzkriptáz szekvenciákra voltak specifikusak. Elongációs terminátorként ddATP-t, ddCTP-t, ddGTP-t és ddTTP-t használtunk.

A CLIP (cross-linking and immunoprecipitation) szekvencia termékek vizsgálata 6%-os poliakrilamid-urea-Tris-borate-EDTA gél elektroforézist követően (MicroCel™, Long-Reader Tower) 50 percig, 2 000 V-on való futtatás után UV fény segítségével történt.

#### **4.5.1.1. Trugene HIV-1 Genotyping Kit alkalmazása**

A jelenleg forgalomban és terápiás használatban levő antiretrovirális szerek támadáspontjai a virális fehérjék, amik a vírus nyílt leolvasási fragmentumaiban kódoltak. Ezekben a szekvenciákban bekövetkezett mutációk drogrezisztenciát eredményeznek a vírusokban.

A Trugene HIV-1 Genotyping Kit egy zárt rendszerben, félautomata technika szerint működik. A célgén amplifikációja mellett, DNS szekvenálást végez, valamint a HIV-1 proteáz (kodon 4-99) és reverz transzkriptáz (kodon 38-248) enzimeket kódoló gének szekvenciáit a szoftver segítségével (OpenGene DNA Sequencing System), elemzi. A plazma vírus tartalmából ( $\geq 1000$  kópia) kivont virális RNS-ből a rendszer

reverz transzkriptáz PCR segítségével amplifikálja a cDNS-t. A szekvencia analízis módosított Sanger technikán alapul [Sanger et al. 1977]. A poliakrilamid gél elektroforézist az adatok félautomata elemzése követi, amiből az eredmények interpretálhatók.

A genom RT és PR kódoló régióinak analízise a Trugene HIV-1 Genotyping Kit és OpenGene DNA Sequencing System (Siemens) alkalmazásával történt. A módszer naprakész adatokkal lát el a minták elemzése után az adott páciens HIV-1 vírusának antiretrovirális terápiával szemben fennálló rezisztenciával. Az antiretrovirális rezisztencia okai azokban a nyílt leolvasási keretekben történt mutációk, amelyek a terápiás célpontú fehérjéket kódolják [Kanizsai et al. 2010].

#### 4.5.1.2. Szekvencia elemzés

OpenGene DNA Sequencing System a kapott szekvencia adatokat valós időben értékeli. A szekvenciák nukleinsav összetételei a szoftver adatbázisában levő génszakaszok ismeretében adják az eredményeket. A szoftver felismeri a virális genotípus mellett a mutációkat, valamint a polimorfizmus jelenlétét a mintáinkban. Referencia szekvenciákat tartalmaz a "B" típusú HIV-1 (HIV-1<sub>LAI</sub>) és a gyakran előforduló, antiretrovirális drogrezisztens mutások fragmentumaiból.

A génszakaszok kapcsolódása után a kijelzett elektroferogram mintázat lehetőséget teremt az értékelésre. Mivel a szoftver egyaránt tartalmaz vad típusú és mutáns referencia szekvencia adatokat, így minimálisra csökken a félreértékelés esélye. Automatikusan felismeri a helytelen bázispárosodást a mintánk és a referencia adatok között. Az algoritmikus szoftver segítségével a klinikai jelentőséggel bíró HIV mutációkat ismerhetjük fel a proteáz és reverz transzkriptáz enzimeket kódoló régiókban. Meghatározhatóvá válik az adott mintában levő vírustörzsek specifikus antiretrovirális drogokkal szembeni rezisztenciája. A validált algoritmus folyamatos szoftverfrissítés segítségével naprakész összehasonlító adatokkal biztosítja a vizsgálat eredményességét.



#### **4.5.1.3. HIV-1 szubtípus meghatározás**

A TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit megmutatja, hogy melyik kulcsfontosságú ismert és közölt génmutációkkal hozható hasonlósági kapcsolatba a mintában levő genotípus vagy mutáció szekvencia.

OpenGene DNA Sequencing System olyan szekvenáló technológiát alkalmaz, amely segítségével meghatározható a genotípus és az ismert mutáció.

Az izolátumok szubtipizálása a Stanford HIV Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu>) referencia szekvenciákkal való összehasonlítással történt.

## 5. Eredmények

"After climbing a great hill,  
one only finds that there are many more hills to climb."  
- Nelson Mandela

### 5.1. HIV pszeudovirionok

#### 5.1.1. Plazmid vektorok detektálása

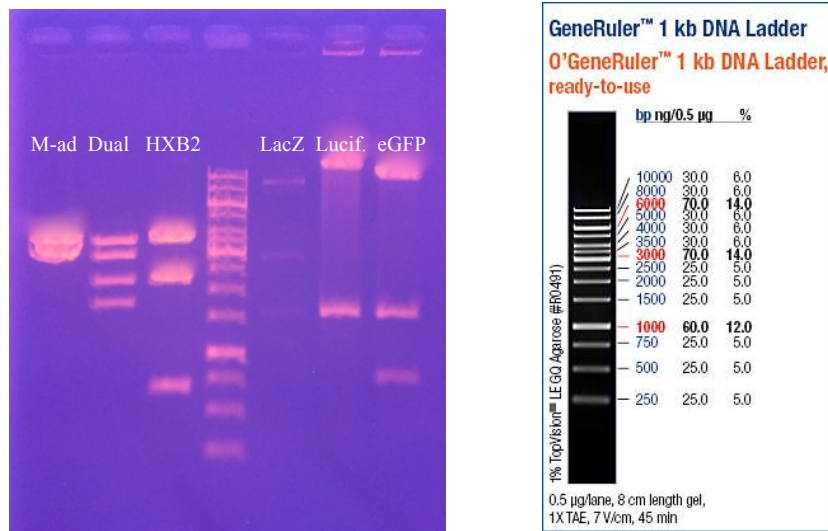
A kompetens *DHα E.coli* baktérium sejtekben felszaporított plazmid vektorokat a protokoll szerint Qiagen Plasmid Midi Kit segítségével izoláltuk.

A plazmidok gélelektroforézis elemzéséhez az emésztés BamHI és EcoRI restriktációs enzimekkel történt. 4 μL plazmid-DNS (50 ng/μl), 3 μL Tango Buffer, 0,5 μL EcoRI (10 u/mikroliter), 0,5 μL BamHI 10 (u/mikrolliter) (Fermentas), 22 μL DEPC-H<sub>2</sub>O (diethyl-pyrocabonate-H<sub>2</sub>O), 30 μL végtérfogatban lett összemérve. 2,5 óráig 37 °C-on történt inkubálás után az enzimeket 80°C-on, 20 perc behatási idővel inaktiváltuk. Az emésztett plazmidokat 0,7% agaróz gélben 1 kb léptékű markert használva (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) (Sigma-Aldrich) vizsgáltuk. A marker 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bp-os fragmentumokat tartalmaz (19. ábra) (4. táblázat).

4. táblázat. Hatféle plazmidtípus felszaporítása után a táblázatban szereplő burokfehérjét kódoló géneket, valamint három féle riporter gént hordozó plazmiddal rendelkezünk.

Envelope / Burok fehérje	<i>gag-pol</i> + riporter gének
M-ad	pGJ3 - Luciferáz
HXB2	pGJ3 - eGFP
HXB2/M-ad	pGJ3 - LacZ

CCR5 koreceptort igénylő M-ad, CXCR4 koreceptor specifikus HXB2 és dual-tróp HXB2/M-ad burokfehérjét kódoló géneket hordozó plazmid típusokat figyelhetünk meg az első oszlopban. A második oszlop a luciferáz, eGFP (zöld fluorescens protein) és β-galaktozidáz aktivitásért felelős géneket hordozó plazmidokat mutatja.



19. ábra. A plazmid izolálás gélelektroforetikus vizsgálata

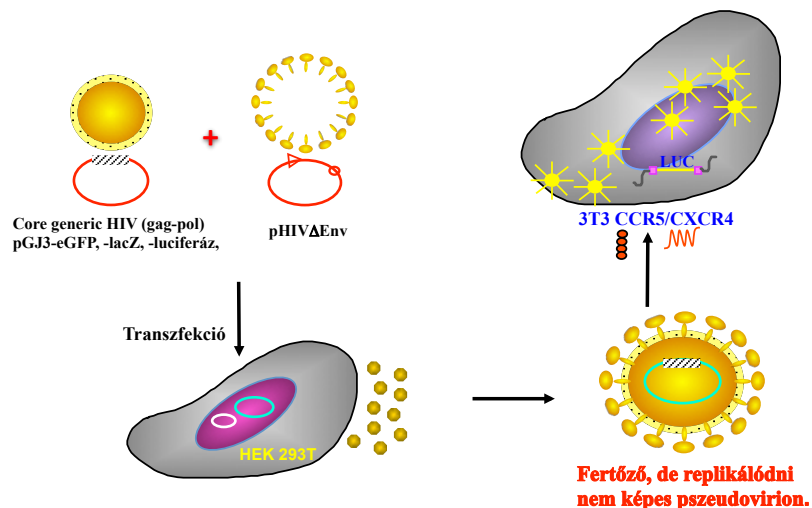
Az **M-ad plazmid** (R5-tróp burok): EcoRI + BamHI emésztés után a jel 3100 bp, 3700 bp. A **p2envHXB2/M-ad plazmid** (dual-tróp burok): EcoRI + BamHI emésztés után a jel 1700 bp, 2300 bp, 3100 bp, 3600 bp. **HXB2 plazmid** (X4-tróp burok): jel EcoRI + BamHI emésztés után 677 bp, 2278 bp, 3726 bp. A **pGJ3-lacZ plazmid** (core +  $\beta$ -galaktozidáz gén): a jel EcoRI + BamHI emésztés után kb. 9000bp, kb. 3000bp. **pGJ3-luciferáz plazmid** (core + luciferáz gén): EcoRI + BamHI emésztés után a jel 1640 bp, 10530 bp. A **pGJ3-eGFP plazmid** (core + eGFP gén): EcoRI + BamHI emésztés után a jel 820 bp, 1610 bp, 10100 bp.

### 5.1.2. HIV pszeudovirionok előállítás és kimutatása

A HEK293 sejt adenovírus eredetű promoterral transzfektált, aneuploid sejtvonalat ad, melynek a tumorsejtekhez hasonlóan a fenotípusos megjelenési formája erősen eltér az eredeti sejtektől. A HEK293T sejtvonal a HEK293 sejtekbe stabilan integrálódott SV40 polyomavírus eredetű DNS-el is transzfektált formája [Gillet et al. 2011]. A sejtvonalba integrált, virális szekvenciák segíthetik a plazmid vektorok expresszáldását, ezáltal a HIV pszeudovirionok összeépülését. Kísérleteink során a HEK293T sejteket transzfektáltuk az általunk felszaporított plazmidokkal. A kívánt HIV pszeudovirion típus létrehozásakor a transzfekcióhoz valamely típusú burok proteint kódoló, valamint *gag-pol* és riporter géneket hordozó plazmid párokat választottuk ki (4. táblázat). A HEK293T sejtek a lentivirális géneket hordozó plazmid párokkal, így a burokfehérje géneket hordozó és a core + riporter géneket tartalmazó plazmidokkal való transzfekciót követően a plazmid DNS-ek sejtekbe integrálódása után 2-3 órával megkezdődött a HIV pszeudovirionok összeépülése és megjelenése a

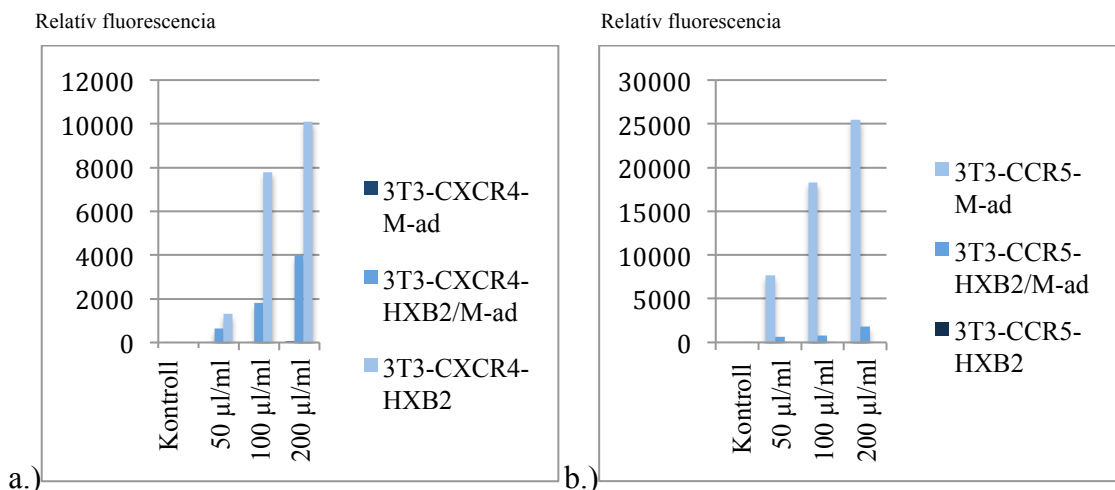
sejtvonal felülűszójában. A létrejött HIV pszeudovirionokból funkcionális génszakaszok hiányoznak, a *gag-pol* gének és a riporter gén van csak LTR régiók közt, *env* gén nincs, ezért replikációra nem lesznek képesek. Hasonlóan a génterápiában alkalmazott lentivírus vektorokhoz, itt is egy riporter gén került a fertőzött sejtvonalakba. A géntermékek megfelelően választhatjuk ki a kimutatási módszert.

A HEK293T sejtek felülűszójában jelen vannak a HIV pszeudovirionok. Releváns koreceptort hordozó sejtvonalak HIV pszeudovirionnal történt fertőzése után az integrálódott és expresszáldott pszeudovírus mennyiségének kvantitatív meghatározására a luciferáz aktivitás mérésénél luminométert, eGFP esetén UV mikroszkópot, alkalmazhattuk (20. ábra, 21. ábra, 22. ábra, 24. ábra). A  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás mérésére a MAGI assay-t lehet használni (23. ábra).



20.ábra. A pszeudovirionok fertőzőképességének kvantitatív meghatározása

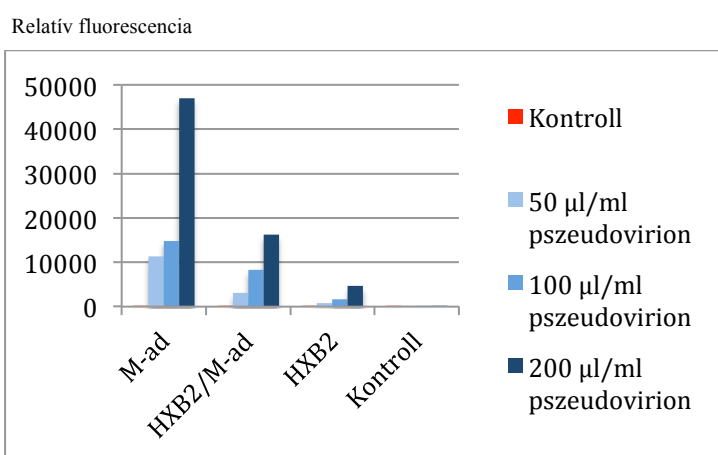
A mérési módszerek közül a leghatékonyabbnak a Luciferáz assay bizonyult. 3T3-CCR5, CCR5 koreceptort kifejező, valamint 3T3-CXCR4, CXCR4 koreceptort kifejező transzfektált egér fibroblaszt sejtet ültettünk ki 96 lyukú tenyésztőtálcára. A fertőzés luciferáz enzim génjét hordozó HIV pszeudovirionokkal történt. A 21. ábrán jól megfigyelhető a különböző tropizmussal rendelkező HIV pszeudovirionok arányosan megjelenő infektivitási mértéke a fertőzés után 48 órával történt méréskor. Míg a CCR5 koreceptort hordozó sejtekbe az M-ad típusú, R5-tróp pszeudovirionok jutottak be legnagyobb számban, addig a CXCR4 koreceptort hordozó sejtekbe a HXB2 típusú, X4-tróp pszeudovirionok (21. ábra).



21. ábra. Luciferáz assay - HEK293T felülúszójából összegyűjtött HIV pszeudovirionok infektivitási mértéke

HIV pszeudovirionok infektivitási mértéke releváns koreceptorokat hordozó sejtvonalak fertőzését követő 48 óra múlva. A CCR5 koreceptorot hordozó sejtekbe az M-ad típusú, R5-tróp pszeudovirionok jutottak be legnagyobb számban, a CXCR4 koreceptorot hordozó sejtekbe a HXB2 típusú, X4-tróp pszeudovirionok. Sejtvonalak: 3T3-CXCR4 (a) és 3T3-CCR5 (b).

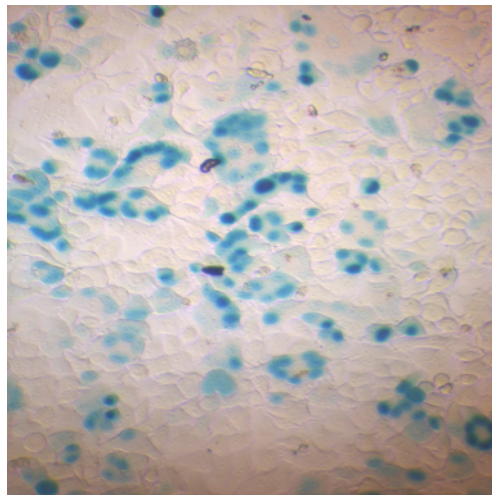
Magasabb relatív fluoreszcencia értéket kaptunk a P4-CCR5 humán eredetű transzfektált sejtvonalon. P4-CCR5, CCR5 koreceptorot kifejező, humán fibroblaszt sejtet ültettünk ki 96 lyukú tenyésztőtálcára. A fertőzés szintén a luciferáz enzim génjét, mint riporter gént hordozó HIV pszeudovirionnal történt. Az ábrán jól megfigyelhető a különböző tropizmussal rendelkező HIV pszeudovirionok infektivitási mértéke a fertőzés után, 48 óra múlva történt méréskor (22. ábra).



22. ábra. Luciferáz assay eredménye

HIV pszeudovirionok infektivitási mértéke a fertőzést követő 48 óra múlva. A P4-CCR5 sejtek CCR5 koreceptorot hordozó sejtek, melyekbe az M-ad típusú, R5-tróp pszeudovirionok jutottak be legnagyobb számban. Sejtvonal: P4-CCR5.

