

# Humán immundeficiencia vírus korai replikációs ciklusának molekuláris elemzése

Doktori tézisek

**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

## Bevezetés

Az elmúlt immár több, mint 30 év egyik legpusztítóbb járványát okozó HIV a becslések szerint napjainkig körülbelül 39 millió ember halálát okozta. Évente közel 3 millió új fertőzést regisztrálnak. Az AIDS a HIV (human immunodeficiency virus) által kiváltott tünetegyüttes.

1983-ban, két évvel az AIDS leírását követően citopátiás hatást kiváltó retrovírust izoláltak a betegekből, valamint krónikus limfadenopátiában szenvedőktől származó mintákból. 1984 júniusában Robert Gallo és Luc Montagnier egy közös konferencián egyetértettek, hogy Dr. Gallo által felfedezett HTLV-III és Dr. Montagnier által megismert LAV egyezők és valószínűsíthető, hogy az AIDS kórokozói. Az International Committee on the Taxonomy of Viruses 1986 májusában hivatalosan is elfogadta, hogy a vírus, ami az AIDS-et okozza a HIV. Az antiretrovirális terápia megjelenésével a HIV fertőzöttek várható élettartama napjainkban szinte megegyezik a nem fertőzöttekével, mégis elengedhetetlen a vírus folyton változó természetének pontosabb megismerése. A vírus nagyon gyors replikációs dinamizmussal bír, generációs ideje körülbelül 2,5 nap, naponta  $10^{10}$ - $10^{12}$  új virion képződésére van lehetőség. A nagyfokú változékonyság leginkább a hipervariábilis régiókban, legfőképp a burokproteinek kódoló *env* génben figyelhető meg. Az egyik legfontosabb, replikációért felelős enzim, a reverz transzkriptáz körülbelül 2000 bázispáronként előforduló, replikációs hibát követ el szaporodási ciklusonként. Antigén csuszamlás, az úgynevezett "genetic shift" is bekövetkezhet a gazdasejten belüli szaporodási folyamatok során. A további hibalehetőségek a gazdasejt eredetű RNS polimeráz II általi transzkripció folyamatoknál történhetnek meg. 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.

A genotipizáló assay segítségével könnyen kimutathatók a *pol* és *pr* génben előforduló mutációk. A megnövekedett számú mutációk ellenállóvá tehetik a vírust a

kombinációs terápiával szemben, elősegítve az AIDS gyorsabb kialakulását klinikai és közegészségügyi következményeket vonva maga után.

Ahhoz, hogy a HIV bejusson a gazdasejtbe, a sejtfelszíni CD4 receptor mellett szükség van kofaktorokra. Azok a HIV izolátumok, amelyek a makrofág/monocita kultúrákban szaporíthatók jól, az úgynevezett monocitotróp (M-tróp) HIV izolátumok. Az M-tróp vírusok esetében a kérdésezes koreceptor a CCR5. A CXCR4-es koreceptor nagy jelentőséggel bír a T-sejt kultúrákban jól szaporodó (T-tróp) HIV izolátumok korai replikációs folyamataiban. 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, CCR3, CCR8, CCR9, STRL (Bonzo), Gpr 15 (Bob), Gpr 1, APJ és ChemR23.

A HIV-1 fertőzés *in vitro* és *in vivo* is sejtprolifercióos hatással van a T-limfocitákra. 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 -SH antioxidáns hatással bírhat, sejtnövekedést serkentő szignál transzdukciós folyamatokban és az apoptózis folyamataiban is szerepet játszhat. A HIV a célsejtbe jutáskor és a bimbózáskor a lipid raftokban gazdag régióknál létesíthet membránkapcsolatot a gazdasejttel. A kísérleteinkben használt politiolált oligonukleotidok nemcsak redox folyamatokat befolyásoló hatással vannak a sejtekre, így interakciókat létesítenek a sejtfelszíni -SH (tiol) csoportokkal is, hanem a HIV burkán lévő gp120 molekulában levő -SH csoportokra is hatnak.

