

**HUMÁN IMMUNDEFICIENCIA VÍRUS 1. TÍPUSA ÉS A
HUMÁN HERPESZVÍRUS 6 KÖLCSÖNHATÁSÁNAK *IN*
VITRO VIZSGÁLATA**

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Csoma Eszter

Témavezetők: Dr. D. Tóth Ferenc

Dr. Gergely Lajos

Debreceni Egyetem

Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Orvosi Mikrobiológiai Intézet

2006

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
BEVEZETÉS	4
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
<i>Koreceptorok szerepe a különböző HIV-1 variánsok fertőzésében</i>	7
<i>Macrophagok jelentősége a HIV-1 fertőzésben</i>	9
<i>A HIV-1 vertikális terjedése</i>	10
<i>A HHV-6 célsejtjei, szaporodása és patogenezése</i>	12
<i>HHV-6 látencia, reaktiváció</i>	13
<i>A HHV-6 vertikális terjedése</i>	13
<i>A HHV-6 és a HIV-1 kölcsönhatása</i>	14
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	16
<i>I. 1. Sejtek</i>	16
<i>I. 1. 1. Cytotrophoblast sejtek szeparálása és tenyésztése</i>	16
<i>I. 1. 2. A monocyta/macrophagok szeparálása és tenyésztése</i>	17
<i>I. 1. 3. Sejtvonalak</i>	18
<i>I. 2. Vírusok</i>	18
<i>I. 3. Vírusok titrálása</i>	18
<i>I. 4. Syncytiotrophoblastok fertőzése</i>	20
<i>I. 4. 1. Syncytiotrophoblastok fertőzése HIV-1-gyel, illetve HHV-6A-val</i>	20
<i>I. 4. 2. Koinfekció</i>	20
<i>I. 5. A macrophagkultúrák fertőzése</i>	20
<i>I. 6. Immunszérumok és konjugátumok</i>	20
<i>I. 7. Immunfluoreszcens technikák</i>	21
<i>I. 8. Transzfekció</i>	22
<i>I. 9. Polimeráz láncreakció (PCR)</i>	23
<i>I. 10. Kemokinek mennyiségének meghatározása</i>	23

<i>I. 11. Intracelluláris kalcium mérése</i>	23
<i>I. 12. Fluorocytometriás vizsgálatok</i>	24
<i>I. 13. Statisztikai elemzés</i>	24
EREDMÉNYEK	25
<i>I. 1. HHV-6A és HIV-1 fertőzőképességének vizsgálata syncytiotrophoblast sejteken</i>	25
<i>I. 2. HIV-1-gyel és HHV-6A-val történt kettős fertőzés hatása a vírusok replikációjára syncytiotrophoblastokban</i>	26
<i>I. 3. Felszíni molekulák expressziójának vizsgálata fertőzetlen és fertőzött syncytiotrophoblast sejteken</i>	29
<i>I. 4. A HHV-6A transzaktivátor géntermékeinek hatása a HIV-1 replikációjára</i>	31
<i>II. 1. A HHV-6A szupresszálja a HIV-1 replikációját macrophagokban</i>	34
<i>II. 2. HHV-6A replikáció a macrophagokban</i>	35
<i>II. 3. A HHV-6A fokozza a macrophagok IL-8 és RANTES ürítését</i>	36
<i>II. 4. Exogén IL-8 és RANTES hatása a HIV-1 replikációjára</i>	37
<i>II. 5. HHV-6A hatása a CCR5 ligandérzékenységére</i>	38
<i>II. 6. A HHV-6A fertőzés befolyásolja a macrophagok CCR5 expresszióját</i>	39
MEGBESZÉLÉS	41
ÖSSZEFOGLALÁS	45
IRODALOMJEGYZÉK	47
TÁRGYSZAVAK	61
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	62
FÜGGELÉK	63

BEVEZETÉS

A humán herpeszvírus 6 (HHV-6), mely gyakran reaktiválódik a humán immundeficiencia vírus 1. típusával (HIV-1) fertőzött betegekben, a HIV-1-gyel kölcsönhatásba lépve befolyásolhatja annak szaporodását, ezért az AIDS progresszió igen fontos tényezője lehet. A két vírus kapcsolatát *in vitro* már több sejttípusban tanulmányozták, ám a HIV-1 vertikális átvitelében kulcsszerepet betöltő syncytiotrophoblast (ST) sejtekben, illetve a macrophagokban az interakció még nem kellően tisztázott.

Napjainkban a HIV-1 anyáról gyermekére történő átvitele a vírus terjedésének egyik jelentős problémájává vált. A méhen belüli fertőzés fontos módja a HIV-1 vertikális átvitelének (Maury et al., 1989). A méhlepény ST sejtjei barriert képeznek a magzat és az anya közt, hiszen ez a folyamatos, sokmagvú epithelium áll közvetlen kapcsolatban az anyai vérrel (Enders, 1989). A vírusnak ezen a rétegen kell áthatolnia ahhoz, hogy elérje és megfertőzze a magzati sejteket. Azt, hogy a HIV-1 képes megfertőzni az ST-okat már több vizsgálat igazolta: egyrészt *in situ* HIV-1 specifikus provirális DNS-t mutattak ki bennük (Backe et al., 1992; Chandwani et al., 1991; Lewis et al., 1990), másrészt *in vitro* sikerült sejtmertes víruspartikulumokkal megfertőzni az ST sejteket (Bacsi et al., 2001; Mano and Chermann, 1991; Zachar et al., 1991a). Ezekben az *in vitro* fertőzött sejtekben azonban a HIV-1 replikációs ciklusa általában abortív, fertőzőképes virionok nem vagy igen kis mennyiségben ürülnek (Zachar et al., 1991b). Azt, hogy a ST-ok *in vivo* produktív fertőzése meghatározott feltételek mellett végbemehet, klinikai vizsgálatok is igazolják: a méhlepény trophoblast sejtjeiben HIV-1-specifikus p24 antigén mutatható ki (Backe et al., 1992; Lewis et al., 1990). Feltételezhető, hogy a HIV-1 szaporodását, így a vírus transzplacentális átvitelét számos tényező befolyásolhatja.

ST sejtekben a HIV-1 replikáció stimulálásának egyik lehetséges módja a HHV-6-tal történő koinfekció. A HHV-6 rendkívül elterjedt vírus, a primer fertőzés után látens állapotban a szervezetben marad, a szeropozitivitás átlagos felnőtt populációban meghaladja a 90 %-ot (Irving and Cunningham, 1990). A HHV-6 – az esetek többségében a vírus A variánsa – már a HIV-fertőzés korai stádiumában reaktiválódhat (Knox and Carrigan, 1996). A terhesség alatti reaktiváció szintén igen gyakori (Dahl et al., 1999; Ohashi et al., 2002), ekkor a vírus a placentát is megfertőzheti. Bizonyos tanulmányok szerint a HHV-6 a CD4 gént aktiválva fokozhatja a HIV-1-gyel szemben fogékony sejtek számát (Furlini et al., 1996; Lusso et al., 1991; Lusso et al., 1993). Ugyanakkor a HHV-6, részint transzaktiváló

géntermékeivel a HIV-1 LTR-re (long terminal repeat) hatva aktiválhatja a látens HIV-1 fertőzést, fokozhatja a replikációt (Di Luca et al., 1991; Ensoli et al., 1989; Geng et al., 1992; Kashanchi et al., 1994; Martin et al., 1991; Nicholas and Martin, 1994; Zhou et al., 1994). Bár a HHV-6 transzplacentális átvitele nem túl gyakori, mintegy 1-1,6 % (De Bolle et al., 2005), HIV-pozitív anyákban mégis fontos tényező lehet a HIV-1 méhlepényen keresztüli átvitelében.

Epidemiológiai vizsgálatok szerint a magzat fertőződése a terhességnek vagy a korai vagy a késői fázisában történik (Blanche et al., 1994; Dabis et al., 1993). Feltételezések szerint azonban inkább az utóbbinak van nagyobb szerepe a transzplacentális átvitelben (Krivine et al., 1992; Luzuriaga et al., 1993). Ezért szülésből származó méhlepényből szeparáltunk cytotrophoblast sejteket, és az ezekből kialakított ST sejtekben vizsgáltuk a HIV-1 és a HHV-6A kölcsönhatását.

Kísérleteinkkel a következő kérdésekre kerestünk válaszokat: Képes-e a HHV-6A fertőzni az ST sejteket? Befolyásolja-e a vírusok replikációját a HIV-1-gyel, illetve HHV-6A-val történő koinfekció? Ha igen, milyen módon?