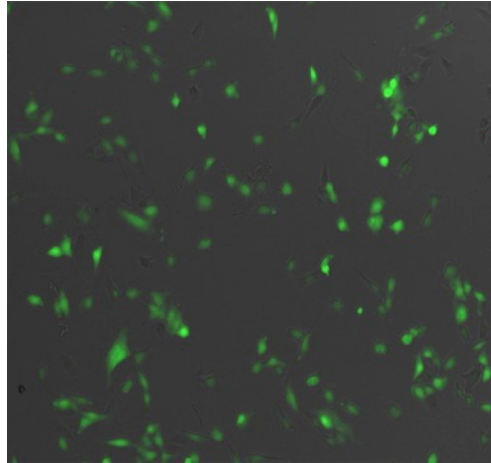
A kimutatási módszerek közül sokszor próbáltuk a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitással rendelkező HIV pszeudovirionjainkkal a MAGI assay-t, de sajnos nem kaptunk értékelhető eredményeket. A HIV pszeudovirionok replikációra nem képesek. Számos funkcionális gén hiányzik belőlük, így a Tat, a transz-aktivitásért felelős gén is. A MAGI assay során alkalmazott HeLaCD4-LTR- $\beta$ -gal sejtek aktiválása nem történik meg. Klinikai izolátumokkal folytatott kísérletekkel viszont megfelelő eredményeket kaptunk. A HIV-1<sub>III<sub>B</sub></sub> Tat a HeLaCD4-LTR- $\beta$ -gal sejtekbe transzfektált retrovirális LTR-hez kötődve aktiválja a szomszédos  $\beta$ -galaktozidázt kódoló gént, a sejtek magja kék színű lesz a hozzáadott 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal) hatására (23. ábra).



23. ábra. MAGI assay eredménye.

A klinikai HIV-1<sub>III<sub>B</sub></sub> izolátumokkal fertőzött HeLaCD4-LTR- $\beta$ -gal sejtekben a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás mérésére a MAGI assay-t alkalmaztuk. A fertőzött sejtek kék színűek lettek. Könnyen megszámolható, így kvantitatív módon értékelhetőek az eredmények.

Riporter géneként eGFP-t tartalmazó, HIV pszeudovirionnal történt fertőzés után az integrálódott és expresszáldott pszeudovírus mennyiségének kvantitatív meghatározására, az eGFP aktivitás mérésére UV mikroszkópot alkalmaztunk. A fertőzött sejtek zöld színűek lettek (24. ábra).



24. ábra. Az eGFP aktivitás mérése.

Az UV mikroszkóp alatt a fertőzött sejtek zöld fluoreszcenciát mutattak. Számolható, így kvantitatív módon értékelhetőek az eredmények.

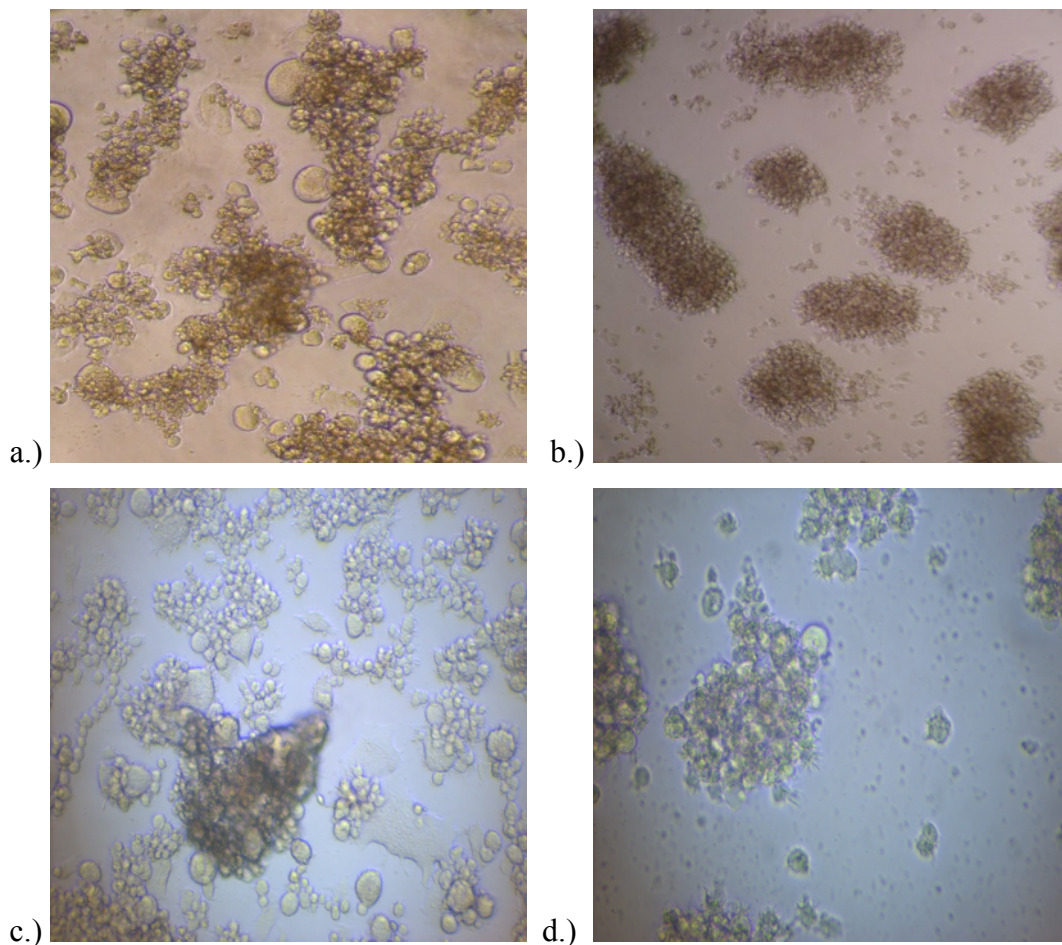
## 5.2. A kísérleteinkben alkalmazott tiolált pirimidin vegyületek antiretrovirális hatása

Kísérleteink során nemcsak klinikai HIV-1<sub>III B</sub> izolátumokat alkalmaztunk különböző koncentrációban, hanem R5-tróp, X4-tróp és dual-tróp pszeudovirionokkal is fertőztük a sejteket. A fertőzést megelőzően 30 perccel, vagy a fertőzéssel egyidőben, illetve a fertőzést követően a sejteket különböző koncentrációban politiolált oligonukleidokkal kezeltük, amely vegyületek antiretrovirális hatását vizsgáltuk. A legmegfelelőbb eredményeket a fertőzést 30 perccel megelőző kezelések adták. Ezek a vegyületek a sejtek HIV-1<sub>III B</sub> és a HIV pszeudovirionokkal történő fertőzését a bejutáshoz szükséges redox lépések gátlásával befolyásolják, mintegy "*entry inhibitor*"-ok [Beck et al. 2009; Horváth et al. 2006]. Célunk a vegyületek antiretrovirális aktivitásnak, gátlószer koncentrációjától függő vizsgálata volt.

### 5.2.1. Szincícium inhibíciós assay és kvantitatív p24 antigén assay vizsgálat eredménye MT-2 és H9 sejteken

HIV-1<sub>III B</sub> és HIV őszeudovirionok által fertőzött H9 és MT-2 humán T-sejt vonalakon politiolált oligonukleotid vegyületek különböző koncentrációnak szincícium

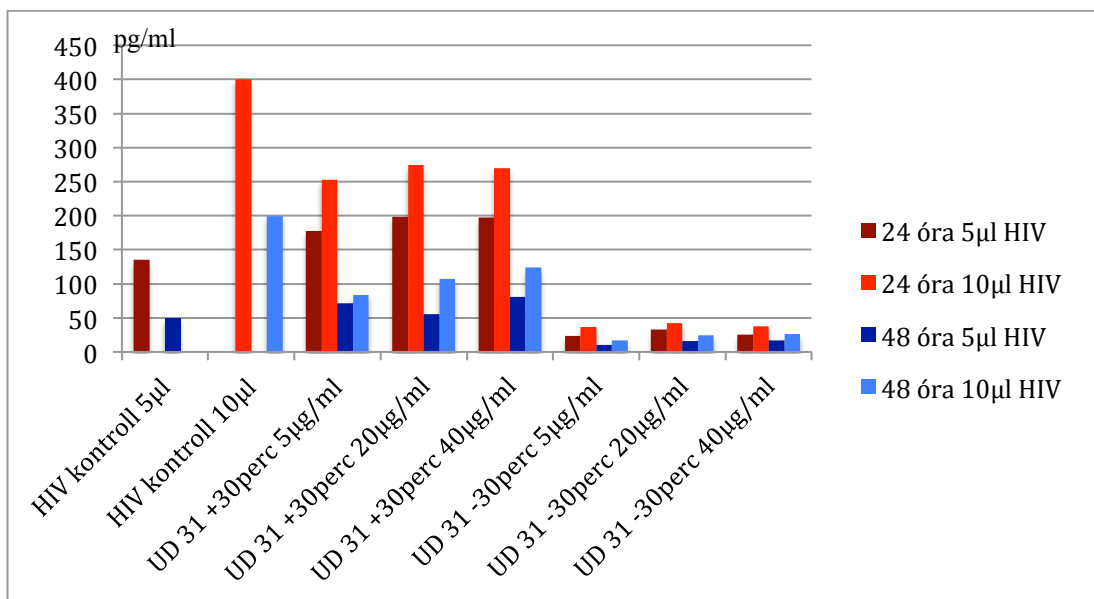
kialakulást gátló hatását vizsgáltuk. A legjobb eredményeket a fertőzés előtt 30 perccel adott vegyületek hatásánál figyelhettük meg. Kontrollként fertőzött, kezelés nélküli és fertőzetlen, inhibitorral nem kezelt sejteket használtunk. A HIV-1<sub>III<sub>B</sub></sub> fertőzött sejtek felülúszóiból a HIV p24 antigén mennyiségét kvantitatív módon mérhettük a HIV-1 p24 antigén ELISA segítségével (MiniVIDAS<sup>®</sup>, BioMérieux, France) (25. ábra, 26. ábra) [Kanizsai et al. 2012, Kanizsai et al. 2014].



25.ábra. Szincícium inhibíciós assay MT-2 és H9 sejteken.

- a.) HIV-1<sub>III<sub>B</sub></sub> fertőzést követően az MT-2 sejteken jelentős szincícium képződés figyelhető meg.  
 b.) A képen 30 perccel HIV-1<sub>III<sub>B</sub></sub> vírusfertőzést megelőzően 5 µg/ml UD29 politolált oligonukleotiddal való kezelés hatására az MT-2 sejteken a szincíciumok kialakulásának gátlása jelentős volt.  
 c.) HIV-1<sub>III<sub>B</sub></sub> fertőzést követően az H9 sejteken jelentős szincícium képződés figyelhető meg.  
 d.) A képen 30 perccel HIV-1<sub>III<sub>B</sub></sub> vírusfertőzést megelőzően 5 µg/ml UD29 politolált oligonukleotiddal való kezelés hatására a H9 sejteken a szincíciumok kialakulásának gátlása jelentős volt.





26. ábra. A p24 antigén assay eredménye

A sejtek felülúszóiból a HIV p24 antigén mennyiségét kvantitatív módon értékelhettük a HIV-1 p24 antigén ELISA segítségével (MiniVIDAS<sup>®</sup>, BioMérieux, France). A vegyületek antiretrovirális hatása jobb eredményeket mutatott, amikor a sejteket a fertőzés előtt 30 perccel kezeltük a politiolált vegyületekkel. Az ábra az UD31 elnevezésű anyag hatását mutatja. Jelentős gátló hatás már 5 µg/ml mennyiségnél megfigyelhető.

### 5.2.2. $\beta$ -galaktozidáz enzimaktivitás vizsgálata sejtenyészeten - a MAGI assay eredményei

Standard sejt alapú metodika, a MAGI assay segítségével a politiolált oligonukleotidjaink HIV-1<sub>III<sub>B</sub></sub> antivirális aktivitását vizsgáltuk HeLaCD4-LTR- $\beta$ gal, P4-CCR5 sejtvonalakon. Fertőzés előtt a sejteket UD29 jelű politiolált oligonukleotiddal, valamint abból kifejlesztett származékokkal kezeltük (0,5-40 µg/ml). Az említett sejtvonalak közül a legmegfelelőbbnek a HeLaCD4-LTR- $\beta$ gal sejtvonal bizonyult. Ennek a sejtalapú metodikának a segítségével jól megfigyelhetővé vált a virális fertőzés vegyületeink általi inhibíciója. 40-48 órával a vírusinfekciót követően a fertőzött sejtek magjai a hozzáadott 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal) hatására kék színűek lettek. A kékre festődött sejtek százalékos értéke jelzi a HIV fertőzött sejtek titerét. A  $\beta$ -galaktozidáz enzim aktivitás kvantitatívan mérhető volt (27. ábra). A gátlási IC<sub>50</sub> és IC<sub>90</sub> értékeket a Hill analízis alapján számítottuk ki. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a legjobb hatásfokúnak a MAGI assay alapján is,

hasonlóan a szincícium inhibíciós metodikák eredményéhez a fertőzés előtt 30 perccel adott politiolált oligonukleotidok bizonyultak. A gátlási  $IC_{50}$  és  $IC_{90}$  értékeket a Hill analízis alapján számoltuk ki. Az eredmények dóziszfüggőek voltak (5. táblázat, 6. táblázat) [Kanizsai et al. 2012].

5. táblázat. UD29 politiolált oligonukleotid antivirális aktivitása

	$IC_{50}^a$	$TC_{50}^b$	TI <sup>c</sup>
Sejt fúzió	11,7 $\mu\text{g/ml}$	>200	>17
Vírus infekció <sup>d</sup>	4,75 $\mu\text{g/ml}$	>200 >42	n/a

<sup>a</sup>50% HIV infekció gátlás

<sup>b</sup>50% sejtek életképessége

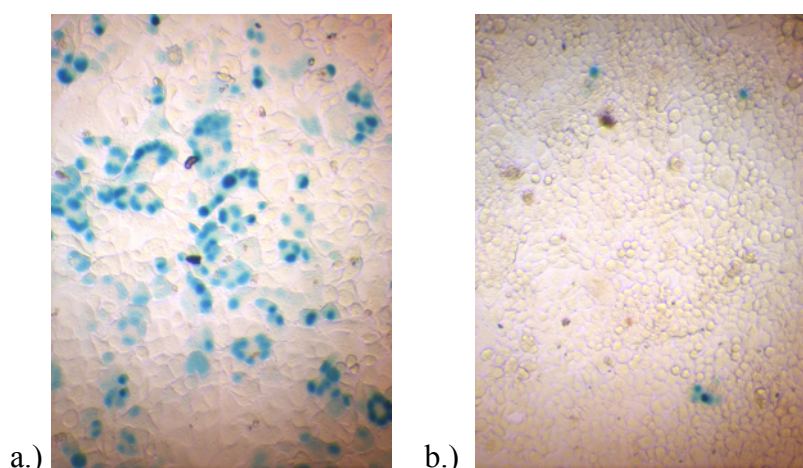
<sup>c</sup>*In vitro* terápiás index

<sup>d</sup>MAGI assay eredménye

6. táblázat. UD29 politiolált oligonukleotid antivirális aktivitása MAGI assay eredmények alapján

UD29 koncentráció $\mu\text{g/ml}$	% -os gátlás vírusfertőzéskor		
	-30 perc		+30 perc
1	2	2	<1
2,5	40	19	2
5	46	26	5
10	81	32	7
20	85	39	8
40	91	48	9
$IC_{50}$	4,75 $\mu\text{g/ml}$	>40 $\mu\text{g/ml}$	>40 $\mu\text{g/ml}$
$IC_{90}$	39,7 $\mu\text{g/ml}$	>40 $\mu\text{g/ml}$	>40 $\mu\text{g/ml}$

A sejteket 30 perccel a vírushatás előtt, másik kísérletnél a vírushatással egyidőben, illetve a vírushatást követően 30 perc múlva kezeltük az UD29 jelű politiolált oligonukleotiddal (1-40  $\mu\text{g/ml}$ ). A kékre festődött sejtek százalékos értéke jelzi a HIV fertőzött sejtek titerét. A  $\beta$ -galaktozidáz enzimaktivitás kvantitatívan mérhető volt. A gátlási értékeket -  $IC_{50}$ ,  $IC_{90}$  - a Hill analízis alapján számoltuk ki.



27. ábra. Multinuclear activation of galactosidase inhibition (MAGI) assay HeLaCD4-LTR- $\beta$ gal sejt vonalon.

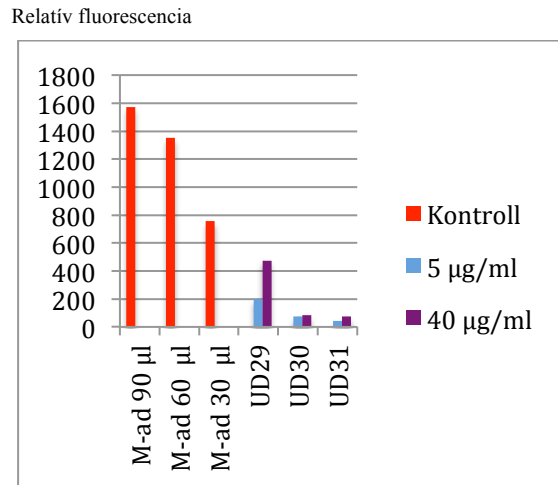
a.) HIV-1<sub>III B</sub> fertőzött sejtek HeLaCD4-LTR-βgal sejtvonalon. b.) HIV-1<sub>III B</sub> fertőzött sejtek hatása 48 óra múlva HeLaCD4-LTR-βgal sejtvonalon a fertőzést megelőző 30 perccel való 5 µg/ml UD29 politiolált oligonukleotiddal való kezelést követően.

H9 limfocita sejten végzett szincícium inhibíciós, infektivitási kísérletet követően 7000 rpm-on történő centrifugálás után a felülúszóval 96 lyukú tenyésztőtálcán, lyukanként 50 µl mennyiségben HeLaCD4-LTR-βgal (kiindulási sejtszám  $3 \times 10^4$ ) sejteket, valamint MT-2 sejteket (kiindulási sejtszám  $5 \times 10^4$ ) kezeltünk. A H9 sejtek felülúszói UD30-new politiolált oligonukleotidokkal kezelt (0,5-40 µg/ml), HIV-1<sub>III B</sub> (5, 10, 20 µl) fertőzött és fertőzés nélküli sejtekről származtak, valamint kezeletlen és fertőzetlen sejtek felülúszóit is használtuk. A HeLaCD4-LTR-βgal sejteken ezt követően MAGI assayt végeztünk, melynek eredményeként kékre festődött, tehát fertőzött sejteket nem találtunk a H9 sejtekről származó felülúszóval kezelt sejteken. Az MT-2 sejteken a szincícium inhibíciós assay megerősítette a MAGI assay eredményét. A kontrollként használt vad típusú HIV-1<sub>III B</sub> fertőzött sejtek azonban a fertőzési koncentrációval arányosan adták a pozitív eredményt, fertőzött kékre festődött sejteket, illetve a szincíciumokat láttunk. Ez is bizonyíthatja a politiolált oligonukleotidok -SH csoportokkal interferáló hatását.