A kísérleti vegyületeink a sejtfelszíni -SH csoportok diszulfid kötésekkel interferáló hatása a HIV gazdasejtbe jutását gátló folyamatok egyike lehet. A tioredoxin és a PDI gátlásával a CD4 receptor, valamint a gp120 molekula redox folyamatainak befolyásolásával fejtik ki hatásukat. A kísérleteink során vizsgált politiolált oligonukleotidok további fejlesztések, kutatások után a jövőben alapját képezhetik HIV ellenes terápiás szereknek, a bejutást gátló, úgynevezett "*entry inhibitor*"-ok alapvegyületei lehetnek.

## Célkitűzés

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 sejtfelszíni fehérjék diszulfid kötéseinek módosulása által befolyásolt redox folyamatok megváltoztatják a HIV korai replikációs folyamatát, az Env-mediált fúziót.
- ❖ Szintetikus úton előállított poliotiolált 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 szereit 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?

## Módszerek

### 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, eredetük a NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (Bethesda, MD). A P4-CCR5 transzfektált HeLaCD4-LTR- $\beta$ -gal sejt eredetű, a sejtek felszínükön hordozzák a CCR5 koreceptort, valamint genomjukban LTR szekvenciák között a *lacZ* gént. A 3T3.T4.CCR5 és 3T3.T4.CXCR4 egér fibroblaszt és a P4-CCR5 transzfektált humán fibroblaszt sejtvonalakat Dr Christian Jassoy bocsájtotta rendelkezésünkre (Institute of Virology, University of Leipzig, Faculty of Medicine, Leipzig, Germany). A sejtvonalakat DMEM, 10% FCS (fetal calf serum), 0,1% Penicillin/Streptomycin összetételű tápfolyadékban tartottuk fenn (Sigma-Aldrich). H9 és MT-2 sejtek fenntartására és szaporítására RPMI-1640 tápfolyadékot használtunk, 10% FCS, 0,1% Penicillin/Streptomycin hozzáadásával, valamint 2 mM L-glutaminnal kiegészítve (Sigma-Aldrich).

### 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). 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 szűrtük (Merck Millipore).

### HIV pszeudovirionok előállítása

A kiméra vektorok a pcDNA3.1 (Addgene) plazmid módosításával lettek létrehozva. A HIV burok proteinekét kódoló géneket hordozó plazmidok klinikai izolátumokból, illetve laboratóriumi törzsekből származó HIV *env* géneket hordoznak.

Ezáltal pEnvM-ad, CCR5-tróp burok glikoproteint kódoló gént, pEnvHXB2 CXCR4-tróp burok glikoproteint kódoló gént és pEnvM-ad/HXB2 dual-tróp burok glikoproteint kódoló gént tartalmazó plazmidok lettek kialakítva.

A HIV *gag-pol* géneket hordozó plazmidok a HIV gének mellett antibiotikum rezisztencia marker gént és riporter géneket is tartalmaznak, melyek LTR szekvenciák közé vannak ékelve. 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 plazmidok eredete: Institute of Virology, University of Leipzig, Faculty of Medicine, Leipzig, Germany)

A vektor konstrukciók ampicillin rezisztencia szelekciós marker génjének jelentősége a plazmidok kompetens DH5 $\alpha$  *E. coli* sejtekben történő felszaporításánál van. A plazmidok izolálását protokoll szerint a Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen) segítségével végeztük. Ezt követően HEK293T sejteket transzfektáltunk HIV *gag-pol* és riporter géneket tartalmazó, valamint *env* gént hordozó plazmid párokkal. A virionok összeépülésük után megjelentek a felülűszóban. 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 került kiválasztásra.