A monocyta / macrophag vonal sejtjei nemcsak az aktív HHV-6 fertőzés fontos célsejtjei, hanem egyben a látencia fontos színhelyei is (Kondo et al., 1991; Kondo et al., 2002). A macrophagok a HIV-1 fertőzésben is rendkívül fontos szerepet töltenek be, hiszen célsejtek és reservoirok a vírus számára, illetve migrációs képességük miatt igen jelentősek a vírus szervezetben belüli disszeminációjában és a patogenezisben (Kedzierska and Crowe, 2002; Verani et al., 2005). Ezek a sejtek elsősorban a HIV-1 R5 variánsaira fogékonyak, melyek CCR5 kemokin receptorhoz kötődve képesek a sejtbe bejutni. A receptor érzékenységét, sejt felszíni expresszióját, így a sejtek HIV-1 iránti érzékenységét számos tényező befolyásolhatja. Kulcsfontosságú szerephez jutnak ebben a különböző kemokinek, melyek ezen receptorok természetes agonistáiként a receptorhoz való kötődésért versengve akadályozhatják a víruspartikulumok sejtbe való bejutását. Emellett a kemokin receptorok működését ligandjaik kötődése szabályozza. A kemokin-receptor kapcsolat olyan kaszkárendszerrel kapcsol be, amely nemcsak a kölcsönhatásban résztvevő receptor érzékenységének elvesztéséhez és internalizációjához, de heterológ módon más kemokin receptorok működésének, expressziójának megváltozásához is vezethet. Különböző sejttípusokban (CD4+ T-lymphocytákban, perifériás vér mononuclearis sejteiben, dendritikus sejtekben és *ex vivo* lymphoid szövetekben) már kimutatták, hogy a HHV-6 képes a HIV-1 replikációját szuppresszálni, és ebben feltételezések szerint különböző szolubilis anyagoknak lehet szerepe.

Annak ellenére, hogy a macrophagok mind a HHV-6, mind a HIV-1 fertőzésben kulcsfontosságúak, a két vírus kölcsönhatását ezekben a sejtekben még nem tanulmányozták részletesen. Kísérleteinkkel tisztázni kívántuk, hogy a macrophagok kettős fertőzése hogyan befolyásolja a HHV-6A és a HIV-1 szaporodását. A fertőzések hatására megváltozik-e ezen sejtek kemokintermelése, és ha igen, befolyásolják-e ezek a sejtek HIV-1 iránti érzékenységét?

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Koreceptorok szerepe a különböző HIV-1 variánsok fertőzésében

A *Retroviridae* család *Lentivirus* genusába tartozó HIV-1 szaporodásának első lépése a vírus kötődése a célsejthez. Az adszorpció során a gp120 először hozzákapcsolódik a sejt felszínén található főreceptorhoz, majd egy koreceptorhoz. Ez olyan konformációs változást eredményez, ami lehetővé teszi a vírus felszínén lévő gp41 molekula kötődését egy sejt felszíni fúziós molekulához. A szaporodás következő lépéseként a virion burka a citoplazma-membránnal összeolvad, a szabaddá váló víruskapszid pedig bejut a sejtbe. A HIV-1 fő felszíni receptora a CD4 molekula, ám CD4-negatív sejtekbe mannóz receptorok (Ezekowitz et al., 1989), galaktozilceramid receptorok (Fantini et al., 1993) vagy a sejtmembránban lévő gp120-at kötő fehérjék révén is bejuthat (Curtis et al., 1992). Bár különböző kemokin receptorok (CCR2b, CCR3, CCR8, CCR9, CX3CR1, CXCR6), illetve úgynevezett „orphan” kemokinreceptorszerű molekulák (GPR1, GPR15, V28, APJ) is lehetnek a vírus koreceptorai (ezek *in vivo* szerepéről ma még nem sokat tudunk), mégis elsősorban CCR5 vagy CXCR4 kemokin receptort használ a HIV-1 (Princen and Schols, 2005). Ezek a receptorok G-fehérjéhez kötött, hét transzmembrán doménnel rendelkező molekulák, melyek N-terminális része az extracelluláris térben található, és a ligandkötésben játszik szerepet, míg C-terminális, citoplazmatikus része a G-fehérje aktiválásban, illetve a receptor működésének szabályozásában nélkülözhetetlen. Ezek a molekulák a fehérvérsejtek kemotaxisának szabályozásában szerepet játszó kemotaktikus citokinek, a kemokinek receptorai. A CCR5 természetes ligandja a RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted), míg a CXCR4-é az SDF-1 (stromal-cell derived factor). A ligand bekötődése a receptor foszforilációját, homológ deszenzitizációját, majd internalizációját eredményezi.

A RANTES CCR5 receptorhoz kötődése foszfolipáz aktivációját, inozitol-1,4,5-trifoszfát és diacilglicerol keletkezését, illetve intracelluláris Ca^{2+} mobilizációt okoz. A G-fehérjéhez kötött receptorkinázok aktiválódnak, amelyek a CCR5 karboxiterminális végét foszforilálva a receptor homológ deszenzitizációját eredményezik, vagyis a receptor elveszíti ligandjával szembeni érzékenységét. A foszforilálásnak köszönhetően a CCR5 így már kötődhet a β -arrestinhez, amit a receptor igen gyors internalizációja követ (Oppermann, 2004).

Ugyanakkor a CCR5 receptor működését heterológ módon más kemokin receptorok, így azok ligandjai is befolyásolhatják. Richardson és munkatársai a CXCR1-ről, az interleukin-8 (IL-8) receptoráról már kimutatták, hogy képes a CCR5 érzékenységet és sejtfelszíni jelenlétét befolyásolni (Richardson et al., 2003).

Már a koreceptorok jelentőségének felfedezése előtt ismert tény volt, hogy a HIV-1-nek két eltérő tulajdonsággal rendelkező variánsa létezik. Korábban a különböző izolátumokat aszerint csoportosították, hogy mennyire képesek szaporodni az MT-2 sejtekben, T-sejteket vagy macrophagokat fertőznek-e elsősorban, illetve citopátiás hatásként alakulnak-e ki syncytiumok. Így a vírusokat két csoportba sorolták: a syncytiumképző (syncytium-inducing, SI) vagy T-sejttróp, illetve a nem syncytiumképző (non-syncytium-inducing, NSI) vagy macrophagtróp variánsok közé. A későbbi felfedezések hatására a nevezéktan megváltozott. Ma már tudjuk, hogy a korábban SI variánsnak nevezett vírusok elsődlegesen CXCR4-et használnak kemokin koreceptorként, így ezek elnevezése ma már X4 variánsok. A múltban NSI-nek nevezett variánsok fő koreceptora a CCR5, így ezek neve ma R5 variáns. Azok az úgynevezett duáltróp vírusok, melyek képesek mindkét kemokin receptort használni az R5X4 variánsok.

Klinikai vizsgálatok szerint a fertőzés leggyakrabban R5 variánsokkal történik, ezek dominálnak a HIV-1-fertőzés kezdeti, tünetmentes fázisában, ugyanakkor a betegség egész ideje alatt jelen vannak a fertőzött egyén szervezetében (Verani et al., 2005). A vírus egyik leggyakoribb terjedési módja a szexuális kontaktus során történő átvitel. A genitális és rectalis hám alatti régióban dendritikus sejtek, macrophagok és olyan CD4+ T-sejtek találhatóak, melyek elsősorban CCR5 felszíni molekulát expresszálnak, és felszínükön jóval kevesebb CXCR4 receptor található (Miller and Shattock, 2003; Patterson et al., 1998). Mind a dendritikus sejtek, mind pedig a macrophagok felszínén a CCR5 receptorok dominálnak. A szexuális úton történő átvitelben szinte legfontosabb Langerhans-sejtek felszínén CXCR4 nem található, a sejtek egy részén azonban, ha kis mennyiségben is, de CCR5 igen. A bélhámsejtek felszínén is az R5 variánsok koreceptora dominál. Emellett a genitális traktusban és a béllumenben az igen nagymennyiségű SDF-1 az X4 variánsok fertőzését hatékonyan tudja akadályozni. Így tehát a szexuális átvitel során a vírussal elsőként találkozó védelmi vonalat és egyben a vírus számára célsejteket olyan sejtek alkotják, melyek a HIV-1 R5 variánsaira fogékonyak. A betegség előrehaladtával azonban a HIV-1-fertőzöttekben megjelennek az X4 variánsok, és ezek dominanciája mindenképpen a betegség rossz prognózisát jelenti (Jekle et al., 2002). Az intravénás kábítószer használók, illetve a vérrel fertőzöttek körében az X4 variánssal történő infekció valószínűsége jóval nagyobb. Abban az

esetben, ha a fertőzés kezdetétől az X4 vagy az R5X4 variánsok dominálnak, a betegség rendkívül gyors lefolyású. Epidemiológiai vizsgálatok alapján azonban az ily módon fertőzött egyének és a szexuális úton fertőzöttek között nincs jelentős különbség a betegség lefutásában. Ez az ellentmondás azzal magyarázható, hogy a fertőzés után a vírusok a dendritikus sejtek és a macrophagok közvetítésével jutnak el a nyirokcsomókba, lymphoid szövetekbe, ahol elsősorban a CD4+ CCR5+ T-lymphocyták dominálnak.