### 5.2.3. Kvantitatív Luciferáz assay eredménye

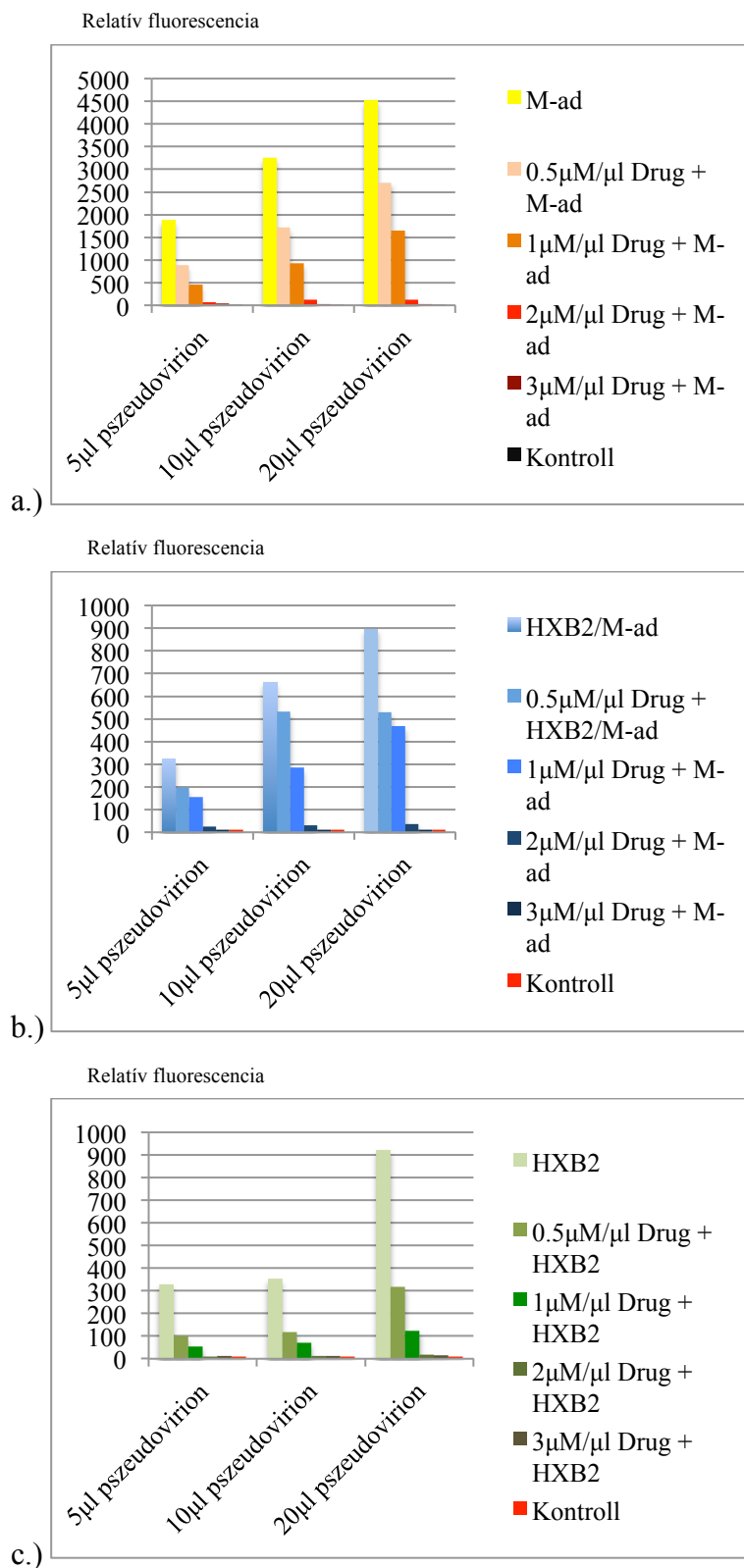
A Luciferáz assay-hez riporter génként a luciferáz enzim génjét hordozó HIV pszeudovirionokat használtunk (5-10-20 µl). R5-tróp M-ad, a Dual-tróp HXB2/M-ad és X4-tróp HXB2 típusú pszeudovirionok a releváns receptorokkal történt kapcsolódás után bejuthattak a gazdasejtbe. A fertőzött sejteket változó koncentrációban (0,5 - 40 µg/ml) politiolált oligonukleotidokkal kezeltük. A kísérlethez a 3T3.T4.CCR5 és 3T3.T4.CXCR4 sejtvonalak mellett a P4-CCR5 sejtvonalat használtuk, mivel ezek hordozták a HIV pszeudovirionok sejtbe jutásához szükséges specifikus koreceptorokat. Megfigyelhettük, hogy a politiolált oligonukleotidok a vírus sejtbe történő bejutását gátló hatása dóziszfüggő volt.

A luciferáz aktivitás vizsgálatokor kapott eredményeink igazolták a szincícium inhibíciós assay, valamint a MAGI assay eredményeit. A legjobb eredmények szintén az 5 µg/ml dózisonál jelentkeztek (28. ábra, 29. ábra).



28. ábra. UD29, UD30 és UD31 politolált oligonukleotidok HIV pszeudovirion ellenes hatásának vizsgálata

Politolált vegyület: 5 µg/ml, 40 µg/ml; Humán sejtvonat: P4-CCR5; Kiültetett sejtek száma:  $7 \times 10^4$  sejt/well - fertőzéskor 80%-os konfluens sejtenyészet; HIV pszeudovirion: HXB2/M-ad (20 µl pszeudovirionnal fertőztük).



29. ábra. Politiolált oligonukleotidok HIV pszeudovirion ellenes hatásának vizsgálata

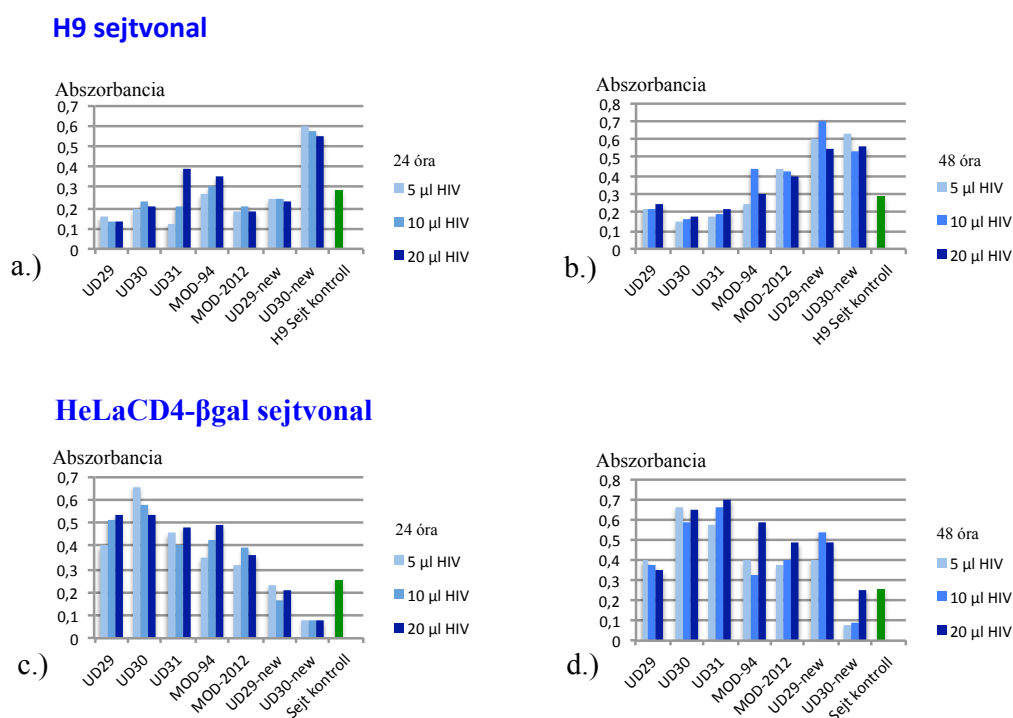
A legújabban kifejlesztett UD29 származék, az UD30-new eredményeit mutatják az ábrák. A gátló hatás már 2 µM/ml koncentrációban érvényesül. A grafikonokon ábrázolt kísérleti eredményeinket P4-CCR5 sejtvonalon ( $3 \times 10^4$  sejt/lyuk kiültetett sejtszám 96 lyukú tenyésztő lemezen) a.) R5-trop M-ad, b.) Dual-trop HXB2/M-ad és c.) X4-trop HXB2 HIV pszeudovirionokkal végeztük.

#### 5.2.4. XTT assay eredménye

A politolált oligonukleotidok HIV korai replikációs ciklusára ható gátlás vizsgálata mellett a vegyületek citotoxicitását is elemeztük. A kísérletekhez H9 és MT-2 humán T-limfocitákat, valamint HeLaCD4-LTR- $\beta$ gal és P4-CCR5 sejtvonalat alkalmaztunk. A kiültetett sejtszám  $3-5 \times 10^4$  sejt/lyuk volt 96-lyukú tenyésztőtálcán. A HIV *in vivo* klinikai fertőzések *in vitro* modellezésére a T-limfocita sejtvonalakat vettünk igénybe. A P4-CCR5 és HeLaCD4-LTR- $\beta$ gal sejtekkel monolayer kultúrákra gyakorolt hatást figyelhettük meg. A politolált oligonukleotidok citotoxicitását HIV-1<sub>III<sub>B</sub></sub>, valamint HIV pszeudovirionokkal fertőzött sejteken, valamint a sejtek fertőzése nélkül is vizsgáltuk. A sejteket 30 perccel a különböző koncentrációban történt antivirális hatású, politolált oligonukleotidokkal való kezelés után HIV-1<sub>III<sub>B</sub></sub>-vel (moi.: 0,2; 0,4), illetve M-ad, HXB2/M-ad, illetve HXB2 típusú pszeudovirionokkal fertőztük.

Az értékelést megelőzően a tápfolyadékot eltávolítottuk, majd 100  $\mu$ l PBS-t és 20% XTT reagenst (Sigma-Aldrich) adtunk a sejtekhez. 2,5 óra inkubáció után spektrofotométer segítségével a mitokondriális dehidrogenáz aktivitás mérése 450 és 690 nanométeren történt. Az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáza redukálja az XTT reagens tetrazolium gyűrűjét (2,3-bis/2-Mthoxy-4-nitro5-sulphophenyl/-2H-terazolium-5-carboxyanilide inner salt), sárga színreakció kíséretében egy formazán származék alakul ki. Az alacsonyabb mértékű eredmények csökkent sejtaktivitást mutatnak. A citotoxicitási vizsgálatokkal, az XTT assay során akut (24 órás) és krónikus (48 órás) citotoxicitási eredményeket elemeztünk. A hatásos dózisként megállapított, 5  $\mu$ g/ml koncentrációban az UD29, UD30, UD31 vegyületek fertőzött H9 sejtekre gyakorolt hatása mérsékelt toxicitást mutatott a kontroll sejtekhez képest a 24, illetve 48 órás mérési eredményekben. A további módosított változatok, mint az UD29-new és MOD2012 24 órás mérési eredményeiben 30%-os mitokondriális dehidrogenáz aktivitás csökkenést vettünk észre. MOD-94 24 órás mérési eredménye nem mutatott toxikus értéket.

A kémiaiailag módosított változatok esetében a fertőzött sejtvonalakon mért toxicitás mértéke vírus koncentráció- és dózisfüggő volt (30. ábra) (7. táblázat) [Kanizsai et al. 2012, Kanizsai et al. 2014].



30. ábra. HIV-1<sub>III B</sub> fertőzött H9 és HeLaCD4-βgal sejteken politiolált oligonukleotidok hatásának elemzése XTT assay segítségével

a.) és b.) A H9 sejteket 5-10-20 μl HIV-1<sub>III B</sub>-vel fertőztük a sejt vonal 5 μg/ml politiolált oligonukleotidokkal történt kezelését követően, 30 perc múlva.

c.) és d.) A HeLaCD4-βgal sejteket 5-10-20 μl HIV-1<sub>III B</sub>-vel fertőztük a sejt vonal 5 μg/ml politiolált oligonukleotidokkal történt kezelését követően, 30 perc múlva.

A 24 (a.,c.) és 48 (b.,d.) órás XTT assay mérési eredmények a sejtek életképességének változását mutatják.

7. táblázat. Politiolált oligonukleotidok HIV-1<sub>III B</sub> fertőzött és fertőzetlen H9 sejtekre gyakorolt citotoxikus hatása

Politiolált oligonukleotidok	Fertőzés nélküli H9 sejtek	HIV-1 <sub>III B</sub> fertőzött H9	IC <sub>50</sub> (μM) fertőzött sejteken	TC <sub>50</sub> (μM) fertőzött sejteken	TI
<b>UD29</b>	100	53	7.5	>200	>27
<b>UD30</b>	100	43	8.6	>100	>12
<b>UD31</b>	100	45	7.8	>100	>13
<b>UD29-new</b>	88	36	10.0	100	10
<b>MOD-94</b>	88	45	7.4	20	2,7
<b>MOD-2012</b>	88	35	4.12	7,8	1,9
<b>UD30-new</b>	100	92	1,87	>40	>22

-  $5 \times 10^4$  sejt/lyuk 96-lyukú tenyésztőtálcán, vol= 125 μl

- A politiolált oligonukleotid koncentrációk: 2,5;5;7,5;10;20;40 és 100 μM

- HIV-1<sub>III B</sub> (moi: 0,2). Fertőzés 30 perccel a politiolált oligonukleotidokkal való kezelést követően. A virális infektivitás mértéke a MAGI assay segítségével lett meghatározva.

- A citotoxicitás mérése 24 órával az infekció után az XTT Toxicology Assay Kit (Sigma-Aldrich) segítségével határoztuk meg.
- $IC_{50}$  = 50% koncentráció függő HIV fertőzés gátlás ( $\mu M$ )
- $TC_{50}$  50% csökken életképesség ( $\mu M$ )
- TI - *in vitro* terápiás index  $TC_{50}/IC_{50}$

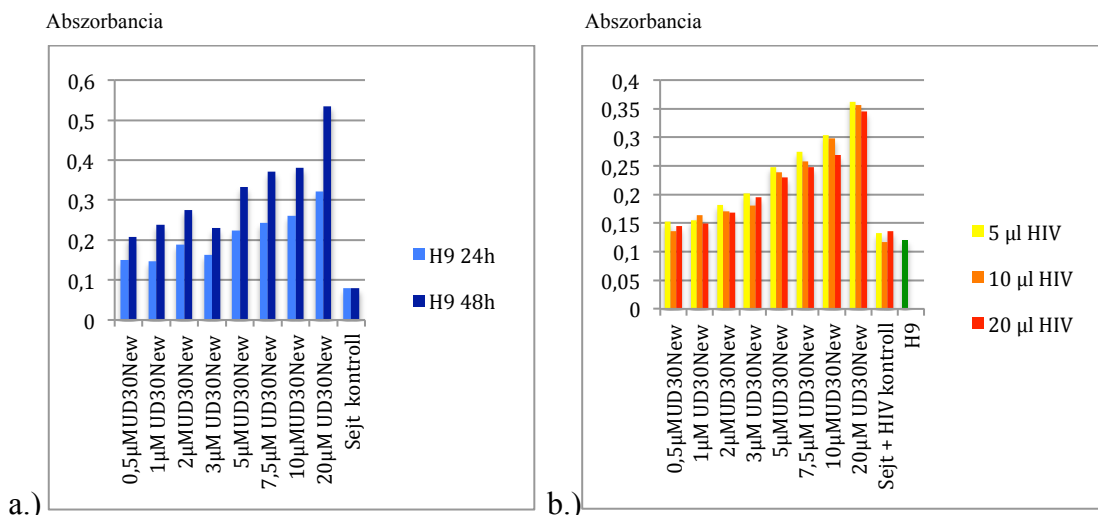
8. táblázat. Politiolált oligonukleotidok HIV-1<sub>IIIB</sub> fertőzött és fertőzetlen HeLaCD4-LTR- $\beta$ gal sejtekre gyakorolt citotoxikus hatása

Politiolált oligonukleotidok	HeLaCD4-LTR- $\beta$ gal sejtek		$IC_{50}$ ( $\mu M$ ) fertőzött sejt	$TC_{50}$ ( $\mu M$ )	TI
	Fertőzés nélküli	HIV-1 <sub>IIIB</sub> fertőzött			
<b>UD29</b>	100	55	12.2	>200	>27
<b>UD30</b>	90	54	14.8	>100	>12
<b>UD31</b>	88	77	14.2	>100	>13
<b>UD29-new</b>	80	50	15	150	10
<b>MOD-94</b>	85	95	12.7	45	3,5
<b>MOD-2012</b>	85	53	10.1	40	3,9
<b>UD30-new</b>	88	82	4,5	80	17

- $5 \times 10^4$  sejt/lyuk 96-lyukú tenyésztőtálcán, vol= 125  $\mu l$
- A politiolált oligonukleotid koncentrációk: 2,5;5;7,5;10;20;40 és 100  $\mu M$
- HIV-1<sub>IIIB</sub> (moi: 0,2). Fertőzés 30 perccel a politiolált oligonukleotidokkal való kezelést követően. A virális infektivitás mértéke a MAGI assay segítségével lett meghatározva.
- A citotoxicitás mérése 24 órával az infekció után az XTT Toxicology Assay Kit (Sigma-Aldrich) segítségével határoztuk meg.
- $IC_{50}$  = 50% koncentráció függő HIV fertőzés gátlás ( $\mu M$ )
- $TC_{50}$  50% csökken életképesség ( $\mu M$ )
- TI - *in vitro* terápiás index  $TC_{50}/IC_{50}$

A politiolált vegyületek kémiai úton történt továbbfejlesztésével létrehozott UD30-new vegyület jelentősen jobb hatásokkal bír, mint a korábban alkalmazott vegyületeink. Citotoxikus tulajdonság nem figyelhető meg a H9 sejteken, sőt inkább magasabb mitokondriális dehidrogenáz aktivitás mérhető az XTT assay segítségével, mint a H9 kontroll sejteken. A 24 és 48 órás mérésnél is a vírussal fertőzött sejteken az érték szintén magasabb a kontroll sejtekhez képest (30. ábra, 31. ábra).