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

A sejtek kiültetése 24 lyukú tenyésztő lemezen sejtípustól 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. 24 óra elteltével a tápfolyadékot eltávolítottuk, majd 24 lyukú tenyésztőtálcáknál 150  $\mu$ l, 96 lyukú tenyésztőtálcáknál 25  $\mu$ l, friss tápfolyadékkal kiegészített térfogatban megtörtént a sejtek HIV-1<sub>III B</sub> vírus törzsszel, vagy HIV pszeudovirionokkal való fertőzése (5-20  $\mu$ l). 20  $\mu$ g/ml DEAE-dextrán mediálta vírus infekció 2 órás 37 °C-os inkubálása után 24 lyukú tenyésztőtálcáknál 1 ml, 96 lyukú tenyésztőtálcáknál 125  $\mu$ l végtérfogatra

egészítettük ki tápfolydékkal a tenyésztőtálcán a lyukakat. 48 óra további inkubációt követően vizsgálhattuk a vírus infektivitásának mértékét.

Kísérleteinkben politiolált oligonukleidok vírusfertőzést gátló hatását vizsgáltuk. Alkalmazásuk fél órával a vírusinfekciót megelőzően, vagy a fertőzéssel egyidőben, illetve más kísérletekben a fertőzést követő 30 perc múlva történt, 0,5-40 µg/ml koncentrációban.

### **Politolált oligonukleotidok antiretrovirális hatásának vizsgálata**

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), a kvantitatív Luciferáz assay segítségével valósultak meg. A vegyületek citotoxicitásának mérése a XTT assay szolgált.

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

A 4-tio-uridilát (UD29 fantázia nevű vegyület) a citidin 5'-monofoszfát H<sub>2</sub>S kezelésével lett előállítva. Az alapvegyület további kémiai módosításával kapott újabb hat oligonukleotid (UD29-new, UD30, UD30-new, UD31, MOD-94 és MOD-2012 néven jelölt) HIV fertőzést gátló hatását, valamint citotoxicitását vizsgáltuk. A vegyületek redox modifikációt idézhetnek elő -SH csoportokat tartalmazó molekulákban, gátolva a HIV gazdasejtbe jutását. A tiolált oligonukleotidokat Dr. Aradi János (Debreceni Egyetem) bocsájtotta rendelkezésünkre.

### **Szincícium indukciós és inhibíciós assay**

A sokmagvú óriássejtek sejtfüziók által jönnek létre, ami a sejtek pusztulásához vezethet. A HIV-1 korai replikációs ciklusának és a szincícium formációnak számos közös pontja fedezhető fel. Biológiailag aktív HIV-1<sub>IIIB</sub> és HIV pszeudovirionok szincícium formáló képességét vizsgáltuk H9 és MT-2 humán T-sejt vonalon.

A politolált-oligonukleotidok szincícium inhibíciós hatásának vizsgálata a vegyület különböző koncentrációinak (0,5-40 µg/ml) alkalmazása után történt. A kísérleteinkben a vegyületeket vírusinfekciót megelőző 30 perccel, a vírussal történt fertőzéssel egyidőben, illetve azt követő 30 perc múlva adtuk a sejtekhez. Kontrollként fertőzés nélküli kezelt és kezeletlen sejteket használtunk. 100x nagyítással, inverz mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a hatást (Motic AE31).

### **Kvantitatív p24 antigén assay**

A p24 antigén a HIV *gag* által kódolt protein. A p24 antigén teszt egy módosított ELISA technológia, amely a szendvics módszert egy végső fluorescens detektálással kombinálja. A fluoreszcencia intenzitása arányos a mintában levő p24 antigén koncentrációjával, mérése 450 nanométeren történik. A mérés végén a készülék a memóriájában tárolt kalibrációs görbe alapján automatikusan kiszámítja, majd kinyomtatja az eredményeket (VIDAS<sup>®</sup> HIV p24 II (p24), BioMérieux). HIV-1<sub>III<sub>B</sub></sub> p24 protein jelenlétét a fertőzött H9 és MT-2 sejtek felülúszóiból mutattuk ki.