Feltehetően számos tényezőnek van szerepe abban, hogy HIV-fertőzött betegekben kialakulnak az X4 variánsok, sőt többségbe kerülnek az R5 variánsokkal szemben. A burokban található, *env* gén által kódolt felszíni glikoproteinekben bekövetkező mutációk eredményezhetik azt a shiftet, melynek során az R5 variánsokból X4 variánsok lesznek. Megfigyelések szerint ez a váltás akár egy köztes állapoton keresztül is megtörténhet, amikor a vírus először R5X4 variánssá válik, vagyis olyan duáltróp vírussá, mely akár mindkét leggyakrabban használatos koreceptorhoz képes kötődni (Princen and Schols, 2005). Emellett szelekciós hajtóerő lehet az is, ha a CCR5 receptorok száma drasztikusan lecsökken.

Macrophagok jelentősége a HIV-1 fertőzésben

A HIV-1 számára a monocyta/macrophag sejtvonal *in vivo* elsődleges célsejtként, illetve reservoirként szolgál. Így ezek a sejtek igen fontos szerepet játszanak a vírus szervezetben belüli disszeminációjában és a fertőzés patogenezisében (Balestra et al., 2001; Meltzer et al., 1990; Verani et al., 2005). A macrophagok a konstitutív immunvédelmi mechanizmusok egyik igen fontos karmesterei, emellett jelentős szerepük van az adaptív immunválaszok beindításában. Kulcsfontosságúak a fertőzéssel szemben folytatott harcban, a fertőzés felszámolásában. Egyrészt azáltal, hogy közvetlen módon képesek a kórokozót elpusztítani, másrészt azzal, hogy olyan citokineket, kemokineket ürítenek, amelyek aktiválják mind a konstitutív, mind pedig az adaptív immunválaszt. Azok a kórokozók, amelyek képesek ezeket a sejteket megfertőzni, és bennük túlélni (mint például a HIV-1), megváltoztathatják működésüket, citokin- és kemokintermelésüket, aminek jelentős szerepe lehet az adott fertőzéssel szemben folytatott harcban, illetve a kórokozó szervezetben belüli disszeminációjában, az általa okozott betegség patogenezisében.

A macrophagokat elsősorban a HIV-1 R5 variánsai képesek megfertőzni. Bár a monocyták felszínén jelen van a CXCR4 molekula, a macrophaggá történő differenciáció során a CXCR4 koreceptorok száma a CCR5-höz viszonyítva jelentősen lecsökken (Fear et al., 1998). Bizonyos kutatók szerint a macrophagok X4 törzsekkel *in vitro* nem fertőzhetőek

(Yi et al., 1998). Más tanulmányok szerint ez megtörténhet, a replikáció akár produktív is lehet (Simmons et al., 1998; Verani et al., 2002), míg mások szerint a bejutás megvalósulhat, de a szaporodás egy korai lépésnél blokkolt (Schmidtmayerova et al., 1998). A perifériás vérből izolált monocyták felszínén a CCR5 receptorok száma alacsony, így, legalábbis *in vitro*, kevésbé fogékonyak az R5 variánsokra (Kedzierska et al., 2003). A macrophaggá történő differenciáció során azonban a CCR5 expressziója növekszik (Di Marzio et al., 1998), így az érett macrophagok már jól fertőzhetőek R5 variáns HIV-1 törzsekkel.

A HIV-1 nem osztódó sejtekben, így a macrophagokban is képes szaporodni annak ellenére, hogy a vírus RNS genomjáról reverz transzkripcióval létrejött provirális DNS-nek be kell jutnia a sejtmagba, és integrálódnia kell a gazdasejt genomjába. Ráadásul a provirális DNS-nek az integrációhoz szükséges virális és celluláris fehérjékkel együtt egy igen nagy és komplex (közelítőleg 60 nm-es) nukleoprotein formájában kell a maghártya pórusain átjutnia. Mindez aktív, energiaigényes transzporttal, így teljesen ép maghártyán keresztül valósul meg. Macrophagokban a produktív HIV-1 fertőzés független a celluláris DNS szintézistől (Weinberg et al., 1991).

A HIV-1 vertikális terjedése

A már említett fertőzési módok mellett a HIV-1 terjedésében a vertikális átvitelnek is nagy szerepe van. A gyermek fertőződhet a méhen belül (Maury et al., 1989), a szülés során vérrel, illetve hüvelyi váladékkal történő érintkezéskor (Ehrnst et al., 1991) vagy a szoptatás alatt (Dunn et al., 1992). Epidemiológiai vizsgálatok alapján annak valószínűsége, hogy egy HIV-pozitív terhes nő gyermekét megfertőzi, mintegy 20 % (Peckham, 1994), azonban megfelelő, hatékony antivirális terápiával (Lallemant et al., 2000), illetve azzal, hogy az anya nem szoptatja gyermekét ez a veszély jelentősen, akár harmadára csökkenthető. Abban az esetben, ha a magzat fertőzése a méhen belül történik, a születés után nagyon hamar igen súlyos tünetek alakulnak ki. Ezek elsősorban különböző opportunisták kórokozók által történő fertőzések, a fizikai és szellemi fejlődés megállása, illetve súlyos idegrendszeri tünetek. Ezek a gyerekek általában nem élik meg a 3 éves kort. A szülés során vagy szoptatással fertőzöttekben a betegség tünetei csak 1-2 év múlva jelentkeznek, és az igen súlyos, halálhoz vezető tünetek is lassabban alakulnak ki. Az így fertőzött gyerekek többsége 5 éves kor előtt meghal.

A méhen belüli fertőzést bizonyítja, hogy köldökzsinórvérben, újszülöttek perifériás vérében (Laure et al., 1988; Rogers et al., 1989), illetve magzati szövetekben (Courgnaud et

al., 1991) közvetlenül a szülés után vírusspecifikus nukleinsavat mutattak ki. A placenta syncytiotrophoblast sejtjei – melyek közvetlenül érintkeznek az anyai vérrel – szelektív barriert képeznek az anya és a magzat között (Enders, 1989). A HIV-1 vírusnak át kell jutnia a folyamatos ST rétegen ahhoz, hogy elérje a mélyebben fekvő cytotrophoblast sejteket, placenta macrophagokat (Hofbauer sejtek), fibroblastokat, illetve a magzati kapillárisokat szegélyező endothel sejteket. A vírus bejutása úgy valósulhat meg, hogy vagy fertőzött anyai sejtek (monocyták, macrophagok, T-lymphocyták) hatolnak át a barrieren, vagy a vírus ellenanyagokkal képzett komplexek segítségével jut át, vagy a HIV-1 megfertőzi a ST sejteket. Az ST rétegben HIV-1-specifikus provirális DNS-t *in situ* többen is kimutattak (Backe et al., 1992; Chandwani et al., 1991; Lewis et al., 1990), és több *in vitro* vizsgálat igazolta, hogy az ST sejtek laboratóriumi HIV-1 törzsekkel megfertőzhetők (Mano and Chermann, 1991; Zachar et al., 1991a). Ez egyes szerzők szerint sejtmentes vírusparikulumokkal is megtörténhet, míg mások szerint az ST sejtek fertőzése csak speciális sejt-sejt kölcsönhatások révén valósulhat meg (Bourinbaiar and Nagorny, 1993; Kilani et al., 1997). Az *in vitro* HIV-1-gyel fertőzött trophoblast kultúrákban vírusürítés általában nem figyelhető meg, vagy annak mértéke a legjobb esetben is csak igen csekély (Fazely et al., 1995; Zachar et al., 1991b). A trophoblastok *in vivo* produktív fertőzése valószínűleg csak meghatározott feltételek mellett mehet végbe, és különböző kofaktorok befolyásolhatják.