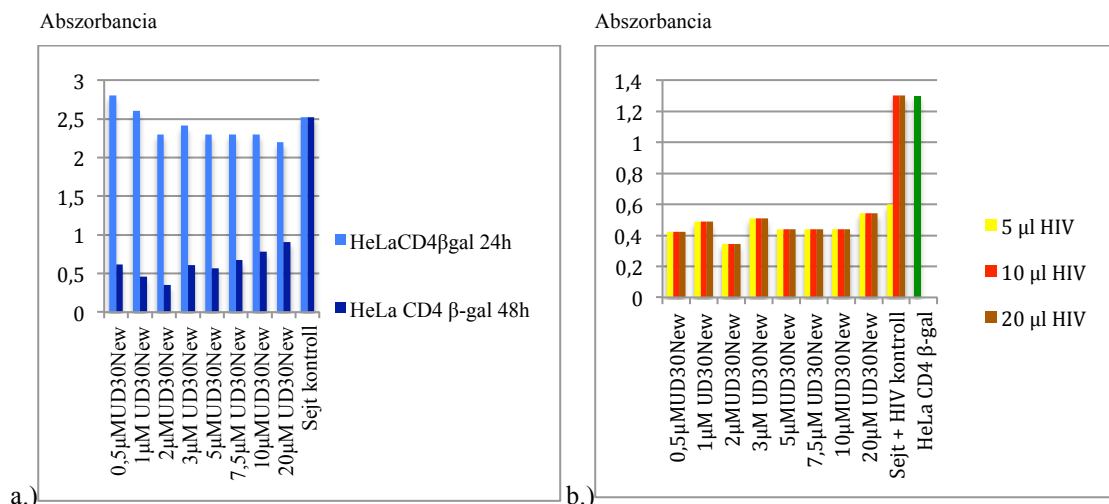
31. ábra. UD30-new politiolált oligonukleotid hatásának elemzése H9 sejteken az XTT assay segítségével

- a.) A fertőzés nélküli sejteket UD30-new különböző koncentrációival kezeltük. Citotoxikus hatás nem figyelhető meg a sejteken.  
 b.) A sejteket 5-10-20 µl HIV-1<sub>III</sub>B-vel fertőztük a sejt vonal UD30-new-val történt kezelését követő 30 perc múlva. Citotoxikus hatás 24 óra múlva történt méréskor nem figyelhető meg a sejteken.

HeLaCD4-LTR-βgal és P4-CCR5 monolayer fertőzött sejteken a citotoxicitási vizsgálatok eredménye szerint az UD29-new és UD30-new mutatott toxikus értékeket a 24 órás mérési eredményeken. 30 perccel a vegyületek variáns koncentrációival kezelt sejtek vírus fertőzését követően a H9 sejtekhez képest intenzívebben jelentkező citotoxicitás volt megfigyelhető.

A 48 órás vizsgálatokban a vegyületek fertőzés nélküli sejtekre gyakorolt hatásánál a fertőzött sejtekhez és a kontroll sejtekhez képest alacsonyabb viabilitást tapasztalhattunk. UD30-new vegyület a HeLaCD4-LTR-βgal sejteken a mitokondriális dehidrogenáz aktivitás 24 órás inkubációt követő mérésekor 1,87 µM feletti mennyiségnél mutatott citotoxikus hatást a kontroll sejtekhez képest.

A 24 és 48 órás inkubációt követő mérésnél is a HIV-1<sub>III</sub>B vírussal fertőzött sejteknél az értékek egyaránt alacsonyabbak a kontroll sejtekhez képest (8. táblázat) (30. ábra, 32. ábra).



32. ábra. HIV-1<sub>IIIB</sub> fertőzött HeLaCD4-LTR-βgal sejteken UD30-new politolált oligonukleotid hatásának elemzése XTT assay segítségével

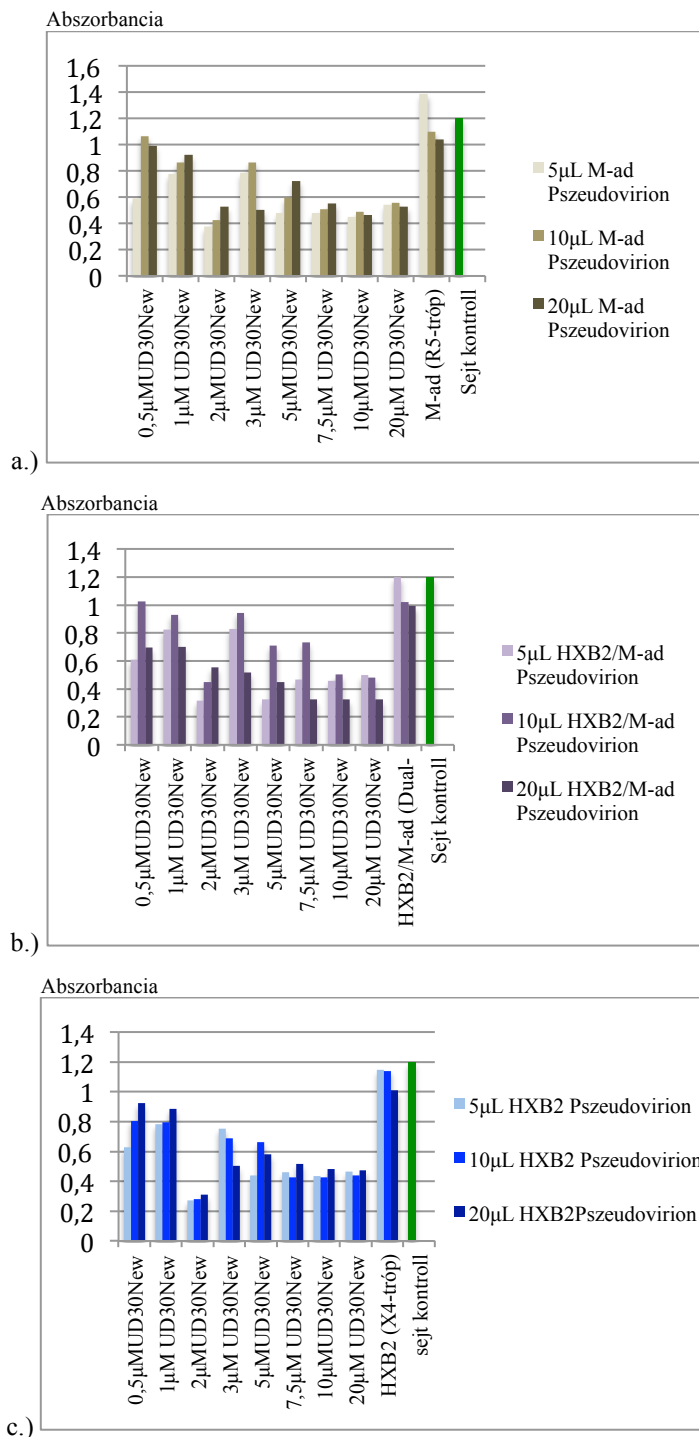
a.) A HeLaCD4-LTR-βgal sejteket UD30-new különböző koncentrációival kezeltük. Citotoxikus hatás 48 óra elteltével jelentkezik a HeLaCD4-LTR-βgal sejteken.

b.) A HeLaCD4-LTR-βgal sejteket 5-10-20 μl HIV-1<sub>IIIB</sub>-vel fertőztük a sejtvonal UD30-new-val történt kezelését követő 30 perc múlva. 24 óra múlva történt méréskor jelentősen lecsökkent a HeLaCD4-LTR-βgal sejteken mért mitokondriális dehidrogenáz aktivitás.

UD30-new kezelést követően R5-tróp M-ad, dual-tróp HXB2/M-ad és X4-tróp HIV pszeudovirionokkal (5-10-20 μl) végzett vizsgálatok eredményeiben a mitokondriális dehidrogenáz aktivitás a HIV-1<sub>IIIB</sub> vizsgálatokat jól reprezentáló értékeket mutatott mind a HeLaCD4-LTR-βgal, mind pedig a P4-CCR5 sejtvonalakon. A kapott eredmények tükrözték a különféle koreceptor preferenciával rendelkező pszeudovirionok infektivitási variabilitását. (33. ábra)

A toxicitási vizsgálatokban más eredményeket kaptunk a T-sejtvonalakon, mint a monolayer HeLaCD4-LTR-βgal és P4-CCR5 sejtvonalon. Ennek oka a sejtekben működő eltérő szignáltranszdukciós rendszerekkel magyarázható.

Megfigyeltük, hogy a sejtvonalakon a citotoxicitás mértéke dóziszfüggő volt, valamint a víruskoncentráció is befolyásolta alakulását. Amikor magasabb koncentrációban alkalmaztuk a politolált vegyületeket, a vírus mennyiségétől függetlenül a citotoxicitás mértékénél mérsékelt növekedés volt megfigyelhető.



33. ábra. HIV pszeudovirionokkal fertőzött HeLaCD4-LTR-βgal sejteken UD30-new politiolált oligonukleotid hatásának elemzése XTT assay segítségével

A HeLaCD4-LTR-βgal sejteket 5-10-20 μl HIV pszeudovirionnal fertőztük a sejtek UD30-new-val történt kezelését követő 30 perccel. Citotoxikus hatás mérése 24 és 48 órával a fertőzést követően történt. a.) UD30-new politiolált oligonukleotid hatásának elemzése M-ad típusú (R5-tróp) pszeudovirionnal történt fertőzés után 24 és 48 óra múlva. b.) UD30-new politiolált oligonukleotid hatásának elemzése HXB2/M-ad típusú (Dual-tróp) pszeudovirionnal történt fertőzés után 24 és 48 óra múlva. c.) UD30-new politiolált oligonukleotid hatásának elemzése HXB2 típusú (X4-tróp) pszeudovirionnal történt fertőzés után 24 és 48 óra múlva.

### 5.3. Magyarországi terápia-naïve HIV-1 izolátumok antiretrovirális rezisztencia vizsgálatai

HIV szubtypusok genetikai rezisztenciája molekuláris virológiai módszerekkel meghatározható. A korai replikációs ciklus vizsgálatainál a receptor-ligandum kapcsolódás politolált oligonukleotidokkal történt gátlásának vizsgálata mellett a kemokin receptorok genetikai polimorfizmusának prevalenciáját is tanulmányoztuk.

A CCR5- $\Delta$ 32, a CCR2-64I, valamint az SDF1-3'A mutáns allél előfordulása nagymértékben befolyásolja a HIV korai replikációs folyamatainak alakulását. Korábbi kutatásunk során hat Északkelet-Magyarország területén levő településből származó, oláh cigány lakosságtól 560 szérumminta gyűjtése történt. A minták RFLP-PCR szerotipizálás eredményeként CCR5- $\Delta$ 32 allélnél 0,122; CCR2-64I allélnél 0,186 és az SDF1-3'A allél esetén 0,115 allélgyakoriságot találtunk. Az allélfrekvenciák Hardy-Weinberg equilibrium szerinti egyenes értéket mutattak. Egyes homogén közösségekben a CCR5- $\Delta$ 32 allélfrekvencia érték 0,14 volt. A oláh cigány kisebbség mintáiban a CCR5- $\Delta$ 32 allél gyakorisága 15% volt, ami meghaladja a magyar lakosság körében előforduló 12%-ot. Ugyanakkor ez az érték a tízszerese a roma migrációs origóban, Indiában élők között tapasztalhatónak. Ez az érték jóval magasabb a magyar populációs átlagértékekhez képest, viszont SDF1-3'A (0,115) allélgyakoriságnál fordítottan érvényesül ez a megállapítás. Itt alacsonyabb értékeket kaptunk a magyar lakosságra jellemző allélfrekvenciához (0,2126) képest. CCR2-64I kódoló génben a mutációs gyakoriság lényegesen magasabb értékű volt az európai átlagnál (0,065-0,17). A vizsgált minták 63%-ában legalább az egyik vizsgált génben volt mutáció [Juhász et al. 2012].

A HIV terjedését, valamint a replikáció gátlását antiretrovirális terápia segítségével érhetjük el. Az antiretrovirális drogrezisztencia a reverz transzkriptáz és proteáz enzimeket kódoló génekben bekövetkezett mutációk eredménye. Magyar nemzetiségűek bizonyítottan külföldi partnereiktől kapott, primer HIV CRF átvitelét vizsgáltuk in situ DNS hibridizációt használó Line Probe Assay (Inno-LiPA) és a Stanford AIDS adatbázis használatával a Trugene HIV-1 Genotyping Kit és OpenGene Sequencing System (Siemens) segítségével. A célgén amplifikációja után a DNS szekvencia analízise következett (TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit), majd egy elemző

szoftver (OpenGene DNA Sequencing System ) segítségével kimutathatóvá váltak a mutációk a HIV-1 proteáz és reverz transzkriptáz enzimeket kódoló régióiban.

A vizsgálati csoport partnerei afrikai (60,5%), ázsiai (3,5%), valamint európai (36%) országokból származtak. A külföldi partnerek nemek szerinti megoszlása: férfiak 46%, nők 54%-os arányt mutattak. 60,5% volt az egyenlítői, fekete-afrikai országokból, mint Kamerun, Ghána, Elefántcsontpart, Nigéria, Szudán és Uganda származó partnerek aránya. Több, mint egyharmad európai országokból, Németországból, Romániából, Ukrajnából származott. 3,5% a fertőzését vietnámi partnerétől kapta.

HIV-1 szubtypusok, non-B kládok és cirkuláló rekombináns formák (CRF) szintén jelen voltak. Az előforduló HIV-1 szubtypusok az A, B (25%), C (10.7%), F1 (7.2%), G (3.6%), J és K (3,6%) voltak. A domináns rekombinánsok: CRF02\_AG (28.5%), CRF06\_cpx (17.8%) és CRF11\_cpx (3.6%).

72 kodon, közülük 64 specifikus rezisztencia kodon vizsgálatát végeztük. A géneken NRTI [Abacavir (ABC), Didanosine (ddI), Lamivudine (3TC)/Emtricinabine (FTC), Stavudine (d4T), Tenofovir (TDF), Zidovudine (AZT), Zalcitabine (ddC)], valamint NNRTI [Efavirenz (EFV), Nevirapine (NVP), delavirdine (DLV), Etravirine (ETR)] és PI [Amprenavir (APV)/Fosamprenavir(FPV), Atazanavir (ATV), Darunavir (DRV), Indinavir (IDV), Lopinavir+Ritonavir (LPV/r) Nelfinavir (NFV), Saquinavir (SQV), Tiranavir+Ritonavir (TPV)] hatású terápiás szerekre rezisztens mutációkat mutattunk ki. NRTI és NNRTI rezisztens mutánsok száma meghaladta a PI rezisztenciát mutató mutánsokét. Multidrog rezisztens mutánsok jelenléte is kimutatható volt (34. ábra).

Categories	NRTIs	NNRTIs	PIs	Entry Inhibitors (CCR5 and Fusion Inhibitors)	Integrase Inhibitors
Treatment naïve patients	Zidovudine (AZT) Stavudine (d4T) Lamivudine (3TC) Didanosine (ddI) Zalcitabine (ddC) Abacavir (ABC)	Nevirapine (NVP) Delviradine (DLV) Efavirenz (EFV) Ralpivirine (R)	Ritonavir (RTV) Indinavir (IDV) Saquinavir (SQV) Nelfinavir (NFV) Amprenavir (APV) Fosamprenavir (FPV) Atazanavir (ATV)	-	-
Treatment experienced patients	Tenofovir (TDF)* Emtricitabine (FTC)*	Etravirine (ETV)	Tipranavir (TPV) Darunavir* (DRV)	Maraviroc* Enfuvirtide	Raltegravir*
Prevention of vertical transmission (WHO guidelines)	Zidovudine Lamivudine Tenofovir Emtricitabine	Nevirapine Efavirenz	-	-	-
Children	Zidovudine Stavudine Lamivudine Didanosine Emtricitabine Abacavir	Nevirapine	Ritonavir Nelfinavir Darunavir	Enfuvirtide	-
For post exposure prophylaxis	Zidovudine (AZT) Stavudine (d4T) Lamivudine (3TC) Didanosine (ddI) Emtricitabine (FTC) Tenofovir (TDF)	Efavirenz	Indinavir Nelfinavir Ritonavir Saquinavir Fosamprenavir Atazanavir Ritonavir/Lopinavir	Enfuvirtide	-
For pre exposure prophylaxis	Tenofovir and Emtricitabine in MSM				

\*Approved for both treatment naïve and treatment experienced patients MSM – Men who have sex with men  
NRTI = Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors; NNRTI = Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors; PI = Protease Inhibitors

### 34. ábra. Terápiás antiretrovirális szerek

Az antiretrovirális szerek csoportjai az NRTI (nukleozid/nukleotid reverz transzkriptáz gátlók), NNRTI (non-nukleozid reverz transzkriptáz gátlók), PIs (proteáz gátlók), Entry inhibitors/Fusion inhibitors (bejutást gátlók/fúziós inhibitorok), Integrase inhibitors (integráz inhibitorok). A HAART (highly active antiretroviral therapy) során megfelelő farmakokinetikai hatásokat figyelembe véve kombinációban alkalmazhatók [Desai et al. 2012].

A leggyakoribb átviteli mód a heteroszexuálisok közötti 67,8% volt. Az MSM populációban 21,4%-ot az IDU (intravénás droghasználók) 7,2% és a nozokomiális fertőzés 3,6% követte. Az összes vizsgált minta 15%-a valamelyik hatásmechanizmusú antiretrovirális terápiás szerre rezisztenciát mutatott. Multidrog rezisztens törzsek nagy százalékban voltak jelen. 11%-a a vírusoknak kétféle inhibitorra, 7% háromféle is rezisztens volt. A vizsgált minták közül egyik páciensé 14 féle antiretrovirális ágensre is rezisztenciát mutatott. A primer fertőzéseket okozó, terápia-naïve HIV-1 izolátumok NRTI rezisztenciája férfi pácienseknél fordult elő legnagyobb számban. A NNRTI és PI rezisztencia a MSM populációban volt a legmagasabb. Az izolátumok leginkább a proteáz inhibitorokra voltak ellenállóak, ezt követték a NRTI, majd NNRTI származékok (9. táblázat) [Kanizsai et al. 2010].