### **Riporter gének kvantitatív mérése**

A β-galaktozidáz, a luciferáz vagy az enhanced green fluorescent protein (eGFP) génjének, mint riporter géneknek expresszációja kvantitatív módon detektálható. P4-CCR5 és HeLaCD4-LTR-βgal fertőzést követően a β-galaktozidáz enzim gén aktivitásának mérése a MAGI assay (Multinuclear activation of galactosidase inhibition) segítségével valósulhat meg. A transzfekciót követő 24 és 48 óra múlva vizsgálhatjuk a fertőzött sejtek jelenlétét, arányát. A luciferáz aktivitás relatív fluorescenciát mérve, luminométerrel történhet (Victor 3 Multilabel plate reader, Perkin Elmer) 3T3.T4.CCR5, 3T3.T4.CXCR4 és P4-CCR5 setvonalakon. Az eGFP, mint riporter gén alkalmazásakor a fertőződött sejtek zölden fluoreszkáltak az UV hatására.



## **$\beta$ -galaktozidáz enzimaktivitás indukciós és gátlási vizsgálata sejtenyészeten - 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 sejt kék színű lesz. A festés után inverz mikroszkóppal vizsgálhattuk a kékre színeződött sejteket. A MAGI assay egy érzékeny, végpont titráló módszer, amely alkalmas egyaránt HIV-1 és HIV-2 izolátumok vizsgálatára. A százalékos fertőzöttséget a festődött sejtek kvantitatív értékéből számítottuk ki a Hill analízis alapján.

A politiolált oligonukleotidok vizsgálata során a sejtek vírussal történt fertőzése előtt, vagy egy időben, illetve 30 perccel utána különböző koncentrációban (0,5-40  $\mu$ g/ml) adtuk a vegyületeket a sejtekhez. IC<sub>50</sub> és IC<sub>90</sub> értékeket a Hill analízis szerint számoltuk ki.

### **Kvantitatív Luciferáz assay**

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, 10% FCS, 0,1% Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich). A sejtek kiültetését követően, 24 óra múlva a sejteket CCR5-, CXCR4- és dual tróp típusú HIV pszeudovirionokkal fertőztük (5-10-20  $\mu$ l). A protokoll szerinti Luciferáz assay eredmények mérése luminométer segítségével történt (Victor3, Perkin Elmer).

A politiolált oligonukleotidok elemzése során a sejtek pszeudovirionokkal történt fertőzése előtt 30 perccel, vagy a fertőzéssel egyidőben, illetve 30 perccel a fertőzést követően 0,5-40  $\mu$ g/ml koncentrációban adtuk a vegyületeket a sejtekhez. Kontrollként politiolált oligonukleotidok nélküli, különböző dilúcióban alkalmazott pszeudovirionokkal fertőzött sejteket használtunk. RLU (relative luminescence unit) mérése a protokoll szerint történt.

## **Citotoxicitás mérése XTT assay segítségével**

Az XTT *in vitro* Toxicology Assay Kit (Sigma-Aldrich) segítségével az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáz aktivitását spektrofotométerrel mérhettük. P4-CCR5, HeLaCD4-LTR- $\beta$ gal, MT-2, H9 sejtvonalakon vizsgáltuk a vegyületeink citotoxikus hatását HIV-1<sub>IIB</sub> vírussal, illetve M-ad, HXB2/M-ad, valamint HXB2 típusú HIV pszeudovirionokkal (5-10-20  $\mu$ l) fertőzött és fertőzetlen sejteken. Kontrollként politiolált oligonukleotid kezelés nélküli, fertőzött és fertőzetlen sejteket használtunk.

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-Mthoxy-4-nitro5-sulphophenyl/-2H-terazolium-5-carboxyanilide inner salt), sárga színreakció kíséretében egy formazán származék alakul ki. IC<sub>50</sub> és IC<sub>90</sub> értékeket a Hill analízis alapján számoltuk ki. A további biostatistikai analíziseket a Student féle t-próba szerint értékeltük.