Az első barriert tehát az ST sejtek képezik. Ismeretes, hogy a placentán szinte kizárólag csak R5 variáns HIV-1 törzsek jutnak át (Ometto et al., 1995; van't Wout et al., 1994). Ennek az lehet a magyarázata, hogy az ST sejtek környezetében lymphocyták nincsenek, tehát a CXCR4-et használó törzsek transzplacentális átvitele gyakorlatilag lehetetlen. Úgy tűnik azonban, hogy még az R5 variánsok transzplacentális átjutása sem abszolút érvényű. Erre utal az a tény, hogy a HIV-1-gyel fertőzött terhes nők méhlepényében 70 %-os gyakorisággal lehet provirális DNS-t kimutatni (Chouquet et al., 1997; De Andreis et al., 1996), a vertikális átvitel gyakorisága viszont maximum 20 % (Peckham, 1994). Az átvitel gyakoriságát csökkentő két további tényező az ST réteg folyamatos cseréje, és az NK sejt (természetes ölósejt; natural killer) aktivitás lehet. Az ST réteg időnként leválik, és az alatta elhelyezkedő cytotrophoblastokból képződik újra. Ez a fertőzött sejtek számának csökkenését eredményezheti. Az NK sejtek képesek a vírussal fertőzött ST sejtek felismerésére és elpusztítására (Zdravkovic et al., 1994). Ezáltal csökken annak valószínűsége, hogy a placenta-macrophagok „átveszik” a vírust. A HIV-1 transzplacentális átvitele tehát egy olyan kaszkád folyamat, melyet számos tényező befolyásolhat.

A HHV-6 célsejtjei, szaporodása és patogenezeise

A humán herpeszvírusok és a HIV-1 közötti kölcsönhatásnak fontos szerepe van a HIV-1-fertőzéshez társuló opportunisták patogenezésében és az alapbetegség lefolyásában.

A *Herpesviridae* család, *Betaherpesvirinae* alcsaládjának *Roseolovirus* genusába tartozó HHV-6-ot 1986-ban izolálták először lymphoproliferatív betegségben szenvedők véréből (Salahuddin et al., 1986), akik közül ketten AIDS-esek voltak. Az ezt követő vizsgálatok bizonyították, hogy a vírus rendkívül elterjedt, a felnőtt populáció szeropozitivitása meghaladja a 90 %-ot, a földrajzi eltérések jelentéktelenek (Irving and Cunningham, 1990). A vírusnak A (HHV-6A), illetve B (HHV-6B) variánsa ismert (Ablashi et al., 1991). A két variáns közti genetikai különbség mintegy 12 %, eltérő immunológiai és biológiai sajátosságokkal rendelkeznek.

In vivo a HHV-6 fő célsejtjei a CD4+ T-lymphocyták, emellett a perifériás vér monocytáit is képes megfertőzni, sőt a rekonvaleszcencia időszakában már csak ezekből a sejtekből mutatható ki vírusspecifikus DNS. *In vitro* kísérletek szerint a vírus számos sejttípust képes megfertőzni: folyamatos T-sejtvonalakat, fibroblastot, NK sejteket, immortalizált májsejteket, epithel sejteket, endothel sejteket, magzati astrocytát, oligodendrocytát és microgliát, bár a T-lymhocytákhoz képest ezekben a sejtekben a vírusreplikáció jóval kisebb mértékű. Mindemellett a HHV-6 szövetotropizmusa *in vivo* is igen széles: agyban, májban, mandulában, nyálmirigyben és endotheliumban is kimutatható a vírus (De Bolle et al., 2005). Ez elsősorban annak köszönhető, hogy a vírus receptora, a CD46 molekula, valamennyi sejtmaggal rendelkező sejt felszínén megtalálható. Ez a C3b/C4b-kötő glikoprotein akadályozza meg a komplementaktiválást a gazdasejteken.

A vírus replikációja a többi herpeszvírushoz hasonló módon zajlik. A receptorhoz való kötődést a vírus burkának a citoplazmával történő összeolvadása kíséri. A kapszid a citoplazma mikrotubulusainak segítségével jut el a sejtmaghoz, ahol megtörténik a dekapszidáció. A géneexpresszió időben nagyon korai (immediate early; IE), korai (early, E) és késői (late; L) szakaszra osztható. A fertőzés után pár órával már megjelenő IE géntermékek amellett, hogy a vírus további géneexpresszióját szabályozzák, nem saját gének (így más vírusok) transzkripciós transzaktivátorai lehetnek. A pDR7-ről, a pU3-ról, az IE-B régió U16-U19 génjeiről, az U27-ről, az IE-A régió U86 és U89 génjeiről, illetve az U94-ről bizonyosodott be, hogy transzaktivátor hatásúak (De Bolle et al., 2005). Az új kapszid az összeépülés után a sejtmagból a citoplazmába jut. Itt veszi fel a tegumentumfehérjéket, illetve

a burkot, ami rendszerint a Golgi-apparátusból származik. Az új virionok exocitózissal hagyják el a sejteket.

A primer fertőzés szinte kizárólag a B variánssal történik 6 és 15 hónapos kor közt (Dewhurst et al., 1993), lázzal és kiütéssel járó, általában enyhe lefolyású megbetegedést, az exanthema subitumot okozza (Yamanishi et al., 1988). Ma még nem pontosan tisztázott, hogy a HHV-6A fertőzés mikor történik. Feltételezhetően a HHV-6B fertőzés után, és nem okoz klinikai tüneteket. Ugyanakkor az A variáns gyakrabban mutatható ki immunszuppresszált betegekből, így HIV-pozitív egyénekből (Knox and Carrigan, 1994). A reinfekció bizonyítéka, hogy egy egyedből (gyerekből és felnőttekből is) akár több HHV-6 törzs is kimutatható (Cone et al., 1996; Kusuhara et al., 1991; van Loon et al., 1995).

HHV-6 látencia, reaktiváció

A primer HHV-6 fertőzést követően perzisztens, aktív fertőzés vagy valódi látencia alakulhat ki. A kismértékű vírustermelés a nyálmirigyben és az agyban mutatható ki (Chan et al., 2001; Donati et al., 2003; Fox et al., 1990). A többi herpeszvírúshoz hasonlóan a HHV-6 a primer fertőzés lezajlása után látens formában a szervezetben marad. A valódi látencia fő célsejtjei a monocyta/macrophag vonal sejtjei (Kondo et al., 1991), illetve a csontvelői őssejtek (Luppi et al., 1995). Mind *in vivo*, mind pedig *in vitro* megfigyelések szerint, bár igen kis százalékban, de a HHV-6 genomja integrálódhat a gazdasejt genomjába, az 1., 17. és 22. kromoszóma végére (De Bolle et al., 2005). A látencia során az U94 gén expresszáldódik, bár az átíródott RNS ebben az esetben nagyobb, mint a lítikus ciklus során (Rapp et al., 2000; Reardon and Spector, 1989).

A látens HHV-6 fertőzés elsősorban immunszuppresszált betegeknél, AIDS-esekben, csontvelő- vagy szervtranszplantáltakban (Caserta et al., 2001) és terhes nőkben reaktiválódik. Emellett más vírusok által okozott súlyos, szisztémás fertőzések is a látencia megszűnéséhez, aktív vírustermeléshez vezethetnek.

A HHV-6 vertikális terjedése

A leggyakrabban nyállal történő horizontális terjedés mellett a HHV-6 vertikálisan, azaz anyáról magzatra is terjedhet. Mindezt alátámasztják azok a megfigyelések, miszerint a vírus kimutatható a terhes nők egy részének genitális traktusában, placentájában, illetve perifériás vérében (Dahl et al., 1999; De Bolle et al., 2005). Minthogy a szülőképes korban

lévő nők igen nagy százaléka már átesett a primer HHV-6 fertőzésen, így a humán cytomegalovírussal (HCMV) ellentétben a transzplacentális fertőzés nem az anya primer HHV-6 fertőződése miatt történik meg, hanem a látens fertőzés reaktiválódása, reinfekció vagy a fennálló krónikus fertőzés miatt. A terhesség során a HHV-6 elleni ellenanyagok szintje általában megnő, nagyobb százalékban mutatható ki vírusspecifikus DNS a perifériás vérből, ami a terhesség alatti reaktiváció nagyobb gyakoriságára utal (Ohashi et al., 2002). A kongenitális HHV-6 fertőzés gyakorisága mintegy 1-1,6 % (De Bolle et al., 2005). A fertőzés általában transzplacentálisan történik. HHV-6 esetében az anyatejjel történő fertőzés nem játszik szerepet. Klinkai vizsgálatok szerint a legtöbb kongenitális HHV-6-fertőzött gyermek tünetmentes, bár a vírus hosszú ideig perzisztál, vírusspecifikus DNS PCR-rel kimutatható, infektív vírustermelés nem történik (Hall et al., 2004). Az esetek mintegy 30 %-ában a vírus A variánsa okozza a kongenitális infekciót. HCMV esetében, amikor a magzati fertőzés oka az anyai vírusreaktiváció, vagyis amikor a transzplacentális fertőzés a HHV-6-hoz igen hasonló módon anyai ellenanyagok jelenléte mellett történik, a csecsemő kezdetben tünetmentes. Évekkel később azonban súlyos idegrendszeri tünetek, szellemi visszamaradottság, hallás- és látáskárosodás alakulhat ki (Boppana et al., 1996; Hall et al., 2004). Az irodalomban találunk esetet egy HHV-6 fertőzéssel született csecsemőről, akinek liquorjában PCR-rel kimutatható volt a HHV-6 és súlyos idegrendszeri tünetei voltak (Lanari et al., 2003). Minthogy a HHV-6 képes az idegrendszer több sejtjét is megfertőzni, így nem meglepő, hogy a kongenitális HHV-6 fertőzés az idegrendszer károsodásával járhat. Sajnálatos módon azonban, alig találunk olyan publikációt, mely a transzplacentálisan HHV-6-tal fertőzött gyerekek évekre tartó megfigyelését közölné. Miközben ezen tanulmányok az évekkel később jelentkező, a HHV-6 fertőzéssel összefüggésbe hozható idegrendszeri szövődményekről nyújtanának fontos információt.