9.táblázat. Magyarországi terápia-naíve HIV-1 izolátumok antiretrovirális rezisztenciája

		NRTI %	NNRTI %	PI %
Nők	Érzékeny	80.61	33.03	64.29
	Mérsékelt	4.08	3.57	7.74
	Rezisztens	5.1	0	8.33
Férfiak	Érzékeny	62.24	24.11	56.55
	Mérsékelt	14.29	0.89	9.52
	Rezisztens	14.29	8.93	15.47
Heteroszexuális	Érzékeny	79.36	68.05	65.74
	Mérsékelt	5.55	5.55	6.94
	Rezisztens	3.97	0	7.4
MSM	Érzékeny	65.3	32.14	48.81
	Mérsékelt	16.33	3.57	10.71
	Rezisztens	10.2	25	19.05
Összes	Érzékeny	71.43	57.14	60.42
	Mérsékelt	9.18	4.46	8.3
	Rezisztens	8.16	5.36	12.5

A táblázat a terápia-naíve HIV-1 izolátumok NRTI, NNRTI és PI rezisztenciájának százalékos előfordulását mutatja. A vizsgált mintákban multidrog rezisztens törzsek nagy számban voltak jelen.

A külföldi partnerekről kontakt információval nem rendelkezünk, hogy további vizsgálatokat elvégezhessünk az izolált törzsek vonatkozásában.

## 6. Megbeszélés

"It is time to use our imaginations and let everyone know that Getting to Zero is a must."

- Linda Mafu

World AIDS Campaign Africa Director

Ahhoz, hogy a HIV bejusson a gazdasejtbe CD4 receptor mellett szükség van koreceptorokra is. A korai replikációs ciklus első lépése a virális gp120 V3 glikoprotein alegységének a CD4 molekulához való kapcsolódása. Ez az interakció egy olyan szubstrukturális átrendeződést idéz elő, ami gp41 és a megfelelő koreceptor kapcsolódást teszi lehetővé. Ezek elsődlegesen a G-protein kapcsolt receptorok közé tartozó, makrofág-tróp HIV-1 izolátumok által preferált CCR5 koreceptor, valamint a T-sejtvonal-tróp HIV-1 izolátumok által használt CXCR4 koreceptor [Berger et al. 1999]. A receptor tropizmus szerint ezek a HIV variánsokat R5-trópok, amennyiben a CCR5 koreceptort használják, X4-trópok, ha a CXCR4 koreceptort részesítik előnyben a sejtbe való bejutáshoz. A dual-tróp vírusok mindkét receptortípushoz való kapcsolódásra képesek. A vírusok képesek tropizmusuk változtatására is, ami leginkább a betegség progressziójánál figyelhető meg [Connor et al. 1997].

A CCR5 és CXCR4 koreceptorok mellett egyéb kemokin receptorokat is, mint például a CCR2, CCR3, CCR8, CCR9, STRL33 ("Bonzo"), Gpr15 ("Bob"), Gpr1, APJ, ChemR23 is használhatnak az egyes HIV izolátumok a target sejtbe jutáshoz. HIV-1 kapcsolódhat még bizonyos integrinekhez, ilyen például az  $\alpha 4\beta 7$  is, ezzel is a sejtfúziót előidézve [Deng et al. 1997]. A virális burokkészlet transzmembrán alegységében az átrendeződés által a gp41 N-terminális fúziós peptidjének pozíciója megváltozik, kapcsolódva a gazdasejt membránjával [Root et al. 2001].

A plazmamembrán receptorok funkciójának teljes körű megismeréséhez nem csak az aminosav sorrend, hanem a pontos, három dimenziós térbeli szerkezet ismerete is hozzájárul, hiszen így szerezhetünk bővebb információkat a receptorok más fehérjékkel, lipidekkel való kapcsolatáról. Ugyanakkor a receptorok lokalizációja a plazmamembránban és a szomszédos molekulákkal való kölcsönhatása szintén nagy jelentőséggel bír. Speciális membrán mikrodomének, az úgynevezett lipid raftok koleszterin, szfingolipid és glicerofosfolipid molekulákkal koncentrálnak a



membránlipid kettős rétegben. Szerepük lehet a membrán proteinek koncentráálásában, szegregálásában is. A CD4 és a koreceptorok is szoros kapcsolatban lehetnek sejtmembrán koleszterinben gazdag lipid molekuláival, illetve a lipid raftokon kívül, szabadon is megtalálhatók [Simon et al. 1997]. Toxinok, bizonyos patogén mikroorganizmusok a lipid raftokban található GM1-el kapcsolódva jutnak a gazdasejtbe. A burkos vírusok nagy része, így a HIV is a célsejtbe jutáskor, illetve a vírus összeépülés utáni bimbózáskor a lipid raftokban gazdag régióknál létesít membránkapcsolatot. A gazdasejtből való kijutás során így tehet szert célsejt eredetű koleszterinben és szfingomielinben gazdag burokra [Aloia et al. 1988].

A HIV Nef proteinje növelheti a sejt koleszterin bioszintézisét, gátolhatja a koleszterin effluxot, valamint koleszterinhez kapcsolódva serkenti a raftokhoz való szállítódást [Zeng et al. 2003, van't Wout et al. 2005, Bukrinsky et al. 2006]. A koleszterin ugyanakkor a CCR5 jelátviteli folyamatainak katalizálásában is nagy jelentőséggel bír [Cardaba et al. 2008].

A HIV-1 fertőzés *in vitro* és *in vivo* is sejtproliferációs hatással van a T-limfocitákra. Kísérleteinkben MT-2 és H9 T-sejteken is ezt a hatást tapasztalhattuk. HIV fertőzéskor a célsejt aktivált állapotba kerül. Sejtes elemek, így a sejtmembránban levő lipid raftok is bonyolult kaszkád folyamatok által befolyásolt változásokon mennek keresztül. A sejtfelszíni lipid raftokban összegyűlt fehérje molekulákban, így bizonyos receptorokban, koreceptorokban is megnövekedett mértékben lesznek jelen a stabilizáló -SH csoportok. A sejtfelszíni tiolmolekulák aktivációs és proliferációs szerepe régóta ismert. Aktivált sejteken a nyugvó állapotban levő sejtekhez képest számuk sokkal magasabb. A sejtfelszíni -SH antioxidáns hatással bírhat, sejtnövekedést serkentő szignál transzdukciós folyamatokban és az apoptózis folyamataiban is szerepet játszhat [Lawrence et al. 1996]. Az extracelluláris tér oxidáló hatásával szemben a redukáló hatású -SH csoportok a sejtfelszíni mikrokörnyezet részei. A redukáló hatás fenntartása az aktivált sejt oxidációs/redukciós elektrontranszfere által történik. Az elektrontranszfer a sejtfelszínre kerülő fehérjék, mint a protein diszulfid izomeráz (PDI) és a tioredoxin által történhet [Matthias et al. 2010]. PDI négy tioredoxin doménből áll, redukált formája tiolkötések redukcióját katalizálva izomerázként működik. Az extracelluláris fehérjék érési folyamataiban chaperonok és katalizáló enzimek kontrollja alatt a cisztein molekulák specifikus keresztkötéseikkel stabilizálják a fehérjéket, vagy

más fehérjékkel való kovalens kötések létrejöttében játszanak szerepet. Ezek a diszulfid kötések megfigyelhetők a háromdimenziós protein struktúrákban. A PDI is egy diszulfid formáció létrehozásában szerepet játszó, katalizáló enzim [Hatahet et al. 2007]. PDI szerepet játszik még az MCH I molekulák és az antigén kötésének létrehozásában, ezzel az antigénprezentáló sejtek felszínén megjelenhet az antigén-MHC komplex, amit a releváns T-sejt receptorok felismerhetnek, citokin termelés aktiválódhat [Elliott et al. 2006].

Exogén membránkötött makromolekulák diszulfid kötéseinek redukciója, mint a PDI általi redukció is, segíti a sejtidegen anyagok bejutását. Toxinok, makromolekulák, patogének juthatnak be a sejtbe. A gp120 és CD4 -SH csoportjainak változásai jelentős szerepet játszanak a HIV korai replikációs folyamataiban. PDI redukálva gp120 stabilizáló diszulfid kötéseit egy konformáció változást okoz, amely a fuzogén gp41 alegységek membránkapcsolatát segíti elő. A kilenc diszulfid kötés közül kettő redukciója elegendő, hogy a folyamat elkezdődhessen. Egy redukciós kaszkád indul el, melynek eredményeként megtörténik a fertőzés, a HIV bejut a célsejtbe [Barbouche et al. 2003, Stanchev et al. 2012]. PDI számos extra- és intracelluláris fiziológias funkcióval rendelkezik, aktivitásának gátlásával folyamatok befolyásolhatók, így betegségek kialakulását gátolhatjuk. Számos gátló hatású vegyületet fejlesztettek ki, melyek reverzibilisen vagy irreverzibilisen kötődnek PDI aktív centrumához [Hoffstrom et al. 2010]. Terápiás megoldások között szerepelhetnek az anti-PDI antitestek is. Mivel számos sejtfuncionális folyamatban szerepe van PDI-nek, ezért ennek az enzimnek a blokkolása limitált lehetőségekkel rendelkezik [Gallina et al. 2002].

A HIV gazdasejtbe jutásakor a vírus gp120 molekulája kapcsolódik a sejt felszíni CD4 receptorhoz, amely lépést az antiretrovirális szerek közül az úgynevezett "*attachment inhibitor*" - kapcsolódást gátló hatású vegyületek megakadályozhatják. A koreceptorokhoz való kötődést a koreceptor antagonistákkal gátolható, míg a vírus bejutásának harmadik, jelentős lépése a membránfúzió folyamata, amit fúzió gátlókkal "*fusion inhibitor*" akadályozhatunk meg. A kapcsolódást gátló "*attachment inhibitor*"-ok, a koreceptor antagonisták és a fúziót gátló vegyületeket "*entry inhibitor*" - bejutást gátló vegyületek összefoglaló néven említhetjük. Az enzimgátló hatású NNRTI, NRTI, PI és integráz enzim gátlóktól leginkább abban különböznek, hogy extracellulárisan képesek megakadályozni a primer HIV fertőzést.

A kísérleteinkben használt politolált oligonukleotidok interakciókat létesítve a sejtfelszíni -SH (tiol) csoportokkal hatással vannak a sejtekre, valamint a HIV burkán lévő gp120 molekulában levő -SH csoportokkal is reakcióba lépnek. A HIV gazdasejtbe jutásakor mind a sejtfelszínen, a sejtfelszíni CD4 molekulában, mind pedig a HIV burkán levő gp120 molekulában tiol-diszulfid redukciók mennek végbe. A sejtfelszíni tiolcsoportokkal reakcióba lépő vegyületek, mint amilyen a tioredoxin, befolyásolhatják a HIV gazdasejtbe jutását, amely arra világít rá, hogy a vírusok sejtbe jutását segítő redox folyamatok potenciális célpontjai lehetnek a HIV terápiának. A gp120 -SH csoportjai redukciójának, így például a PDI aktivitásának gátlásával is a HIV sejtbe jutását akadályozhatjuk.

Glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) a szénhidrátok katabolizmusának, a glikolízisnek egyik fontos enzime, ami a glicerinaldehid-3-foszfát a glicerinsav1,3-bifoszfáttá alakításában vesz részt. Aktív centruma rendelkezik egy esszenciális cisztein oldallánccal, ezért ez a molekula megfelelőnek bizonyult tiol-funkciók biokémiai interferenciáinak vizsgálatára. Mivel tiol-diszulfid redukciók szükségesek a HIV gazdasejtbe jutásához, ezért ezzel a molekulával jól modellezhető a kísérleteinkben is alkalmazott politolált oligonukleotidok hatásmechanizmusa. Kísérletek során bizonyossá vált, hogy UD29 és származékai gátló hatással vannak a modell molekulaként használt glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenázra [Beck et al. 2009].

UD29, UD30, UD31, UD29-new, MOD-94, MOD-2012 és UD30-new nukleotid vegyületek nem tudnak bejutni a sejtbe, hatásukat extracellulárisan fejtik ki. Az enol formátumú politolált oligonukleotidok interferálhatnak sejtfelszíni, akár esszenciális receptorokban levő -SH csoportokkal [Ryser et al. 1994, Beck et al. 2009]. GAPDH-val végzett kísérletek a politolált oligonukleotidok PDI-vel, illetve egyéb sejtfelszíni tiol csoportokkal történő interakcióját modellezték [Tökés et al. 1996, Horváth et al. 2005, Beck et al. 2009].

A kísérleteinkben alkalmazott politolált oligonukleotid származékok hatásmechanizmusukkal redox folyamatokat céloznak meg, befolyásolva a HIV target sejtbe jutását. A vegyületek -SH reaktív csoportokat tartalmaznak. A negatív töltésű oligonukleotidok a pozitív töltésű gp120-hoz kötődhetnek. A kísérleti vegyületek a sejtfelszíni -SH csoportok diszulfid kötésekkel interferáló hatása a HIV gazdasejtbe

jutását gátló folyamatok egyik alapja lehet, így a CD4 receptorban, valamint a gp120 molekulában a redox folyamatok befolyásolásával, például a tioredoxin és a PDI gátlásával.

Számos sejtvonalon, így a CD4 receptort kifejező, humán H9 és MT-2 T-sejtvonalon, transzfektált 3T3.T4.CCR5 és 3T3.T4.CXCR4 egér fibroblaszt sejteken; HeLaCD4-LTR- $\beta$ -gal és P4-CCR5 transzfektált humán fibroblaszt sejteken HIV-1<sub>IIIB</sub>, illetve HIV pszeudovirionokkal fertőzve, vagy fertőzés nélkül teszteltük az alkalmazott vegyületek hatásait. A vírus, illetve a HIV pszeudovirionok koncentrációja (5-100  $\mu$ l) kísérlet típusától függően változott. A politiolált oligonukleotidok is eltérő koncentrációban (0,5-40  $\mu$ g/ml) kerültek tesztelésre.

A toxicitási kísérletekben az alkalmazott politiolált oligonukleotidjaink fertőzés nélküli sejteken, a 24 órás kísérletek eredményeként magasabb koncentrációban (>40  $\mu$ g/ml) sejtkárosító hatást mutattak. A fertőzött T-limfocitákra kifejtett citotoxikus hatás szembetűnőbb volt, mint a monolayer HeLaCD4-LTR- $\beta$ -gal sejteken. Ennek magyarázata abban lehet, hogy a monolayer sejtvonal eltérő redox szignál transzdukciós rendszerrel rendelkezik, mint a limfociták.

A vad típusú HIV-1<sub>IIIB</sub>, illetve sejtvonalakra releváns koreceptort hordozó, HIV pszeudovirionokkal fertőzött sejtek aktivált állapota megfigyelhető volt. A toxicitási vizsgálatok eredménye nem tulajdonítható csak a vírus, illetve pszeudovirion fertőzésnek, mivel 24 órás, akut kísérleti eredményeinket a replikációs folyamatok egyáltalán nem, vagy alig befolyásolják. A fertőzést követő a 48 órás, krónikus folyamatokban a politiolált oligonukleotidok citotoxicitási eredményeit a vírusfertőzés befolyásolta.

Sejtek HIV fertőzésénél jellemző citopátiás jelenség az óriássejtek, úgynevezett szincíciumok létrejötte. A sokmagvú óriássejtek sejtfúzió által jönnek létre, ami a sejt pusztulásához vezethet. T-sejt tróp HIV vírusokra jellemző a szincícium formációt létrehozó hatás, míg a makrofág-tróp vírusok esetében ez a jelenség nem számottevő [Lifson et al. 1986, Deng et al. 1996]. Ugyanakkor figyelembe kell venni azt a tényt is, hogy más sejtfelszíni molekulák ugyancsak szerepet játszhatnak az óriássejtek kialakulásában. Ilyenek lehetnek a HLA I-es osztályba tartozó sejtfelszíni molekulák, vagy az LFA-1 és ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 is [Gruber et al. 1991, Butini et al. 1994, de Sanctis et al. 1996]. Mivel a HIV-1 korai replikációs ciklusának és a szincícium

formációnak számos közös pontja fedezhető fel, ezért széleskörűen tanulmányozottak mind a HIV bejutásának, mind pedig a szincíciumok kialakulásának folyamataiban. A kialakulást gátló folyamatoknak a mechanizmusai az inhibíciós metodikák segítségével is elemezhetőek. A Szincícium inhibíciós assay eredményeként a politolált oligonukleotidjaink dózisfüggő, gátló hatását figyelhettük meg. A szincícium kialakulása során aktív membrán átrendeződések történnek, amelyekben a redox folyamatok is nagy szereppel bírnak.

A szincícium inhibíciós assay, a kvantitatív p24 antigén assay, a MAGI assay (Multinuclear activation of galactosidase inhibition) és a kvantitatív Luciferáz assay során szintén arra a megállapításra jutottunk, hogy a politolált oligonukleotidokkal való kezelés a leghatásosabbnak akkor bizonyult, amikor a sejtvonalakhoz a fertőzését 30 perccel megelőzően adtuk a vegyületeket. A leghatásosabbnak az 5 µg/ml koncentráció alkalmazása, valamint a legújabban kifejlesztett változat, az UD30-new 1,87 µg/ml koncentrációja bizonyult [Kanizsai et al. 2012, Kanizsai et al. 2014].

Ismert tény, hogy a HIV sejtbe jutásának feltétele a receptor-ligandum kötődés létrejötte. A receptor-ligand mechanizmus specificitása lehetőséget teremthet terápiás beavatkozásokra. A kísérleteink során vizsgált politolált oligonukleotidok további fejlesztések, kutatások után a jövőben alapját képezhetik HIV ellenes terápiás szerekeknek, esetleg, mint bejutást gátló, úgynevezett "entry inhibitor"-ok alapvegyületei lehetnek. Számos antiretrovirális terápiás szer van forgalomban. A hatásukat tekintve bejutást gátló szerek, az "entry inhibitor"-ok, a HAART megfelelő kiegészítői lehetnek (33.ábra).