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

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

## **Fertőzöttek szérum mintái**

A HIV-1 teljes genotipizálását olyan páciensek mintáin végeztük, akik fertőzésüket külföldi partnereiktől kaphatták. A páciensek szűrése először ELISA 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 szeropozitív páciensek plazmája 14.300-1.630.000 HIV kópia/ml volt. Meghatározása a Roche Amplicor HIV-1 Monitor Assay segítségével történt.

A genom RT és PR kódoló régióinak analízise a Trugene HIV-1 Genotyping Kit és OpenGene DNA Sequencing System (Siemens) alkalmazásával történt. Az

antiretrovirális rezisztencia okai azokban a nyílt leolvasási keretekben létrejött mutációk, amelyek a terápiás célpontú fehérjéket kódolják.

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

A Trugene HIV-1 Genotyping Kit a HIV-1 proteáz (kodon 4-99) és reverz transzkriptáz (kodon 38-248) enzimeket kódoló szekvenciákat elemzi. A plazma vírus tartalmából ( $\geq 1000$  kópia) virális RNS lett kivonva, amiből a reverz transzkriptáz PCR segítségével amplifikáltuk a cDNS-t. A CLIP szekvencia termékek detektálása 6%-os poliakrilamid-urea-Tris-borate-EDTA gél elektroforézist (MicroCel™, Long-Reader Tower) követően 50 percig, 2 000 V-on való futtatás után UV fény segítségével történt.

### **Szekvencia elemzés**

OpenGene DNA Sequencing System a kapott szekvencia adatokat valós időben értékeli. A kijelzett elektroferogram mintázat lehetőséget teremt az értékesre.

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 szerekekkel való rezisztenciája.

### **HIV-1 szubtypus meghatározás**

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

## Eredmények

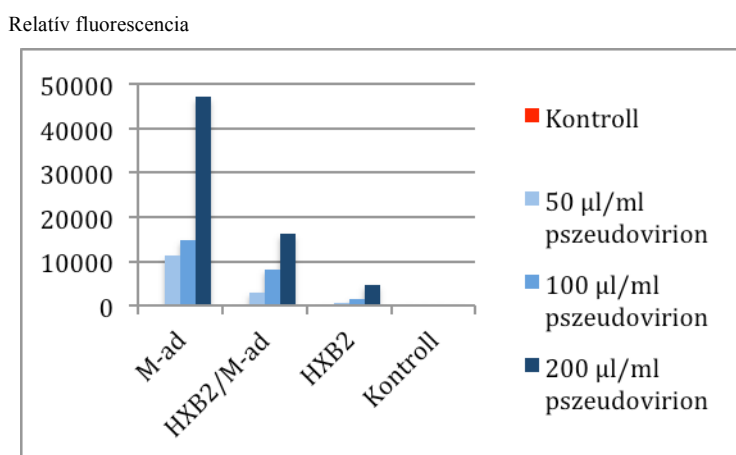
### Plazmid vektorok detektálása

A kompetens *DH $\alpha$*  *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 restrikciós enzimekkel történt.

### HIV pszeudovirionok előállítása és kimutatása

A HEK293T sejtvonalba integrálódott, virális szekvenciák segítik a plazmid vektorok expresszáldását, ezáltal a HIV pszeudovirionok összeépülését. A HEK293T sejtek felülúszójában jelen vannak a HIV pszeudovirionok. Releváns koreceptort hordozó sejtvonalak HIV pszeudovirionokkal történt fertőzése után az integrálódott és expresszáldott pszeudovírus mennyiségének kvantitatív meghatározásukra a luciferáz aktivitás mérésénél luminométert, eGFP esetén UV mikroszkópot, alkalmazhattuk. Az ábrán jól megfigyelhető a különböző tropizmussal rendelkező HIV pszeudovirionok arányosan megjelenő infektivitási mértéke a fertőzés után 48 órával. A mérés a luciferáz assay eredményét mutatja (1. ábra).



1. ábra. **Luciferáz assay eredménye.** A P4-CCR5 sejtek CCR5 koreceptort hordozó sejtek, melyekbe az M-ad típusú, R5-tróp pszeudovirionok jutottak be legnagyobb számban.