A HHV-6 és a HIV-1 kölcsönhatása

A HHV-6 és a HIV-1 kölcsönhatását már több sejt típusban tanulmányozták. Bizonyos közlemények szerint a HHV-6 a fő célsejtjeinek tartott CD4+ T-lymphocytákban képes fokozni a HIV-1 szaporodását (Lusso et al., 1989), míg mások szerint éppen ellenkezőleg, szuppresszív hatású (Levy et al., 1990). A stimuláció egyrészt a HHV-6 különböző génproduktumainak a HIV LTR régiójára kifejtett hatásával, a transzkripció fokozásával (Ensoli et al., 1989; Martin et al., 1991; Zhou et al., 1994) magyarázható. Másrészt a HHV-6

képes CD4 receptor megjelenését indukálni a CD4- sejtek felszínén, ezáltal növelni a HIV-1-gyel szemben fogékony sejtek számát (Lusso et al., 1991; Lusso et al., 1993).

Dendritikus sejteken végzett koinfekciós kísérletekben (Asada et al., 1999) a HHV-6 jelentősen szuppresszálta a HIV-1 replikációját (mind az X4, mind az R5 variánsok esetében). Ugyanakkor a cikk szerzői minimális gátló hatást tapasztaltak macrophagok koinfekciója során, és csak a Ba-L törzsnél. A gátló hatás már rendkívül alacsony fertőzési multiplicitás (<0,001) esetén is megfigyelhető volt. Ugyanakkor hővel inaktivált vagy neutralizáló ellenanyaggal kezelt HHV-6 esetén nem tapasztaltak szuppressziót, illetve nem figyeltek meg változást a CD4 receptor expressziójában vagy funkciójában. Feltételezésük szerint a hatás vagy a HIV transzkripciójának és translációjának gátlásán keresztül, vagy a HIV-1 szaporodását gátolni képes faktorok szekrécióján keresztül valósul meg.

Tonsillából származó lymphoid szöveteken végzett kísérletekben (Grivel et al., 2001) azt tapasztalták, hogy a HHV-6 jelentősen szuppresszálja a CCR5-tróp HIV-1 szaporodását, ugyanakkor az X4 variánsokét nem. Ezen vizsgálatok alapján a gátló hatás a HHV-6 hatására bekövetkező RANTES szekréciójának növekedésére vezethető vissza.

CD4+ T-lymphocytákban a HIV nem stimulálja a HHV-6 szaporodását (Levy et al., 1990; Pietroboni et al., 1988). Dendritikus sejtek esetében nem találtak eltérést a csak HHV-6-tal és a kettősen fertőzött kultúrák HHV-6 termelésében (Asada et al., 1999). A lymphoid szöveten végzett kísérletek már nem ilyen egyértelműek (Grivel et al., 2001). A szerzők szerint nem volt szignifikáns a HHV-6 szaporodásának stimulálása a kettősen fertőzött szövetekben. Ám az R5 HIV-1 variánssal végzett kísérletek során tapasztaltak fokozott HHV-6 replikációt (ötből két esetben). Az X4 variánssal történő kettős fertőzés esetében vagy csökkenést, vagy enyhe növekedést, illetve semmilyen változást nem figyeltek meg.

Mindezek alapján a HHV-6 és a HIV-1 befolyásolhatja egymás szaporodását, ami azonban egyrészt a fertőzött sejt típusától, másrészt az *in vitro* kísérlet körülményeitől függ.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

I. 1. Sejtek

I. 1. 1. Cytotrophoblast sejtek szeparálása és tenyésztése

Kísérleteinkhez normál szülésből származó placentákból szeparáltunk cytotrophoblast sejteket, Douglas és King (Douglas and King, 1989) módszere alapján. A placenta magzati részét apró darabokra vágtuk, és izotóniás foszfátpufferben (phosphate buffered saline; PBS) többször mostuk. A szövetdarabokat DNase I enzimet (Roche, Svájc) tartalmazó, 0,25 %-os tripszinben 37 °C-on emésztettük. A háromszor 30 perces emésztésből nyert sejtfrakciókat egyesítettük. A vörösvértestek és egyéb kontamináns sejtek zömét Percoll (Pharmacia, Svédország) gradiens centrifugálással távolítottuk el. A centrifugálást 20 percig végeztük, 800 g sebességgel. A következő lépésben a cytotrophoblastokat a még megmaradt kontamináns sejtektől immunmágneses technikával távolítottuk el. A sejtekhez anti-HLA ABC monoklonális ellenanyagot adtunk (egér anti-humán HLA-ABC, DAKO, Dánia), majd 30 percig rázattuk tört, olvadó jégen. PBS-sel történő egyszeri mosás után hozzáadtuk a szekunder ellenanyagot. A szekunder ellenanyag olyan birkában termelt anti-egér immunglobulin volt, melyet vas partikulumokkal konjugáltak (Dynabead M-450, birka, anti-egér IgG, Dynal, Norvégia). A Dynabead hozzáadása után a szuszpenziót ismét tört jégen rázattuk 30 percig. Ezután mágnessel eltávolítottuk azokat a sejteket, melyek HLA A, B vagy C antigéneket hordoznak a felszínükön. Mivel a cytotrophoblastok ilyen antigénekkal nem rendelkeznek, a szuszpenzióban maradtak. A cytotrophoblast sejteket 25 cm²-es tenyésztőpalackba (Greiner, Ausztria), illetve tárgylemez alapú tenézszelemba (Nunc, Dánia) szélesztettük (2,5x10⁵/cm²). A tenyésztés 2 mM glutaminnal és 15 % magzati borjúsavóval (fetal bovine serum; FBS) kiegészített KGM (keratinocyte growth medium, Clonetics, USA) tápfolyadékban történt. A sejtpopuláció tisztaságát indirekt immunfluoreszcenciás módszerrel ellenőriztük, cytokeratin-, vimentin-, CD3-, CD14-, CD31-, és CD68-specifikus monoklonális IgG ellenanyagok felhasználásával. A szeparált sejtek >99 % arányban cytokeratin-pozitívak voltak, gyakorlatilag tiszta cytotrophoblast tenyészeteket kaptunk. Mivel a KGM tápfolyadék olyan komponenseket (epidermális növekedési faktort, agyalapi mirigy kivonatot) is tartalmazott, melyek a cytotrophoblastok differenciálódását indukálják, a kultúrákban sejtfúziós folyamatok zajlottak le, a sejtek

kiszélesztését követő 5. napon a tenyészeteket sokmagvú óriássejtek (syncytiotrophoblastok) alkották. A kísérletek során ezeket az 5 napos ST kultúrákat használtuk.

I. 1. 2. A monocyta/macrophagok szeparálása és tenyésztése

A vírusok szaporításához a monocyták szeparálása perifériás vérből adherenciával történt.

Egészséges véradók perifériás vérének mononukleáris sejtjeit (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) Ficoll-Hypaque (Pharmacia) sűrűséggrádiens centrifugálással nyertük ki „buffy coat” (a vér alakos elemeit tartalmazó) preparátumokból. Ehhez a sűrített vért steril PBS-sel kétszeresére hígítottuk, majd Ficoll-Hypaque oldatra rétegeztük. Ezt követően a grádienseket 30 percig 4 °C hőmérsékleten centrifugáltuk 800 g sebességgel. A PBMC frakciót az interfázisból szívtuk le, majd PBS-sel kétszer mostuk. A sejteket 2 mM glutamint, 20 % FBS-t és antibiotikumokat tartalmazó RPMI tápfolyadékban vettük fel. A sejteket 25 cm² tenyésztőpalackba szélesztettük (5x10⁷/palack). Egy órás inkubálást (37 °C) követően eltávolítottuk a le nem tapadt sejteket. A letapadt sejtekre friss tápfolyadékot adtunk. A sejtpopulációk tisztaságát 72 óra múlva a nem specifikus észteráz aktivitás kimutatásával ellenőriztük, melyhez α -naftil-acetát észteráz (Sigma-Aldrich, USA) festést használtunk. A sejtek >99 %-a észteráz-pozitív volt. Vírustermeléshez 7 napos, monocyta eredetű macrophag kultúrákat fertőztünk.