Ahhoz, hogy a HIV bejusson a gazdasejtbe a koreceptoroknak jelentős szerep jut. A HIV fertőzés korai replikációs mechanizmusának első történése, a koreceptort kódoló gén polimorfizmusa által meghatározott folyamat. A leggyakoribb HIV-1 rezisztencia allélok vizsgálatát a magyarországi oláh cigány populációban végeztük. PCR-RFLP segítségével az allélvariánsok kimutatása volt a cél a CCR5-Δ32, CCR2-64I és az SDF1-3'A kódoló génekben. A oláh cigány kisebbség mintáiban a CCR5-Δ32 allél gyakorisága 15% volt, ami meghaladja a magyar lakosság körében előforduló 12%-ot. Ugyanakkor ez az érték a tízszerese a roma migrációs origóban, Indiában élők között tapasztalhatóan. CCR2-64I kódoló génben a mutációs gyakoriság lényegesen magasabb értékű volt az európai átlagnál, míg az SDF1-3'A kódoló génekben sokkal

alacsonyabb szintet mutatott. A vizsgált egyének 63%-a hordozott legalább egy rezisztencia gént [Juhász et al. 2012].

A genetikai variációk gyakran előnyösek is lehetnek. Random fluktuációk lehetnek allélok között a populációkon belül, ami által a drift csökkenhet, illetve akár növekedhet is idővel, vagy az adott allél el is tűnhet. Magassági viszonyok, nyomáskülönbség, klimatikus körülmények, táplálkozás, higiénés viszonyok, migráció egyszóval a környezeti faktorok mind hatással lehetnek fenotípusos és genotípusos megjelenési formákra.

HIV replikációs folyamatai során is számos mutáció jöhet létre. A pontmutációknál nagyobb gyakorisággal történnek rekombinációs események. A rekombinációnak köszönhetően, a vírus evolúciós folyamatai széleskörű diverzifikálódást hoznak létre, ezzel kialakulhatnak multidrog rezisztens törzsek a fertőzöttekben. A HIV-1 gyors replikációjának eredménye a vírus nagyfokú genetikai variabilitása. A hatékony antiretrovirális terápiás szer vagy vakcina kifejlesztéséhez elengedhetetlen a HIV replikációs és rekombinációs mechanizmusainak ismerete, hogyan változik a genetikai állománya, hogyan fejleszt ki multidrog rezisztenciát az antiretrovirális terápia során [Althaus et al. 2005, Simon et al. 2006].

A HIV a célsejtbe jutásához elengedhetetlen a burok-glikoproteinek jelenléte. A vírus tropizmusa határozza meg, hogy milyen sejtet fertőz a HIV. A tropizmus meghatározása fenotípus- és genotípus elemző vizsgálatok segítségével is megvalósulhat. A fenotípusos tropizmus meghatározása a Trofile™ assay vagy a Phenoscript® ENV (Eurofins/VIRliance) segítségével történhet. A genotipizáló vizsgálat a gp120 V3 doménjének génjét web alapú bioinformatikai analízissel elemzi [Skrabal et al. 2007]. A genotipizálás ebben a formában nem tesz különbséget az R5-, Dual- és X4-típusú vírusok között. Erre lehetőséget a PCR alapú geno2pheno detektáló rendszer ad [Vanderkerckhove et al. 2011]. A fenotípusos vizsgálatokkal szemben a genotipizáló módszerek költséghatékonyabbak, gyorsabbak és érzékenyebbek is.

Mielőtt az antiretrovirális terápiás szerek kiválasztásra kerülnek, az optimális virológiai válaszreakcióhoz ismerni kell a fertőzést okozó HIV izolátum ART rezisztenciáját. Genotipizáló vizsgálatok segítségével kimutatható a rezisztencia gének jelenléte, így a *pol* és *pr* géneknél előforduló polimorfizmus, ezáltal a terápiás kombináció módosítható. A meghatározás indokolt az ART során is a kialakult mutáns

törzsek és szuperinfekciók kiszűrésére, hogy a terápiás kombinációkat az eredmények tekintetében választhassák meg.

Mutációk kiszűrésére a genotipizálás a reverz transzkriptáz és proteáz enzimeket kódoló gének allélmódusulásait mutatja ki. A megnövekedett számú mutációk ellenállóvá tehetik a vírust a kombinációs terápiával szemben, elősegítve az AIDS gyorsabb kialakulását klinikai és közegészségügyi következményeket vonva maga után.

Tanulmányunkban terápia-naïve magyarországi lakosokból izolált törzseket genotipizáltunk. A minták olyan egyénektől származtak, akik fertőzésüket külföldi partnereiktől kapták. A partnerek 60,5%-a afrikai, 3,5% ázsiai 36% pedig európai országokból származott. A külföldi partnerek nemek szerinti megoszlása: férfiak 46%-os, nők 54%-os arányt mutatott. A partnereknek 60,5% volt az egyenlítői fekete-afrikai országokból, mint Kamerunból, Ghánából, Elefántcsontpartról, Nigériából, Szudánból és Ugandából, több, mint egyharmaduk európai országokból, Németországból, Romániából, Ukrajnából származott. 3,5% pedig a fertőzést vietnámi partnerétől kapta. A szerzett fertőzés arányos megoszlása a következők szerint alakult: 67,8% heteroszexuális kapcsolat, 21,4% homoszexuális kapcsolat, 7,2% intravénás droghasználók (IDU) és 3,6% nozokomiális fertőzés [Kanizsai et al. 2010].

A genotipizáló vizsgálatunk a HIV reverz transzkriptáz és a proteáz enzimeket kódoló géneket elemezte az *in situ* DNS hibridizációt használó Line Probe Assay (Inno-LiPA) és a Standford AIDS adatbázis használatával a Trugene HIV-1 Genotyping Kit és OpenGene Sequencing System (Siemens) segítségével. HIV-1 szubtypusok, nem-B kládok, valamint cirkuláló rekombináns formák (CRF) is kimutathatók voltak. A domináns rekombinánsok: CRF02\_AG (28.5%), CRF06\_cpx (17.8%) és CRF11\_cpx (3.6%) voltak. Az előforduló HIV-1 szubtypusok az A,B (25%), C (10.7%), E, F1 (7.2%), G (3.6%), J és K voltak. 72 kodon, közülük 64 specifikus rezisztencia kodont vizsgáltunk. Legnagyobb arányban a PI-vel szemben ellenállóképességet biztosító gének jelenléte volt megfigyelhető. Ezt követte a NRTI és a NNRTI antiretrovirális szerekkel szembeni rezisztencia. Az összes minta 12,5%-a rezisztenciát mutatott PI-kal szemben, 8%-a NRTI ellen, valamint 5%-a NNRTI-vel. Az MSM populációban az átvitelrel történt fertőzéseknél a minták 25%-ban NNRTI-vel szembeni rezisztenciát találtunk. Multidrog rezisztens mutánsokat is kimutattunk a terápia-naïve izolátumok

között. Az izolátumok 11%-a kétféle antiretrovirális szerrel szemben volt rezisztens, míg 7% háromfelére is [Kanizsai et al. 2010].

Magyarországon 2003 óta tartó, átfogó vizsgálatokban a terápia-naïve, primer HIV fertőzések rezisztencia mutáns izolátumai kerülnek monitorozásra. A páciensekben a primer HIV fertőzést okozó izolátumok antiretrovirális terápiás szerekkel szembeni rezisztenciájának megjelenése korrelációt mutat a magyarországi HAART terápia kezdetével. Bizonyítottuk a nem-B HIV kládok, cirkuláló rekombináns mutánsok és multidrog rezisztens variánsok jelenlétét hazánkban, ami komoly klinikai és közegészségügyi jelentőséggel és következményekkel bír. A terápiás szereknek ellenálló vírusok kikerülnek a kombinált kezelés kontrollja alól és elősegítik a betegség mielőbbi kialakulását [Nagy et al. 1994, Juhász et al 2008].

Ahhoz, hogy szignifikánsan csökkentsek az új HIV fertőzöttek számát, radikálisan változtatni kell a globális hozzáálláson. Továbbra is nagy hangsúlyt kell fordítani a HIV megelőzésre, valamint terápiára és gondozó tevékenységekre. A járványok régióról régióra, országról országra változnak. Vannak földrészek, országok, ahol nagyobb prioritást kellene, hogy élvezzenek a nemzeti HIV megelőző programok. Számos endémiának különösen kitett országból származó, HIV fertőzött aktivisták körének köszönhető, hogy a HIV-et körülvevő "csend" megtört. MSM aktivisták, szexmunkások, droghasználók a világ számos országából masszív megmozdulásukkal hívják fel a globális figyelmet egy sürgető megoldásra. Eredmény orientált, ambiciózus célokkal mutatnak rá, hogy szükség van naprakész stratégiai lépésekre. Ide tartoznak egészségügyi, politikai, gazdasági, szociális, emberjogi lépések, hogy megelőzzük a vírus további gyors terjedését, a fertőzöttek társadalmi stigmatizációját. Új generációs, új hatásmechanizmusú antiretrovirális terápiás szerek kifejlesztése és a megfelelő ellátás radikálisan leegyszerűsített kezelési platformot eredményezhet, szoros kapcsolatban más egészségügyi- és közszolgáltatásokkal.

2011-ben a WHO a következő öt évre kihirdette a "World AIDS Day - II" AIDS világnap új szlogenjét: "Getting to Zero" - "Zero fear, zero stigma, zero discrimination, zero ignorance, zero risk, zero new cases, zero deaths". Egy reménynél többet kell, hogy jelentsen ez a szlogen. Ez kell, hogy legyen a cél.



## 7. Következtetések

"We of the 21th century know better.  
We know that a virus causes AIDS and we know how to prevent its spread.  
Treatments have been developed.  
Science has given us grounds to hope for vaccines and, ultimately, for a cure.  
All this is known.  
Yet, to date, our global response to this rapidly spreading scourage has been woefully inadequate."  
- Colin Powel  
Secretary of State, USA

Kutatásaink célja a HIV korai replikációs mechanizmusának molekuláris vizsgálata volt. A célkitűzéseknek megfelelően, a legfontosabb új megállapítások és eredmények a következők:

- ❖ Limfociták és transzfektált sejtvonalak segítségével olyan sejtmodell metodikákat alkalmaztunk, amelyek lehetővé tették HIV-1 korai replikációs ciklusának *in vitro* tanulmányozását.
- ❖ Plazmidok segítségével replikáció defektív HIV pszeudovirionokat hoztunk létre, amelyek bejutottak a releváns koreceptort hordozó sejtekbe. Az infektivitás mértéke riporter gének által kvantitatív módon mérhető volt, valamint a produktív fertőzéshez szükséges koreceptor használat jellegzetességeit is tanulmányozhattuk.
- ❖ A humán immundeficiencia vírus korai replikációs ciklusának molekuláris elemzése során új adatokat nyertünk a primer HIV fertőzésben alapvető szerepet játszó sejtfelszíni thio-redox folyamatok részleteiről politolált oligonukleotidok *in vitro* alkalmazásával.
- ❖ A kísérleteinkben alkalmazott politolált oligonukleotidok maximális gátló hatásukat a vírusfertőzést megelőzően adva fejtették ki. Hatásuk jelentősen csökkent a sejtek fertőzését követő kezeléskor.
- ❖ A kísérletek során használt vírus fertőzést gátló politolált oligonukleotidok idő- és dózisfüggően, koncentrációtól, valamint a felhasznált sejtvonalak passzázs számától befolyásoltan csökkentették a HIV-1<sub>IIIB</sub> klinikai izolátumok, valamint modellezésükre használt HIV pszeudovirionok sejtbe jutását.

- ❖ Az alkalmazott politolált oligonukleotidok a hatásukat a virális és sejt felszíni proteinek redox modifikációjával fejtik ki, ezzel mintegy HIV *entry inhibitor* funkciót betöltve.
- ❖ A sejtproliferáció során lényegesen megemelkedik a sejt felszíni -SH csoportok száma. *In vivo* és *in vitro* HIV-1 fertőzés aktiválja a T limfociták proliferációját. A kísérleti vegyületek a sejt felszíni -SH csoportok diszulfid kötésekkel interferáló hatása - így a CD4 receptorban, valamint a pg120 molekulában a redox folyamatok befolyásolása - a HIV gazdasajtbe jutását gátló folyamatok egyik formája lehet.
- ❖ A kísérletek során a vegyületek szelektív citotoxikus hatását is megfigyelhettük, ami a fertőzés nélküli sejteken jobban érvényesült, mint a fertőzött sejteken. Dózis függő hatást detektáltunk, valamint a víruskoncentráció is befolyásolta a citotoxicitás mértékét.
- ❖ Bizonyítottuk a kísérleteinkben használt, hazai fejlesztésű és előállítású politolált oligonukleotidoknak a hatékony HIV ellenes antivirális hatását. Az eddigi - csak a már vírussal megfertőzött sejtekben intracellulárisan aktív - terápiás szerekkel szemben már a HIV fertőzés elsődleges fázisában meggátolja a vírusfertőzést (*entry inhibitor*). Ezen új hatásmechanizmuson alapuló vegyületcsalád eredményeink alapján perspektivikusan tovább fejleszthető az AIDS még hatékonyabb kezelése céljából.
- ❖ Eredményeink segítségével behatóbb ismereteket szereztünk a HIV gazdasajtbe jutásának molekuláris mechanizmusáról.
- ❖ Közép-Európában az É-D és K-NY irányú migrációs keresztpontjában helyezkedik el Magyarország. Korábbi vizsgálatok folytatásaként terápia-naïve, primer HIV izolátumok antiretrovirális rezisztenciáját genotipizáltuk. Külföldi partnerektől szerzett fertőzések HIV izolátumaiból a rezisztens mutáns törzseket vizsgálva megerősíthetjük a nem-B szubtypusok, CRF és multirezisztens törzsek megjelenését Magyarországon, mely előfordulása mintáinkban több, mint 71%-os értéket mutatott. Az adatok komoly klinikai és közegészségügyi következmények kialakulására hívják fel a figyelmet.

## 8. Összefoglalás

A legkorábbi vérminták, amikből ki tudták mutatni az emberi szerzett immunhiányos állapotot okozó vírust 1959-ből, a kongói Kinsashából származnak. Az első AIDS eseteket 1981 június 5-i dátummal közölték a Center of Disease Control and Prevention's Morbidity and Mortality Weekly Report-ban, a vírust 1983-ban izolálták. A pandémia kezdete óta közel 78 millióan kapták meg a halálos kór okozóját és 39 millió ember halt meg HIV fertőzés következtében. Napjainkban több, mint 36 millió HIV fertőzött ember él, antiretrovirális terápiában 37%-uk részesül.

A gazdasejt fertőzésétől a cDNS genomba integrálódásáig tartó folyamat a HIV korai replikációs ciklusa. Kutatásaink során a genetikai rezisztenciát, mint a CCR5- $\Delta$ 32, CCR2-64I és az SDF1-3'A allél frekvenciák előfordulását molekuláris virológiai módszerekkel elemeztük, valamint külföldi partnertől szerzett, primer fertőzést okozó HIV szubtipusok izolátumait genotipizáltuk, meghatároztuk antiretrovirális rezisztenciájukat.

*In vitro* modellezett, infektivitási metodikákkal számos politiolált oligonukleotid produktív fertőzést gátló hatását vizsgáltuk. A humán sejtek membránjában koleszterinben gazdag lipid raftok találhatóak, amik fehérjéket szegregálhatnak, illetve magukba zárnak. A sejt felszíni tioredoxin aktivitás a CD4 molekulában levő diszulfid kötések hasításáért, míg a protein-diszulfid-izomeráz (PDI) a vírus gp120 glikoproteinjében létrejött redox változásokért felelős, ami elengedhetetlen a vírus gazdasejtbe jutásához. A HIV fertőzött sejtek aktivált állapotba kerülnek, több sejt-komponens, köztük megnövekedett számú -SH csoportok jelenhetnek meg felszínükön. A fertőzést HIV-1<sub>III</sub>B klinikai izolátumokkal és specifikus koreceptorral rendelkező HIV pszeudovirionokkal modelleztük T sejt-vonalakon és transzfektált monolayer sejteken. Kísérleteinkben alkalmazott politiolált oligonukleotidok ezekkel a molekulákkal interferálva idő- és dózisfüggően gátolták a sejtek vírusfertőzését, a gátlás a vírus koncentrációtól is függött. A vegyületek kifejezettebb szelektív toxicitása volt megfigyelhető a fertőzés nélküli sejteken, mint a fertőzött sejteken.

A folyamatban lévő *in vitro* kísérletek döntik majd el, hogy ezek a politiolált oligonukleotidok csak elméleti szempontból érdekes molekulák, vagy további fejlesztés után terápiás szer alapvegyületeiként lehetnek jelen a HIV fertőzés kezelésében.

## 9. Summary

The first verified HIV positive results in humans came from blood samples taken in Kinsasha, Congo dating back to 1959. The first clinical descriptions of AIDS were published on 5th of June, 1981 in the CDC Morbidity and Mortality Weekly Report. The virus was isolated in 1983. Since the beginning of the pandemic, the causing agent of the deadly disease has infected approximately 78 million people of which 39 million have died. To date, more than 36 million people live with HIV infection. 37% of them are receiving antiretroviral therapy.

The early replication cycle of HIV starts from the viral attachment to the host cell membrane and ends with the integration of the cDNA into the infected cell's genome. HIV subtypes and genetic resistance such as CCR5- $\Delta$ 32, CCR2-64I and SDF1-3'A allele frequencies were analyzed with molecular virology methods. Antiretroviral resistance detected from primary HIV CRF infections acquired from foreign partners was analyzed by genotyping.

Entry inhibitors represent a new generation of antiretroviral therapy. *In vitro* inhibition effects of productive infections with polythiolated oligonucleotides were analyzed. Cholesterol rich lipid rafts are located in the host cell's membrane, which are segregating or enclosing proteins. The cell surface thioredoxin activity is responsible for the cleavage of disulfide bonds present in the CD4 molecule, whereas protein-disulfide-isomerase (PDI) is responsible for the redox changes in the viral gp120. This process is essential for viral entry. HIV infection *in vivo* and *in vitro* induces activation and proliferation of host cells. Increased expression of cell components such as -SH groups appear and may concentrate in the lipid rafts. To analyze the effect of these compounds interacting with the cell surface events HIV-1<sub>IIIIB</sub> clinical isolates and HIV pseudovirions were used on T cells and transfected monolayer cells. Polythiolated oligonucleotides used in our studies, time- and dose-dependent, inhibited the infection. The effect was influenced by the viral concentration as well. Selective toxicity assays were performed to detect higher toxicity in uninfected cells compared to virus-infected cells.

Ongoing *in vitro* studies will reveal if these polythiolated oligonucleotides are only theoretically interesting molecules or with further development they will help with the long-term control of HIV infection.