## A kísérleteinkben alkalmazott tiolált pirimidin vegyületek antiretrovirális hatása

A legmegfelelőbb eredményeket a fertőzést 30 perccel megelőző kezelések adták. Ezek a vegyületek a sejtek HIV-1<sub>IIIB</sub> és a HIV pszeudovirionokkal történő fertőzését, a bejutáshoz szükséges redox lépésekkel interferálva gátolják. Úgynevezett "entry inhibitor"-ként funkcionálnak.

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

HIV-1<sub>IIIB</sub> és HIV pszeudovirionokkal fertőzött H9 és MT-2 humán T-sejt vonalakon politiolált oligonukleotid vegyületek különböző koncentrációnak szincícium kialakulást gátló hatását vizsgáltuk. 30 perccel fertőzést megelőzően a politiolált oligonukleotidokkal való kezelés hatására az H9 és MT-2 sejteken a szincíciumok kialakulásának gátlása jelentős volt. A HIV-1<sub>IIIB</sub> fertőzött sejtek felülúszóiból a HIV p24 antigén mennyiségét kvantitatív módon detektálhattuk a HIV-1 p24 core antigén ELISA segítségével (MiniVIDAS<sup>®</sup>, BioMérieux, France).

## $\beta$ -galaktozidáz enzimaktivitás vizsgálata sejttenyészetben - a MAGI assay eredményei

Standard sejtalapú metodika, a MAGI assay segítségével a politiolált oligonukleotidjaink HIV-1<sub>IIIB</sub> antivirális aktivitását vizsgáltuk HeLaCD4-LTR- $\beta$ gal, P4-CCR5 sejtvonalakon. A gátlási IC<sub>50</sub> és IC<sub>90</sub> értékeket a Hill analízis alapján számoltuk ki. Az eredmények dóziszfüggőek voltak (1. táblázat, 2. táblázat).

### 1. táblázat. UD29 politiolált oligonukleotid antivirális aktivitása

	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	TC <sub>50</sub> <sup>b</sup>	TF <sup>c</sup>
Sejt fúzió	11,7 $\mu$ g/ml	>200	>17
Vírus infekció <sup>d</sup>	4,75 $\mu$ g/ml	>200 >42	n/a

<sup>a</sup>50% HIV infekció gátlás

<sup>b</sup>50% sejtek életképessége

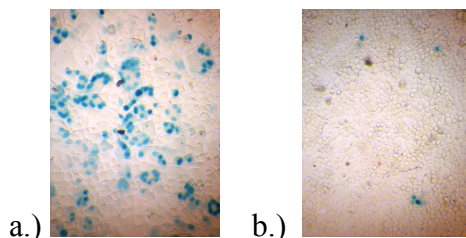
<sup>c</sup>In vitro terápiás index

<sup>d</sup>MAGI assay eredménye

2. táblázat. **UD29 politiolált oligonukleotid antivirális aktivitása MAGI assay eredmények alapján**

UD29 koncentráció μg/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 <sub>50</sub>	4,75 μg/ml	>40 μg/ml	>40 μg/ml
IC <sub>90</sub>	39,7 μg/ml	>40 μg/ml	>40 μg/ml

A sejteket a vírusfertőzést megelőző 30 perccel kezeltük az UD29 jelű politiolált oligonukleotiddal (1-40 μg/ml). A kékre festődött sejtek százalékos értéke jelzi a HIV fertőzött sejtek titerét (2. ábra).