Kísérleteinkhez a monocyták szeparálása Monocyta Negatív Izoláló Kittal történt (Dynal). Az előzőekben leírtak alapján nyert PBMC frakciót 0,1 % BSA-t tartalmazó PBS-ben vettük fel, majd blokkoló reagenst (a monocyták Fc receptorainak blokkolása végett), illetve antitest mixet (CD2, CD7, CD16, CD19, CD56 és CD235a elleni specifikus monoklonális ellenanyagokat) adtunk hozzá. A sejteket 4 °C-on 10 percig inkubáltuk, majd mosás után 0,1 % BSA-t tartalmazó PBS-ben vettük fel. A PBMC frakciót 4 °C-on 15 percig Dynabeads reagenssel inkubáltuk, végül az antitesttel jelölt sejteket mágnes segítségével eltávolítottuk. A megmaradó, negatívan izolált sejtek monocyták voltak, amit a sejtfelszíni monocyta-specifikus marker, a CD14 festésével (Chemicon, Ausztralia) állapítottunk meg. A sejtek HHV-6 specifikus DNS-re nézve negatívak voltak, amit nested polimeráz láncreakcióval (PCR) igazoltunk.

A monocytákat 2 mM glutamint, 20 % FBS-t, 100 U/ml penicillint és 100 μ g/ml streptomycint tartalmazó RPMI tápfolyadékban vettük fel (10⁶ sejt/ml). A sejteket 24 lyukú (Greiner), illetve Sonic Seal Slide Wells (Nunc) tenyésztőedénybe 1,5x10⁶ sejt/lyuk koncentrációban mértük be. Ahhoz, hogy a sejtek differenciálódását elősegítsük, 24 órán át

olyan tápfolyadékban inkubáltuk, amit 5 µg/ml phytohemagglutininnel (Sigma-Aldrich) stimulált PBMC sejtekről nyertünk. A kísérletekhez 7 napos, monocyta eredetű macrophag kultúrákat használtunk.

I. 1. 3. Sejtvonalak

A lymphoid H9 (Popovic et al., 1984), CEM-SS (Nara et al., 1987) és HSB-2 (Adams et al., 1968) sejteket 10 % FBS-t, 2 mM glutamint, 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint tartalmazó RPMI tápfolyadékban tartottuk fenn.

I. 2. Vírusok

A HHV-6A GS törzsét (Salahuddin et al., 1986) HSB-2 sejtekben szaporítottuk. A kultúrákat 2 mM glutamint, 10 % FBS-t, 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint tartalmazó RPMI médiumban tartottuk fenn. A kultúrák felülúszójának összegyűjtése akkor történt, amikor a sejtek többsége citopátiás hatást mutatott (rendszerint a 8. napon). A felülúszókat 4 °C-on 10 percig 1000 g-vel centrifugáltuk, majd 0,45 µm pórusnagyságú szűrőn átszűrtük és ultracentrifugáltuk (1 óra, 4 °C, 142000 g). Az üledéket friss tápfolyadékban vettük fel a kiindulási térfogathoz képest 20-szorosra koncentrálnak. A víruspreparátumokat felhasználásig -70 °C-on tartottuk.

A HIV-1 R5 variánsának Ada-M (Gendelman et al., 1988) és Ba-L törzsét (Gartner et al., 1986) monocyta-eredetű macrophagokban szaporítottuk. Az X4 variáns IIIB törzsét (Gallo et al., 1984) H9 sejtekben szaporítottuk. A kultúrák felülúszóinak összegyűjtése a fent leírtak szerint történt akkor, amikor a vírusok folyamatosan ellenőrzött titere elérte a felhasználni kívánt értéket. A vírusokat -70 °C-on tároltuk.

I. 3. Vírusok titrálása

A HHV-6A infektív titerét HSB-2 monolayereket használva (Asada et al., 1989), határoztuk meg. Ennek során a 96 lyukú tenyésztőlemezt (Greiner) 50 µg/ml-es koncentrációjú poli-L-lizinnel (Sigma-Aldrich) inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten (50 µl/lyuk). Ezt követően a lemezt kétszer mostuk PBS-sel, majd kiszélesztettük a HSB-2 sejteket 5×10^5 sejt/ml-es koncentrációban (100 µl/lyuk). 30 perces, 37 °C-on történő inkubálás után a tápfolyadékot leszívtuk, majd az ilyen módon letapadt sejtekre mértük az előzetesen

nem komplettált tápfolyadékkal hígított vírusszuspenziót (100 µl/lyuk). 1 óráig, 37 °C-on történő inkubálás után a vírus leszívását követően 10 % FBS-t tartalmazó RPMI tápfolyadékot adtunk a sejtekre (100 µl/lyuk). A titeret fókuszképző egységekben (FFU) adtuk meg.

A szüretelt sejtfejlésű szobában a HIV-1 IIIB és Ba-L törzse esetén a titer meghatározásához p24 antigén-ELISA és syncytiumképző vizsgálatot használtunk. Az Ada-M törzset pedig a virionok reverz transzkriptáz (RT) aktivitásának mértéke alapján titráljuk (Hoffman et al., 1985).

A vírusspecifikus p24 antigén mennyiségi meghatározása ELISA kittel (Beckman Coulter, USA), a gyártó utasításai alapján történt.

A Ba-L törzs infektív titerét monocytá eredetű macrophag kultúrán (Wu et al., 1996), míg a IIIB törzset CEM-SS sejteken (Nara et al., 1987) határoztuk meg. A HIV titerét syncytium-képző egységek (syncytium forming unit; SFU) száma alapján 1 ml vírusszuspenzióra vonatkoztatva adtuk meg.

A reverz transzkriptáz (RT) aktivitásának mérése az alábbiak szerint történt: első lépésként az 500 µl mintákat 500 µl RPMI tápfolyadékkal egészítettük ki, és magas fordulatszámmal (3500 g, 10 perc) lecentrifugáltuk. A felülúszóból 800 µl-t kivettünk, melyhez 400 µl polietilén-glikol-NaCl oldatot (27 % PEG, 0,3 M NaCl) adtunk. Az elegyet egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk, majd másnap a fehérjékkel együtt kicsapott vírust lecentrifugáltuk (2000 g, 15 perc). A virionok feltárása céljából az üledékhez 50 µl lízispuffert adtunk, melynek összetétele a következő volt: 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM ditiotritol, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,05 % Triton X-100, 0,5 mM EDTA, 34,8 % glicerin. A mintákat a lízispufferrel tört jégen inkubáltuk 20 percig, majd azokból 10 µl-t kivettünk, és 40 µl reakcióelegyet adtunk hozzá, melynek komponensei az alábbiak voltak: 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM ditiotritol, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,05 % Triton X-100, 0,5 mM EDTA, 0,3 mM glutation, 2 µM TTP, 3,75 µM ³H-TTP és 20 µg/ml poli(rA)oligo(dT)₁₂₋₁₈ templát. A minták és a reakcióelegy keverékét 1 óráig át 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően minden csőből 30 µl-t Whatman szűrőpapír-korongra cseppentettünk – melyet előzetesen 10 mM Na-pirofoszfát oldatban impregnáltunk –, és a mintákat szobahőmérsékleten 1 óráig át szárítottuk. Ezután a filtereket 5 %-os triklórecetsav oldatban háromszor 5 percig, majd 96 %-os etil-alkoholban 1 percig mostuk. A nedves filtereket szárítószekrényben 30 °C-on megszáritottuk, majd egyenként 7-7 ml szcintillációs folyadékba (0,4 % 2,5-difeniloxazol toluolban) helyeztük. A minták radioaktivitását megmértük, és a bennük lévő vírus titerét cpm/ml (count per minute/ml) egységben kifejezve adtuk meg.

I. 4. Syncytiotrophoblastok fertőzése

I. 4. 1. Syncytiotrophoblastok fertőzése HIV-1-gyel, illetve HHV-6A-val

Kísérleteinkhez 5 napos ST kultúrákat fertőztünk. Először eltávolítottuk a sejtekről a tápfolyadékot, majd háromszor mostuk nem kiegészített KGM tápfolyadékkal. A fertőzés multiplicitása HIV-1 esetén 1 SFU/sejt, míg HHV-6A esetén 1 FFU/ml volt, melyet a kiszélesztett cytotrophoblastok számának megfelelően állapítottunk meg. A vírussuszpenzió hozzáadását követően a sejteket 1 órán át inkubáltuk 37 °C-on. Ezt követően a kultúrákat alaposan, ötször mostuk nem kiegészített KGM tápfolyadékkal. Végül fele részben friss, fele részben lecentrifugált (300 g, 10 perc), régi, 2 mM glutamint, 15 % FBS-t és antibiotikumokat tartalmazó KGM tápfolyadékot adtunk a sejtekre.