## 10. Irodalomjegyzék

Aboul-ela F, Karn J, Varani G. (1995) The structure of the human immunodeficiency virus type-1 TAR RNA reveals principles of RNA recognition by Tat protein. *J Mol Biol*, 253(2): 313-332.

Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AM, Carstens EB. (2013) Recently agreed changes to the International Code of Virus Classification and Nomenclature. *Arch Virol*, 158(12): 2633-2639.

Adler G, Valjevac A, Skonieczna-Zydecka K, Mackic-Djurovic M, Parczewsky M, Urbánska A, Salkic NN. (2014) Frequency of CCR5 $\Delta$ 32 allele in healthy Bosniak population. *Bosn J Basic Med Sci*, 14(3): 150-154.

Aiola TC, Tian H, Jensen FC. (1993) Lipid composition and fluidity of the HIV envelope and host cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(11): 5181-5185.

Aiola RC, Jensen FC, Curtain CC, Mobley PW, Gordon LM. (1988) Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(3): 900-904.

Albert J, Abrahamson B, Nagy K, Aurelius E, Gaines H, Nyström G, Fenyő EM. (1990) Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *AIDS*, 4: 107-113.

Althaus CL, Bonhoeffer S. (2005) Stochastic interplay between mutation and recombination during the acquisition of drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 79: 13572-13578.

ATCC. Maintaining high standards in cell culture. Brochure. (2010)  
<http://www.atcc.org/Portals/1/Pdf/CellBiologyStandards.pdf>

Ball SC, Abraha A, Collins KR, Marozsan AJ, Baird H, Quinones-Mateu ME, Penn-Nicholson A, Murray M, Richard N, Lobritz M, Zimmerman PA Kawamura T, Blauvelt A, Arts EJ. (2003) Comparing the *ex vivo* fitness of CCR5- tropic human immunodeficiency virus type 1 isolates of subtypes B and C. *J Virol*, 77(2): 1021-1038.

Baltimore D. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature*, 226(5252): 1209-1211.

Banda NK, Bernier J, Kurahara DK, Kurrle R, Haigwood N, Sekaly RP, Finkel TH. (1992) Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primers T cells for activation-induced apoptosis. *J Exp Med*, 176(4): 1099-1106.

Barbouche R, Miquelis R, Jones IM, Fenouillet E. (2003) Protein-disulfide isomerase-mediated reduction of two disulfide bonds of HIV envelope glycoprotein 120 occurs post-CXCR4 binding and is required for fusion. *J Biol Chem*, 278(5): 3131-3136.

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599): 868-871.

Beck Z, Kis A, Berényi E, Kovács P, Fésüs L, Aradi J. (2009) 4-Thio-uridylate (UD29) interferes with the function of protein -SH and inhibits HIV replication in vitro. *Pharmacol Rep*, 61(2): 343-347.

Berger EA, Murphy PM, Farber JM. (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*, 17: 657-700.

Berkhout B, Das AT. (2012) HIV-1 Escapes From RNAi Antivirals: Yet Another Houdini Action? *Mol Ther Nucleic Acids*, 1(6): e26.

Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. (1996) The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, 382(6594): 829-833.

Boden D, Pusch O, Lee F, Tucker L, Ramratnam B. (2003) Human Immunodeficiency virus Type 1 Escape from RNA Interference. *J Virol*, 77(21): 11531-11535.

Brooks JT, Kaplan JE, Holmes KK, Benson C, Pau A, Masur H. (2009) HIV-associated opportunistic infections - going, going, but not gone: the continued need for prevention and treatment guidelines. *Clin Infect Dis*, 48(5): 609-611.

Brown PO, Bowerman B, Varmus HE, Bishop JM. (1989) Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(8): 2525-2529.

Bukrinsky MI, Stanwick TL, Dempsey MP, Stevenson M. (1991) Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science*, 254(5030): 423-427.

Burkinsky M, Sviridov D. (2006) Human immunodeficiency virus infection and macrophage cholesterol metabolism. *J Leukoc Biol*, 80(5): 1044-1051.

Butini L, De Fougerolles AR, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen DI, Morton M, Springer TA, Pantaleo G, Fauci AS. (1994) Intercellular adhesion molecules (ICAM)-1 ICAM-2 and ICAM-3 function as counter-receptors for lymphocyte function-associated molecule 1 in human immunodeficiency virus-mediated syncytia formation. *Eur J Immunol*, 24(9): 2191-2125.

Cardaba CM, Kerr JS, Mueller A. (2008) CCR5 internalisation and signalling have different dependence on membrane lipid raft integrity. *Cell Signal*, 20(9): 1687-1694.

Case K. (1986) Nomenclature: Human Immunodeficiency Virus. *Ann Intern Med*, 105(1): 133

CDC. (1981) *Pneumocystis pneumonia* - Los angeles. MMWR, 30(21): 1-3.

CDC. (1982) Update on Kaposi's sarcoma and opportunistic infections in previously healthy persons - United States. MMWR ,31: 294, 300-301.

Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. Cell, 89(2): 263-273.

Chen Z, Telfier P, Gettile A, Reed P, Zhang L, Ho DD, Marx PA. (1996) Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop. J Virol, 70(6): 3617-3627.

Clapham P, Nagy K, Cheingsong-Popov R, Exley M, Weiss RA. (1983) Productive infection and cell-free transmission of human T-cell leukemia virus in a non-lymphoid cell line. Science, 222: 1125-1127.

Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, ReyMA, Santos-Ferreire MO, Laurent AG, Dautet C, Katlama C, Rouzioux C. (1986) Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science, 233(4761): 343-346

Clerici M, Giorgi JV, Chou CC, Gudeman VK, Zack JA, Gupta P, Ho HN, Nishanian PG, Berzofsky JA, Shearer GM. (1992) Cell-mediated immune response to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in seronegative homosexual men with recent sexual exposure to HIV-1. J Infect Dis, 165(6): 1012-1019.

Cocci F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. (1995) Identification of RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. Science, 270(5243): 1811-1815.

Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF. (2011) Acute-HIV-1 Infection: Basic, clinical and public health perspectives. N Engl J Med, 364(20): 1943–1954



Cohn SK Jr, Weaver LT. (2006) The Black Death and AIDS: CCR5-Delta32 in genetics and history. *QJM*, 99(8): 497-503.

Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. (1997) Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J Exp Med*, 185(4): 621-628.

Conti L, Rainaldi G, Matarrese P, Varano B, Rivabene R, Columba S, Sato A, Belardelli F, Malorni W, Gessani S. (1998) The HIV-1 vpr Protein Acts as a Negative Regulator of Apoptosis in a Human Lymphoblastoid T Cell Line: Possible Implications for the Pathogenesis of AIDS. *J Exp Med*, 187(3): 403-413.

Cooper DA, Gold J, Maclean P, Donovan B, Finlayson R, Barnes TG, Michelmore HM, Brooke P, Penny R. (1985) Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet*, 1(8428): 537-540.

Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 312(5996): 763-767.

Desai M, Iyer G, Dikshit RK. (2012) Antiretroviral drugs: critical issues and recent advances. *Indian J Pharmacol*, 44(3): 228-298.

de Santis C, Robbioni P, Longhi R, Carrow E, Siccardi AG, Bretta A. (1996) Role of HLA class I in HIV type 1-induced syncytium formation. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 12(11): 1031-1040.

Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. (1996) Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, 238(6584): 661-666.

Deng HK, Unutmaz D, KewalRamani VN, Littman DR. (1997) Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature*, 388(6639): 296-300.

Elliott T, Neefjes J. (2006) The complex route to MHC class I-peptide complexes. *Cell*, 127(2): 249-251.

Elvin SJ, Williamson ED, Scott JC, Smith JN, Pérez De Lema G, Chilla S, Clapham P, Pfeffer K, Schlöndroff D, Luckow B. (2004) Evolutionary genetics: Ambiguous role of CCR5 in *Y. pestis* infection. *Nature*, 430(6998): 417.

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 272(5263): 872-877.

Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T, Monks C, Baba TW, Ruprecht RM, Kupfer A. (1995) Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat Med*, 1(2): 129-134.

Frost SD, Dumaurier MJ, Wain-Hobson S, Brown AJ. (2001) Genetic drift and within-host metapopulation dynamics of HIV-1 infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98(12): 6975–6980.

Gallina A, Hanley TM, Mandel R, Trahey M, Broder CC, Viglianti GA, Ryser HJ. (2002) Inhibitors of protein-disulfide isomerase prevent cleavage of disulfide bonds in receptor-bound glycoprotein 120 and prevent HIV-1 entry. *J Biol Chem*, 277(52): 50579-50588.

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, White G, Foster P, Markham PD. (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk from AIDS. *Science*, 224 (4648): 500-503.

Galvani AP, Slatkin M. (2003) Evaluating plague and smallpox as historical selective pressures for the CCR5-Δ32 HIV-resistance allele. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(25): 15276-15279.

Gillett JP, Calcagno AM, Varma S, Marino M, Green LJ, Vora MI, Patel C, Orina JN, Eliseeva TA, Singal V, Padmanabhan R, Davidson B, Ganapathi R, Sood AK, Rueda BR, Ambudkar SV, Gottesman MM. (2011) Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(46): 18708-18713.

Glass WG, McDermott DH, Lim JK, Lekhong S, Yu SF, Frank WA, Pape J, Cheshier RC, Murphy PM. (2006) CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection. *J Exp Med*, 203(1): 35-40.

Gray ES, Moore PL, Choge IA, Decker JM, Bibollet-Ruche F, Li H, Leseka N, Treurnicht F, Mlisana K, Shaw GM, Karim SS, Williamson C, Morris L, CAPRISA 002 Study Team. (2007) Neutralizing antibody responses in acute human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. *J Virol*, 81(12): 6187-6196.

Gruber MF, Webb DS, Gerrard TL, Motowski HS, Vujcic L, Golding H. (1991) Re-evaluation of the involvement of the adhesion molecules ICAM-1/LFA-1 in syncytia formation of HIV-1-infected subclones of a CEM T-cell leukemic line. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 7(1): 45-53.

Hammer SM, Katzenstein DA, Hughes MD, Gundacker H, Schooley RT, Haubrich RH, Henry WK, Lederman MM, Phair JP, Niu M, Hirsch MS, Merigan TC. (1996) A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. *AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team. N Engl J Med*, 335(15):1081-1090.

Hatahet F, Ruddock LW. (2007) Substrate recognition by the protein disulfide isomerases. *FEBS J*, 274(20): 5223-5234.

Herbeuval JP, Boasso A, Grivel JC, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, Chougnnet C, Lifson JD, Shearer GM. (2005) TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1 infected patients and its *in vitro* production by antigen-presenting cells. *Blood*, 105(6): 2458-2464.

Horváth A, Beck Z, Bardos TJ, Dunn JA, Aradi J. (2006) Effect of the extent of thiolation and introduction of phosphorothioate internucleotide linkages on anti-HIV activity of Suligovir [(s<sup>4</sup>dU)<sub>35</sub>]. *Bioorg Med Chem Lett*, 16(20): 5321-5323.

Horváth A, Tökés S, Hartman T, Watson K, Turpin JA, Buckheit RW, Sebestyén Z, Szöllősi J, Benkő I, Bardos TJ, Dunn JA, Fésüs L, Tóth FD, Aradi J. (2005) Potent inhibition of HIV-1 entry by Suligovir (s<sup>4</sup>dU)<sub>35</sub>. *Virology*, 334(2): 214-223.

Hoffsohm BG, Kaplan A, Letso R, Schmid RS, Turmel GJ, Lo DC, Stockwell BR. (2010) Inhibitors of protein disulfide isomerase suppress apoptosis induced by misfolded proteins. *Nat Chem Biol*, 6(12): 900-906.

Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müssig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kücherer C, Blau O, Blau IW, Hofmann WK, Tiel E. (2009) Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, 360(7): 692-698.

Jármy G, Heinkelein M, Weissbrich B, Jassoy C, Rethwilm A. (2001) Phenotypic analysis of the sensitivity of HIV-1 to inhibitors of the reverse transcriptase, protease, and integrase using a self-inactivating virus vector system. *J Med Virol*, 64(3): 223-231.

Jiao Y, Fu JL, Xing S, Fu B, Zhang Z, Shi M, Wang X, Zhang J, Jin L, Kang F, Wu H, Wang F. (2009) The decrease of regulatory T cells correlates with excessive activation and apoptosis of CD8<sup>+</sup> T cells in HIV-1-infected typical progressors, but not in long-term non-progressors. *Immunology*, 128(10): e366-e375.

Johnson JA, Li JF, Wei X, Lipscomb J, Irlbeck D, Craig C, Smith A, Bennett DE, Monsour M, Sanstorm P, Lanier ER, Heneine W. (2008) Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naïve populations and associate with reduced treatment efficacy. *PloS Med*, 5(7): e158.

Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). AIDS epidemic update (2000)

Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). AIDS epidemic update (2013)

Jowett JB, Planelles V, Poon B, Shah NP, Chen ML, Chen IS. (1995) The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol*, 69(10): 6304-6313

Juhász E, Béres J, Kanizsai S, Nagy K. (2012) The Consequence of a Founder Effect: CCR5-Δ32, CCR2-64I and SDF1-3'A Polymorphism in Vlach Gypsy Population in Hungary. *Pathol Oncol Res*, 18(2): 177-182.

Juhász E, Ghidán A, Kemény B, Nagy K. (2008) Emergence of antiretroviral drug resistance in therapy-naive HIV infected patients in Hungary. *Acta Microbiol. Immunol. Hung*, 55(4): 383-394

Jung AC, Paauw DS. (1998) Diagnosing HIV-related disease: using the CD4 count as a guide. *J Gen Intern Med*, 13(2): 131-136.

Kahn O, Walker BD. (1998) Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Eng J Med*, 339(1): 33-39.

Kanizsai Sz. (2012) Lentivírus-konstrukciók a géntechnológiában és a kutatásban. Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Mezőgazdasági Biotechnológus MSc Szak

Kanizsai S, Ghidán Á, Ongrádi J, Nagy K. (2012) Antiretroviral effect of 4-thio-uridylylate against human immunodeficiency virus type 1. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 59(4): 499-510.

Kanizsai S, Ghidán Á, Újhelyi E, Bánhegyi D, Nagy K. (2010) Monitoring of drug resistance in therapy-naive patients and detection of African HIV subtypes in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 57(1): 55-68.

Kanizsai S, Ongrádi J, Aradi J, Nagy K. (2014) Thiolated pyrimidine derivatives may interfere thiol groups concentrated at lipid rafts of HIV-1 infected cells. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 61(4): 447-458.

Kaposi M. (1872) Idiopathisches Multiples Pigmentsarkom der Haut. Újra kiadva: *Archives of dermatology and syphilology* 2007; 48(2): 265-273

Kaul M, Garden GA, Lipton SA. (2001) Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature*, 410(6831): 988-994.

Keele B, Jones JH, Terio KA, Estes JD, Rudicell RS, Wilson ML, Li Y, Learn GH, Beasley M, Schumacher-Stankey J, Worblewski E, Mosser A, Raphael J, Kamenya S, Lonsdorf EV, Travis DA, Miengyea T, Kinsel MJ, Else JG, Silvestri G, Godall J, Sharp PM, Shaw GM, Pusey AE, Hahn B. (2009) Increased mortality and AIDS-like immunopathology in wild chimpanzees infected with SIVcpz. *Nature*, 460(7254): 515-519.

Kemény B, Nagy K, Horváth A. (1998) DNA polymorphism of HIV coreceptor CCR5 gene in HIV infected patients in general population. *Journal of Dermatological Science* 131: (17) p. 16. 1 p.

Kemény B, Nagy K. Horváth A. (2000): CCR5 and SDF1 Gene Polymorphism in HIV-infected and Healthy Individuals in Hungary. *Magyar Venereológiai Archivum*. IV. 89-92.

Krakower DS, Jain S, Mayer KH. (2015) Antiretrovirals for Primary HIV Prevention: the Current Status of Pre- and Post-exposure Prophylaxis. *Curr HIV/AIDS Rep*, 12(1): 127-138.

Lambda Legal - *People v. 49 West 12 Tenants Corp.*, Sup. Ct N.Y. Country, No 43604/83 Aug. 1984; NGRA - [http://www.lambdalegal.org/sites/default/files/publications/downloads/impact\\_201102\\_positive-history.pdf](http://www.lambdalegal.org/sites/default/files/publications/downloads/impact_201102_positive-history.pdf)

Lawrence DA, Song R, Weber P. (1996) Surface thiols of human lymphocytes and their changes after in vitro and in vivo activation. *J Leukoc Biol*, 60(5): 611-618.

Lemey P, Pybus OG, Wang B, Saksena NK, Salemi M, Vandamme AM. (2003) Tracing the origine of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad USA*, 100(11): 6588-6592.

Lichterfeld M, Yu XG, Waring MT, Mui SK, Johnson MN, Cohen D, Addo MM, Zauders J, Alter G Pae E, Strick D, Allen TM, Rosenberg ES, Walker BD, Altfeld M. (2004) HIV-1-specific cytotoxicity is preferentially mediated by a subset of CD8(+) T cells producing both interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Blood*, 104(2): 487-494.

Lifson JD, Feinberg MB, Reyes GR, Rabin L, Banapour B, Chakrabarti S, Moss B, Wong-Staal F, Steiner KS, Engelman EG. (1986) Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature*, 323(6090): 725-728.

Liu SL, Schacker T, Musey L, Shriner D, McElrath MJ, Corey L, Mullins JI. (1997) Divergent patterns of progression to AIDS after infection from the same source: HIV type 1 evolution and antiviral responses. *J Virol*, 6: 4284-4295.

López de Victoria A, Kieslich CH, Rizos AK, Krambovits E, Morikis D. (2012) Clustering HIV-1 Subtypes Based on gp120 V3 Loop electrostatic properties. *BMC Biophys*, 5:3.

Lucotte G, Mercier G. (1998) Distribution of the CCR5 gene 32-bp deletion in Europe. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 19(2): 174-177.

Lucotte G, Smets P. (2003) CCR5-Delta32 allele frequencies in Ashkenazi Jews. *Genet Test*, 7(4): 333-337.

Ly TD, Ebel A, Faucher V, Fihman V, Laperche S. (2007) Could the new HIV combined p24 antigen and antibody assays replace p24 antigen specific assays? *J Virol Methods*, 143(1): 86-94.

Maggi E, Macchia D, Parronchi P, Mazzetti M, Ravina A, Milo D, Romagnani S. (1987) Reduced production of interleukin 2 and interferon-gamma and enhanced helper activity for IgG synthesis by cloned CD4+ T cells from patients with AIDS. *Eur J Immunol*, 17(12): 1685-1690.