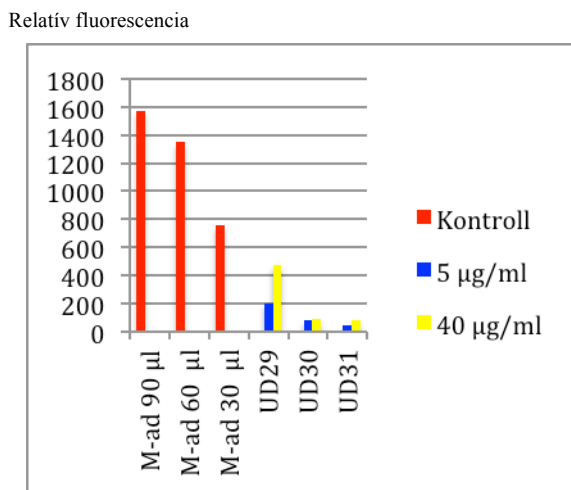
2. ábra. **Multinuclear activation of galactosidase inhibition (MAGI) assay HeLaCD4-LTR-βgal sejtvonalon**

a.) HIV-1<sub>IIIB</sub> fertőzött sejtek HeLaCD4-LTR-βgal sejtvonalon. b.) HIV-1<sub>IIIB</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.

**Kvantitatív Luciferáz assay eredménye**

A luciferáz assay egy nagy érzékenységgű, gyors, kemiluminescenciás mérési módszer. A módszer relatív fluoreszcencia értékei alapján kvantitatív módon elemezhetjük a kísérleteink eredményeit.

Az eredményeink igazolták a szincícium inhibíciós assay, a p24 antigén assay, valamint a MAGI assay eredményeit. A legjobb eredmények szintén az 5 µg/ml-es dózisonál jelentkeztek. Ez az érték megfigyelhető volt mind az UD29, mindpedig a vegyület módosított változatainak hatásaként (3. ábra).



### 3. ábra. UD29, UD30 és UD31 politiolált oligonukleotidok HIV pszeudovirion ellenes hatásának vizsgálata

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

A legújabban kifejlesztett UD29 származék, az UD30-new gátló hatása már 1,87 µM/ml koncentrációban érvényesült.

### XTT assay eredménye

A legmegfelelőbb koncentrációnak bizonyult 5 µg/ml mennyiségben az UD29, UD30, UD31 vegyületek fertőzött H9 sejtekre gyakorolt hatása kis mértékben mutatott toxikus hatást 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. UD30-new egyáltalán nem mutatott toxikus hatást a vizsgált sejtvonalon. A UD30-new kezeléskor a fertőzött H9 sejteken

a kontroll sejtekhez képest magasabb mitokondriális dehidrogenáz aktivitási értékeket figyelhettünk meg mindegyik a 24, illetve 48 órás mérési eredményekben egyaránt. A vegyületek toxikus hatása a fertőzés nélküli kísérletekben a T-sejtvonalakon jobban érvényesült, mint a monolayer HeLaCD4-LTR- $\beta$ gal és P4-CCR5 sejteken.

A politolált oligonukleotidok fertőzött sejtvonalakon mért toxicitás mértéke vírus koncentráció- és dózis-függő volt.

### **Magyarországi terápia-naïve HIV-1 izolátumok antiretrovirális rezisztencia vizsgálatai**

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.

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 vizsgáltát végeztük. Multidrog rezisztens mutánsok jelenléte is detektálható volt. 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 terápia szerre rezisztenciát mutatott. Multidrog rezisztens törzsek nagy százalékban voltak jelen. A vírusok 11%-a kétféle inhibitorra, 7% háromféle is rezisztens volt. A vizsgált minták közül az egyik páciensé 14 féle antiretrovirális ágensre is rezisztenciát mutatott.



## Következtetések

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 génnek 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 sejt felszíni 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 kezelésekkor.
- ❖ 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>III B</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 diszulfid kötésekkel interferáló hatása - így a

CD4 receptorban, valamint a pg120 molekulában a redox folyamatok befolyásolása - a HIV gazdasejtbe 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*). Ez az új hatásmechanizmuson alapuló vegyületcsalád eredményeink alapján perspektivikusan tovább fejleszthető az AIDS még hatékonyabb kezelése céljából.
- ❖ Eredményeink segítségével behatóbb ismereteket szereztünk a HIV gazdasejtbe 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.

## Saját publikációk jegyzéke

### 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):177-82. **IF.: 1,555**

**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**

**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**, 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**

### 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**