I. 4. 2. Koinfekció

Ennek során az 5 napos syncytiotrophoblastokat vagy szimultán fertőztük HIV-1-gyel és HHV-6A-val, vagy az egyik vírussal történő fertőzést a másikkal való infekció 3 nap múlva követte. A fertőzést az előzőekben leírtak szerint végeztük.

I. 5. A macrophagkultúrák fertőzése

A kísérletekhez 7 napos, monocyta eredetű macrophagkultúrákat fertőztünk 24 lyukú tenyésztőedényben. A fertőzés multiplicitása a HHV-6A esetében 1 FFU/sejt volt. HIV esetén 150000 cpm/ml titerű vírusból minden lyukhoz 100 µl-t adtunk. A fertőzés menete a következő volt: a vírussuszpenzió hozzáadását követően a sejteket 2 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, majd a kultúrákat háromszor mostuk nem kiegészített RPMI tápfolyadékkal. Végül friss, 20 % FBS-t tartalmazó RPMI tápfolyadékot adtunk a sejtekre.

A kettős fertőzések szimultán módon történtek. Ekkor a macrophagokat 2 órán keresztül inkubáltuk HHV-6A-val, majd háromszori mosás után 2 órán át HIV-1-gyel, végül újabb háromszori mosás után friss, 20 % FBS-t tartalmazó RPMI tápfolyadékot adtunk a sejtekhez.

I. 6. Immunszérumok és konjugátumok

A HHV-6A 37 kDa korai (early, E) és p135, illetve p150 késői (late, L) antigének elleni, valamint a macrophagokon expresszáldó CCR5 elleni egér monoklonális ellenanyagokat (MAb) a Biodesign cégtől vásároltuk (USA). A HIV-1 Tat és p24 antigénekre specifikus, nyúlban termelt ellenanyagokat az AIDS Research and Reference Reagent Program (Division of AIDS Program, NIAID, NIH, USA) révén kaptuk.

A monocyta-specifikus sejtfelszíni CD14 marker elleni MAb-ot a Chemicon (Ausztrália) cégtől vásároltuk.

Az egér anti-CD4 MAb a Becton Dickinson (USA) cég, az anti-CXCR4 és anti-CCR5 egérben termelt MAb-ok az R&D Systems (USA) termékei, míg az egér anti-CCR3 MAb a LeukoSite (USA) terméke volt.

Az ST sejtek esetén használt fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelzett, nyúlban termelt, anti-egér és a sertésben termelt anti-nyúl immunglobulin (Ig) a Dako cégtől származott. A TRITC-cel (tetrametilrodamin-izotiocianát) jelzett, kecske, anti-egér Ig konjugátumot, illetve a macrophagok esetében a szekunder ellenanyagként használt FITC-cel konjugált, Fc specifikus, kecskében termelt anti-egér Ig-t a Sigma-Aldrich-től vásároltuk.

1. 7. Immunfluoreszcens technikák

A virális fehérjék expresszióját indirekt citoplazma immunfluoreszcenciával (IFA) mutattuk ki. Ezekhez a vizsgálatokhoz az ST sejteket tárgylemez alapú palackban, a macrophagokat Sonic Seal Slide Wells edényen tenyésztettük és fertőztük. A sejt kultúrákról a tápfolyadékot leszívtuk, háromszor mostuk PBS-sel, majd 80 %-os jéghideg acetonnal a tárgylemezre fixáltuk. Ezután háromszor PBS-sel, kétszer 1 % FBS tartalmú PBS-sel (PBS-FBS) mostuk 5-5 percig. Az E és L antigénekre specifikus, az anti-Tat és anti-p24, illetve az anti-CD4 és a koreceptorok elleni primer ellenanyagokkal a sejteket szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk, majd háromszor, 5-5 percig mostuk PBS-FBS-ben. Ezt követően a megfelelő konjugátumot adtuk a mintákhoz, és azokat újabb 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Háromszori PBS-sel történő mosást követően a preparátumokat ragasztó géllal (DAKO) és fedőlemezzel lezártuk, majd fluoreszcens mikroszkópban (Leitz Orthoplan, Németország) értékeltük.

A HHV-6 E antigén és HIV-1 p24 antigén koexpressziójának vizsgálatához kettős, indirekt immunfluoreszcenciás vizsgálatot végeztünk. Ennek kivitelezése során kétféle szekunder konjugátumot használtunk. Az E antigénre specifikus, egér MAb-hoz FITC-cel jelölt nyúl, anti-egér, míg a poliklonális, nyúl, anti-p24 ellenanyaghoz TRITC-cel konjugált sertés, anti-nyúl Ig-t kötöttünk. A FITC konjugátumok esetén az excitációs fény hullámhossza 495 nm, az emittált fényé pedig 525 nm volt. A TRITC-cel konjugált minták esetén a gerjesztő fény hullámhossza 555 nm, míg a kibocsátotté 570 nm volt.

A transzfektált ST sejtekben a HHV-6A IE fehérjéinek jelenlétét Eizuru és Minamishima (Eizuru and Minamishima, 1992) leírása alapján végeztük. A sejteket hővel

inaktivált (56 °C, 30 perc) és tengerimalac komplementtel telített humán szérummal 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd háromszor mostuk PBS-FBS-sel. A FITC-cel konjugált másodlagos ellenanyaggal szintén 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Háromszori PBS-sel történő mosást követően a preparátumokat ragasztó géllal és fedőlemezzel lezártuk, majd fluoreszcens mikroszkópban értékeltük.

A monocyta-specifikus sejtfelszíni marker, a CD14 expresszióját indirekt, membrán immunfluoreszcenciával (IFA) mutattuk ki egérből származó, monoklonális ellenanyag segítségével. Ehhez a negatívan, frissen izolált monocytákat háromszor mostuk PBS-FBS-sel. A primer ellenanyaggal a sejteket 4 °C-on 30 percig inkubáltuk, majd háromszor mostuk PBS-FBS-ben. A FITC-cel konjugált másodlagos ellenanyaggal a sejteket 30 percig inkubáltuk 4 °C-on. Háromszori, PBS-sel történő mosást követően a sejteket cytospinnel (Shandon, USA) tárgylemezre centrifugáltuk (900 rpm, 3 perc). A preparátumokat fedőlemezzel lezártuk, majd fluoreszcens mikroszkópban (Axioscop, Zeiss, Németország) értékeltük.

I. 8. Transzfecció

Az ST sejteket a HHV-6A IE régiójának nyitott leolvasási kereteit (open reading frame, ORF) kódoló plazmidokkal transzfeccióztuk. A pHV6U86 plazmid az IE-A régió U86 ORF-ét kódolta pBluescript vektorba klónozza (Flamand et al., 1998). A pBC-ORF expressziós plazmid az IE-A régió teljes U89 ORF-ét hordozta pBC/CMV plazmidba klónozza (Martin et al., 1991). A HHV-6A IE-B régiójának ORF-eit, az U16-U17-et, illetve az U18-U19-et a pUC19 vektorba klónozza a pIEGP2-3' és a pIEGP1-2 plazmidok kódolták (Nicholas and Martin, 1994). Kontrollként az üres vektorokat használtuk.

A trophoblast sejteket 3 nappal a transzfecció előtt 35 mm átmérőjű tenyészedénybe szélesztettük. A tranziens transzfecciót egy korábbi tanulmány alapján (Felgner et al., 1987) lipofectin módszerrel végeztük. A kultúrákat kétszer mostuk szérummentes OptiMEM tápfolyadékkal (Invitrogen, USA), majd az ST sejtekhez adtuk a DNS-lipid komplexet. Ez 1 ml szérummentes OptiMEM tápfolyadék 0,5-2,5 µg plazmidot, illetve 1,2-6,0 µl lipofectin reagenst (Invitrogen) tartalmazott. A sejteket 16 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Ezután a tápfolyadékot leszívtuk, a sejteket szérummentes tápfolyadékkal mostuk, végül 4 ml kiegészített KGM tápfolyadékot adtunk hozzájuk.

I. 9. Polimeráz láncreakció (PCR)

A virális DNS izolálása a sejtekből és a kultúrák tisztított (10 perc centrifugálás, 1000 g, 4 °C) felülúszójából High Pure Viral Nucleic Acid Kittel (Roche) történt a gyártó utasításai szerint.

A nested PCR eljárást 50 µl végtérfogatban végeztük, amely 2 µl DNS izolátumot, 25 µl RedTaq Ready Mix-et (Sigma-Aldrich) és 25-25 pmol primert tartalmazott. A felhasznált primerek szekvenciája és a reakció körülményeinek leírása Yalcin és munkatársaitól származik (Yalcin et al., 1994). A reakció második körében templátként az első körben nyert PCR-termék tízszeres hígítását használtuk.