Marcus R, Kay K, Mann JM. (1989) Transmission of human Immunodeficiency virus (HIV) in health-care settings worldwide. *Bull World Health Organ*, 67(5): 577-582.

Marx PA. (2005) Unsolved questions over the Origin of HIV and AIDS. *Journal of Virology*, 71(1): 15-20.

Mas A, Soriano V, Gutiérrez M, Fumanal F, Alonso A, González-Lahoz J. (1997) Reliability of a new recombinant immunoblot assay (RIBA HIV-1/HIV-2 SIA) as a supplemental (confirmatory) test for HIV-1 and HIV-2 infections. *Transfus Sci*, 18(1): 63-69.

Matthias LJ, Azimi I, Tabrett CA, Hogg PJ. (2010) Reduced monomeric CD4 is the preferred receptor for HIV. *J Biol Chem*, 285(52): 40793-40799.

Mazzoli S, Trabaironi D, Caputo SL, Piconi S, Blé C, Meacci F, Ruzzante S, Salvi A, Semplici F, Longhi R, Fusi ML, Tofani N, Biasin M, Villa ML, Mazzotta F, Clerici M.



(1997) HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. *Nature Medicine* 3, 1250-1257.

McGovern SL, Caselli E, Grigorieff N, Shoichet BK. (2002) A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. *J Med Chem*, 45(8):1712-1722.

McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes B. (2010) The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature Rev Immunol*, 10, 11-23.

Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. (1996) Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*, 272(5265): 1167-1170.

Mitra D, Steiner M, Lynch DH, Staiano-Coico L, Laurence J. (1996) HIV-1 upregulates Fas ligand expression in CD4+ T cells *in vitro* and *in vivo*: association with Fas-mediated apoptosis and modulation by aurointricarboxylic acid. *Immunology*, 87(4): 581-585.

Nabel G, Baltimore D. (1987) An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cell. *Nature*, 326(6114): 711-713.

Nagy K, Albert J, Bánhegyi D. (1988) Humán immunodeficiencia vírus izolálása magyar AIDS és ARC betegekből. *Laboratóriumi diagnosztika*, XV/4: 213-216

Nagy K, Albert J, Bánhegyi D, Várnai F. (1990): Humán immunodeficiencia vírus izolálása magyar AIDS és ARC betegekből. *Orv. Hetilap*, 131: 895-898

Nagy K, Barabás É, Várkonyi A, Horváth A. (1996) Determination of HIV-1 Subtypes in Hungary by Synthetic Peptides Representing the V3 loop of env. *Pathol Oncol Res*, 2(4): 268-271.

Nagy K, Clapham P, Weiss RA. (1983) Receptors and antibodies to envelope antigens. *Leukemia Reviews International (Advances in Comparative Leukemia Research)* (M.A. Rich, ed.), 107.

Nagy K, Young M, Baboonian C, Merson J, Whittle P, Oroszlán S. (1994) Antiviral activity of Human immunodeficiency virus type-1 protease inhibitors in a single-cycle of infection evidence for a role of protease in the early phase. *J Virol*, 68(2): 757-765.

Narita T, Yamaguchi Y, Yano K, Sugimoto S, Chanarat S, Wada T, Kim DK, Hasegawa J, Omori M, Inukai N Endoh M, Yamada T, Handa H. (2003) Human transcription elongation factor NELF: identification of novel subunits and reconstitution of the functionally active complex. *Mol Cell Biol*, 23(6): 1863-1873.

Novembre J, Galvani AP, Slatkin M. (2005) The Geographic Spread of the CCR5  $\Delta$ 32 HIV Resistance Allele. *PLoS Biol*, 3(11): e339.

Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwart O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. (1996) The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell -line-adapted HIV-1. *Nature*, 382(6594): 833-835.

Parades R, Lalama CM Ribaldo HJ, Schackman BR, Shikuma C, Giguel F, Meyer WA 3rd, Johnson VA, Fiscus SA, D'Aquila RT, Gulick RM, Kuritzkes DR, AIDS Clinical Trials Group (ACTG) A5095 Study Team. (2010) Pre-existing minority drug-resistant HIV-1 variants, adherence, and risk of antiretroviral treatment failure. *J Infect Dis*, 201(5): 662-671.

Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. (1996) HIV-1 dynamics *in vivo*: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*, 271(5255): 1582-1586.

Peter F. (1998) HIV nef: the mother of all evil? *Immunity*, 9(4): 433-437.

Pham TN, Lukhele S, Hajjar F, Routy JP, Cohen ÉA. (2014) HIV Nef and Vpu protect HIV-infected CD4<sup>+</sup> T cells from antibody-mediated cell lysis through down-modulation of CD4 and BST2. *Retrovirology*, 11:15

Piller SC, Caly L, Jans DA. (2003) Nuclear import of the pre-integration complex (PIC): the Achilles heel of HIV? *Curr Drug Targets*, 4(5): 409-429.

Pion M, Granelli-Piperno A, Mangeat B, Stalder R, Correa R, Steinman RM, Oquet V. (2006) APOBEC3G/3f mediates intrinsic resistance of monocyte derived dendritic cells to HIV-1 Infection. *J Exp Med*, 303: 2887-2893

Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC. (2004) The causes and consequences of HIV evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5, 52-61.

Rittner K, Churcher MJ, Gait MJ, Karn J. (1995) The human immunodeficiency virus long terminal repeat includes a specialised initiator element which is required for Tat-responsive transcription. *J Mol Biol*, 248(3): 562-580.

Robb ML, Rerks-Ngarm S, Nitayaphan S, Pitisuttithum P, Kaewkungwal J, Kunasaol P, Khamboonruang C, Thongcharoen P, Morgan P, Benenson M, Paris RM, Chiu J, Adams E, Francis D, Gurunathan S, Tartaglia J, Gilbert P, Stablein D, Michael NL, Kim JH. (2012) Risk behaviour and time as covariates for efficacy of the HIV vaccine regimen ALVAC-HIV (vCP1521) and AIDSVAX B/E: a post-hoc analysis of the Thai phase 3 efficacy trial RV 144. *Lancet Infect Dis*, 12(7): 531-537.

Root MJ, Kay MS, Kim PS. (2001) Protein design of an HIV-1 entry inhibitor. *Science*, 291(5505): 884-888.

Rowland-Jones SL, Dong T, Fowke R, Kimani J, Krausa P, Newell H, Blanchard T, Ariyoshi K, Oyugi J, Ngugi E, Bwayo J, MacDonald KS, McMichael AJ, Plummer FA. (1998) Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi. *J Clin Invest*, 102(9): 1758-1765.

Ryser HJ, Levy EM, Mandel R, DiSciullo GJ. (1994) Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(10): 4559-4563.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(12): 5463-5467.

Saxeena BB, Han YA, Fu D, Ratham P, Shing M, Laurence J, Lerner S. (2009) Sustained release of microbicides by newly engineered vaginal rings. *AIDS*, 23(8): 917-922.

Shah SN, Smith EE, Obonyo OO, Kain KC, Bloland PB, Slutsker L, Hamel MJ. (2006) HIV immunosuppression and antimalarial efficacy: sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated malaria in HIV-infected adults in Siaya, Kenya. *J Infect Dis*, 194(11): 1519-1528.

Sharp PM, Baile E, Robertson DL, Gao F, Hahn BH. (1999) Origins and evolution of AIDS viruses. *Biol Bull*, 196(3): 338-342.

Simons K, Ikonen E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387(6633): 569-572.

Simon V, Ho DD, Abdool Karim Q. (2006) HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet*, 368(9534): 489-504.

Simmons G, Clapham PR, Picard L, Offord RE, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Buser R, Wells TN, Prodfoot AE. (1997) Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science*, 276(5310): 276-279.

Skrabal K, Low AJ, Dong W, Sing T, Cheung PK, Mammano F, Harrigan PR. (2007) Determining human immunodeficiency virus coreceptor use in a clinical setting: degree

of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatic model. *J Clin Microbiol*, 45(2): 279-284.

Stahl RE, Friedman-Kien A, Dubin R, et al. (1982) Immunologic abnormalities in homosexual men. Relationship with Kaposi's sarcoma. *Am J Med*, 73: 171-178

Stanchev TS, Paciga M, Lankford CR, Schwartzkopff F, Broder CC, Clouse KA. (2012) Cell-type specific requirements for thiol/disulfide exchange during HIV-1 entry and infection. *Retrovirology*, 9: 97.

Stephens JC, Reich DE, Goldstein DB, Shin HD, Smith MW, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Allikments R, Schriml L, Gerrard B, Malasky M, Ramos MD, Morlot S, Tzetis M, Oddoux C, di Giovine FS, Nasioulas G, Chandler D, Aseey M, Hanson M, Kalaydjieva L, Glavac D, Gasparini P, Kanavakis E, Clausters M, Kambouris M, Ostrer H, Duff G, Baranov V, Sibul H, Metspalu A, Goldman D, Martin N, Duffy D, Schmidtke J, Estivilli X, O'Brien SJ, Dean M. (1998) Dating the origin of the CCR-Delta 32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *Am J Hum Genet*, 62(6): 1507-1515.

Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J. (2004) The cytoplasmic body component TRIM5 $\alpha$  restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*, 427(6977): 848-853.

Tebas P, Stein D, Tang WW, , M.D., Frank I, Wang SQ, Lee G, Spratt SK, Surosky RT, Giedlin MA, Nichol G, Holmes MC, Gregory PD, Ando DG, Kalos M, Collman RG, Binder-Scholl G, Plesa G, Hwang W, Levine BL, June CH. (2014) Gene Editing of CCR5 in Autologous CD4 T Cells of Persons Infected with HIV. *N Engl J Med*, 370: 901-910.

Temin HM, Mizutani S. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226(5252): 1211-1213.

Tóké S, Aradi J. (1996) (s<sup>4</sup>dU)<sub>35</sub> : a novel highly potent oligonucleotide inhibitor of the human immunodeficiency virus type1 reverse transcriptase. FEBS lett, 396(1): 43-46.

van 't Wout AB, Swain JV, Schindler M, Rao U, Pathmajeyan MS, Mullins JI, Kirchoff F. (2005) Nef induces multiple genes involved in cholesterol sythesis and uptake in human immunodeficiency virus type 1-infected T cells. J Virol, 79(15): 10053-10058.

Vanderckhove LP, Wensing AM, Kaiser R, Brun-Vézinet F, Clotet B, De Luca A, Dressler S, Garcia F, GerettiAM, Klimkait T, Korn K, Masquelier B, Perno CF, Schapiro JM, Soriano V, Sönnenborg A, Vandamme AM, Verhofstede C, Walter H, Zazzi M, Boucher CA; European Consensus Group on clinical management of tropism testing. European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing. Lancet Infect Dis, 11(5): 394-407.

Winkler C, Modi W, Smith MW, Nelson GW, WuX, Carrington M, Dean M, Honjo T, Tashiro K, Yabe D, Buchbinder S, Vittinghoff E, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Detels R, Donfield S, Willoughby A, Gomperts E, Vlahov D, Phair J, O'Brien SJ. (1998) Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemocine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). Science, 279(5349): 389-393.

Weber B, Fall EH, Berger A, Doerr HW. (1998) Reduction of diagnostic window by new fourth-generation human immunodeficiency virus screening assays. J Clin Microbiol, 36(8): 2235-2239.

Weiss RA. (2001) Gulliver's travels to HIVland. Nature, 410(6831): 963-967.

Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE, Haselkorn T, Kuntsman K, Bunce M, Muyembe DE, Kabongo JM, Kalengayi RM, Van Marck E, Gilber TP, Wolinsky S. (2008) Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. Nature, 455(7213): 661-664.

Yang Y, Tikhonov I, Ruckwardt TJ, Djavani M, Zapata JC, Pauza CD, Salvato MS. (2003) Monocytes treated with human immunodeficiency virus Tat kill uninfected CD4(+) cells by a tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand-mediated mechanism. *J Virol*, 77(12): 6700-6708.

Yates NL, Liao HX, Fong Y, deCamp A, Vandergrift NA, Williams WT, Alam SM, Ferrari G, Yang ZY, Seaton KE, Berman PW, Alpert MD, Evans DT, O'Connell RJ, Francis D, Singali F, Lee C, Nitayaphan S, Rerks-Ngram S, Kaewkungwai J, Pitisuttithum P, Tartaglia J, Pinter A, Zolla-Pazner S, Gilbert PB, Nabel GJ, Michael NL, Kim JH, Montefiori DC, Haynes BF, Tomaras GD. (2014) Vaccine-induced Env V1-V2 IgG3 correlates with lower HIV-1 infection risk and declines soon after vaccination. *Sci Transl Med*, 6(228): 228ra39.

Zauli G, Gibellini D, Secchiero P, Dutartre H, Olive D, Capitani S, Collette Y. (1999) Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein sensitizes CD4(+) T lymphoid cells to apoptosis via functional upregulation of the CD95/CD95 ligand pathway. *Blood*, 93(3): 1000-1010.

Zeng YH, Plemenitas A, Fielding CJ, Peterlin BM. (2003) Nef increases the synthesis of and transports cholesterol to lipid rafts and HIV-1 progeni virions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(14): 8460-8465.

Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, Sharp PM, Ho DD. (1998) An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature*, 391(6667): 594-597.

**Webforrások [W]:**

1. <http://depts.washington.edu/hiv aids/arvr x/case2/discussion.html>
2. [http://orvos-tudomany.blog.hu/2009/08/05/a\\_hiv\\_virus](http://orvos-tudomany.blog.hu/2009/08/05/a_hiv_virus)
3. <http://uhs.berkeley.edu/home/news/worldaidsday09.shtml>
4. [www.addgene.org/vector-database/2093/](http://www.addgene.org/vector-database/2093/)
5. [www.aidsreagent.org/reagentdetail.cfm?t=cell\\_lines&id=31](http://www.aidsreagent.org/reagentdetail.cfm?t=cell_lines&id=31)
6. [www.aidsreagent.org/pdf\\_images/1470\\_001.pdf](http://www.aidsreagent.org/pdf_images/1470_001.pdf)
7. [www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/aids/treatment.html](http://www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/aids/treatment.html)
8. [www.dailymail.co.uk/news/article-2701217/Melbourne-AIDS-summit-holds-MH17-vigil.html](http://www.dailymail.co.uk/news/article-2701217/Melbourne-AIDS-summit-holds-MH17-vigil.html)
9. [www.gsid.org/our\\_programs\\_current\\_trials.html](http://www.gsid.org/our_programs_current_trials.html)
10. [www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html)
11. [www.one.org/us/2012/06/22/explainer-a-brief-history-of-the-international-aids-conference/](http://www.one.org/us/2012/06/22/explainer-a-brief-history-of-the-international-aids-conference/)
12. [www.pbs.org/wgbh/pages/frontline/aids/atlas/clade.html](http://www.pbs.org/wgbh/pages/frontline/aids/atlas/clade.html)
13. [www.unaids.org/sites/default/files/en/media/unaids/contentassets/documents/factsheet/2014/20140716\\_FactSheet\\_en.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/en/media/unaids/contentassets/documents/factsheet/2014/20140716_FactSheet_en.pdf)
14. [www.visualaids.org/projects/detail/the-red-ribbon-project](http://www.visualaids.org/projects/detail/the-red-ribbon-project)



## 11. Saját publikációk jegyzéke

### 11.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

Juhász E, Béres J, Kanizsai S, Nagy K. (2012) The Consequence of a Founder Effect: CCR5-Δ32, CCR2-64I and SDF1-3'A Polymorphism in Vlach Gypsy Population in Hungary. *Pathol Oncol Res*, 18(2): 177-182.

IF.: 1,555

Kanizsai S, Ghidán Á, Újhelyi E, Bánhegyi D, Nagy K. (2010) Monitoring of drug resistance in therapy-naive patients and detection of African HIV subtypes in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 57(1): 55-68.

IF.: 0,625

Kanizsai S, Ghidán Á, Ongrádi J, Nagy K. (2012) Antiretroviral effect of 4-thio-uridylylate against human immunodeficiency virus type 1. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 59(4): 499-510.

IF.: 0,646

Kanizsai S, Ongrádi J, Aradi J, Nagy K. (2014) Thiolated pyrimidine derivatives may interfere thiol groups concentrated at lipid rafts of HIV-1 infected cells. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 61(4) 447-458.

IF.: 0,78

## 11.2. Egyéb témában megjelent közlemények

Talha E, Juhász E, Kanizsai S, Nagy K. (2009) Molecular detection of *T. pallidum* by PCR in seronegative cases. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 56(2): 181-189.

Vajna B, Kanizsai S, Kéki Z, Márialigeti K, Schumann P, Tóth EM. (2011) *Thermus composti* sp. nov., isolated from oyster mushroom compost. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62(Pt7): 1486-90.

IF.: 2,112

## 12. Köszönetnyilvánítás

Minden teljesítmény sokak hozzájárulásával születik.

Ezúton szeretném kifejezni köszönetem Dr. Nagy Károly Professzor Úrnak, témavezetőmnek, a Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézete egyetemi tanárának, hogy lehetőséget biztosított munkám sikeres elvégzéséhez és dolgozatom megírásához. Köszönöm segítőkész támogatását, tanításait és a kísérleti munka során felvetődött gyakorlati problémák megoldásában nyújtott segítségét.

Hálás vagyok volt kolleganőmnek, Dr. Juhász Emesének, aki nélkülözhetetlen szakmai tanácsaival, önzetlen támogatásával alapvetően hozzájárult szakmai fejlődésemmhez és sikeres munkámhoz.

Köszönettel tartozom Kapás Mónika szakasszisztensnek és Fekete Gábor informatikusnak a munkám során biztosított kitartó együttműködésért, valamint a Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetében mindazon munkatársamnak, akik kutatómunkámban és annak egyes szakaszaiban segítségemre voltak.

Köszönettel tartozom Dr. Aradi János Tanár Úrnak, a Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetéből, hogy rendelkezésünkre bocsátotta a kísérleteink alapjául szolgáló vegyületeket, amelyek antiretrovirális hatását elemezhettük.

Köszönetet mondok Dr. Újhelyi Eszternek és Dr. Sárvári Csillának, valamint az Egyesített Szent István és Szent László Kórház Immunológiai Laboratórium munkatársainak a terápia-naíve HIV fertőzöttek mintáinak elemzésében nyújtott közreműködésért.

A vizsgálatok az OTKA 81367, valamint részben az OTKA 48917 kutatási pályázatok támogatásával valósultak meg.

Egészségügyi Tudományos Tanács TUKEB: 78/2000