I. 10. Kemokinek mennyiségének meghatározása

Az IL-8 és a RANTES ürítés mérése a fertőzött és a fertőzetlen tenyészetek felülúszóiból ELISA kittel (R&D Systems) történt a gyártó által meghatározott irányelvek szerint.

I. 11. Intracelluláris kalcium mérése

A macrophagokban a RANTES által kiváltott Ca^{2+} mobilizációt kétféle módszerrel vizsgáltuk.

Egyedi sejteken a RANTES hatására bekövetkező intracelluláris kalcium koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) változását egy korábbi leírás alapján mértük (Cseri et al., 2002). A fertőzetlen és HHV-6A-val fertőzött macrophagokat fedőlemezen tenyészettük. A sejteket PBS-sel mostuk, majd 10 µM fura-2AM-et (Molecular Probes, USA) és 0,02 % pluronic-ot (Sigma-Aldrich) tartalmazó RPMI tápfolyadékkal 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Inkubálás után a festékkel feltöltött sejteket kétszer alaposan mostuk PBS-sel. A mérés inverz fluoreszcens mikroszkóppal (Diaphot, Nikon, Japán) történt. Az excitációs hullámhosszt 340 és 380 nm közt változtattuk egy kettős monokromátor és egy online kapcsolt mikrokomputer segítségével (Deltascan, Photon Technology International, USA). A fluoreszcens emissziót 510 nm-en detektáltuk 10 Hz/hányados adatvételi gyakorisággal egy fotoelektron-sokszorozó segítségével. A $[Ca^{2+}]_i$ -t egy korábbi publikáció alapján (Grynkiewicz et al., 1985) számoltuk.

A RANTES által okozott $[Ca^{2+}]_i$ növekedést fertőzetlen és HHV-6A-val fertőzött macrophag populációkban FluroMax Spectrofluorimeterrel (Spex Industries, USA) mértük. Ebben az esetben a fura-2AM-mel feltöltött, PBS-sel mosott sejteket a tenyészedényről

sejtkaparóval óvatosan felkapartuk, majd PBS-ben 10^6 sejt/ml koncentrációban szuszpendáltuk. A mérést küvettában 2×10^6 sejten végeztük. A 340 és 380 nm-es gerjesztésen mért fluoreszcencia intenzitások arányát (R340/380) hasonlítottuk össze.

I. 12. Fluorocytometriás vizsgálatok

Fertőzetlen és HHV-6A-val fertőzött macrophagok CCR5 receptor-expresszióját fluorocytometriával vizsgáltuk. Az immunfluoreszcens festéshez a sejteket sejtkaparóval óvatosan felválasztottuk a tenyészedényről, majd háromszor hideg PBS-FBS-sel mostuk. Az IFA-t a CD14 jelölés esetén leírtak alapján végeztük. A jelölt sejteket 4 % paraformaldehidben fixáltuk. A méréseket FACScan analizátorral és CellQuest Software-rel (Becton Dickinson, USA) végeztük.

I. 13. Statisztikai elemzés

Az adatokat SPSS statisztikai programcsomaggal (SPSS Incorporated, USA), t-próba segítségével hasonlítottuk össze.

EREDMÉNYEK

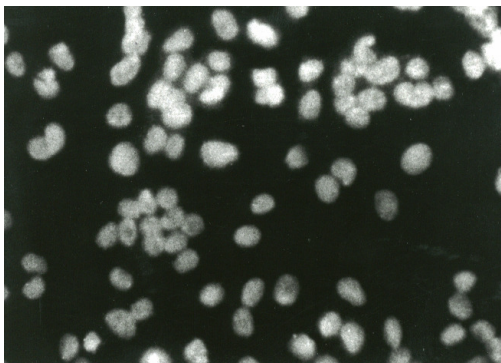
Vizsgálatainkat 5 különböző placentából szeparált sejteken végeztük el. Mivel a kísérletek eredményei hasonlóak voltak, így ezek közül az alábbiakban egy reprezentatív vizsgálatsorozat szerepel.

I. 1. HHV-6A és HIV-1 fertőzőképességének vizsgálata syncytiotrophoblast sejteken

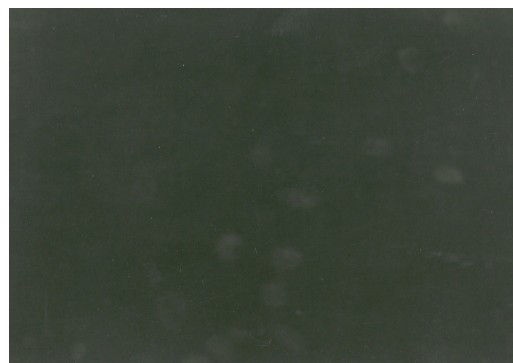
Kísérleteink során először azt kívántuk tisztázni, hogy a HHV-6A képes-e produktívan fertőzni az ST sejteket. Ehhez 5 napos trophoblast kultúrákat fertőztünk HHV-6A-val, majd indirekt citoplazma IFA-val vírusspecifikus antigének jelenlétét vizsgáltuk a fertőzött tenyészetekben. A fertőzést követő 24. órában az ST sejtek magjában megjelent az E antigén, ami a 10. napig volt kimutatható. A fluoreszcens jel intenzitása a 4. napon érte el maximumát (**1. ábra**), ekkor a sejtek mintegy 65 %-a volt pozitív. Azonban sem késői fehérjéket, sem pedig infekzív viriont a kísérlet 22 napja alatt nem észleltünk. Nem tudtunk Tat és p24 antigént, illetve fertőzőképes vírust kimutatni azon ST sejtek felülűszójában sem, melyeket HIV-1_{Ba-L}-lal vagy HIV-1_{IIIb}-vel fertőztünk. Az ST sejtek tehát fertőzhetők mind HHV-6A-val, mind pedig HIV-1-gyel, ám a replikációs ciklus egyik esetben sem produktív, infekzív virionok nem ürülnek.

1. ábra: HHV-6A korai antigén kimutatása indirekt immunfluoreszcenciával a fertőzött syncytiotrophoblastokban (400 X nagyítás)

HHV-6A-val fertőzött sejtek



fertőzetlen sejtek



I. 2. HIV-1-gyel és HHV-6A-val történt kettős fertőzés hatása a vírusok replikációjára syncytiotrophoblastokban

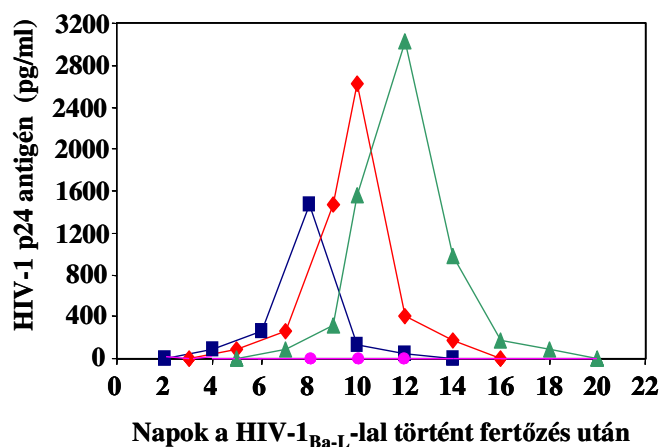
A koinfekciós kísérletek során az 5 napos ST sejteket vagy szimultán fertőztük HIV-1-gyel és HHV-6A-val, vagy az egyik vírussal történő fertőzést a másikkal való infekció 3 nap múlva követte. Majd ELISA módszerrel vizsgáltuk a kultúrák felülúszójában a p24 antigén mennyiségét. A HIV-1 Ba-L törzsével és a HHV-6A-val történő koinfekció eredménye a **2. A ábrán** látható. HHV-6A hatására a HIV-1 replikációs ciklusa produktívvá vált, hiszen valamennyi esetben tudtunk p24 antigént kimutatni a kultúrák felülúszójában. A legnagyobb titert abban az esetben értük el, ha a HIV-1-gyel fertőzött kultúrát 3 nap múlva fertőztük felül HHV-6A-val, míg a legkisebbet akkor, ha az előfertőzés a HHV-6A-val történt. Annak eldöntésére, hogy valóban infektiós virionok ürülnek-e, syncytiumképző vizsgálatot végeztünk (**2. B ábra**). A grafiknról leolvasható, hogy valamennyi esetben fertőzőképes HIV-1 virionok ürültek. Ugyanezeket tapasztaltuk a HIV-1_{IIIb} esetében is (**3. A és B ábrák**).

2. ábra: HIV-1_{Ba-L}-lal és HHV-6A-val történt kettős fertőzés hatása a HIV-1 replikációjára syncytiotrophoblastokban

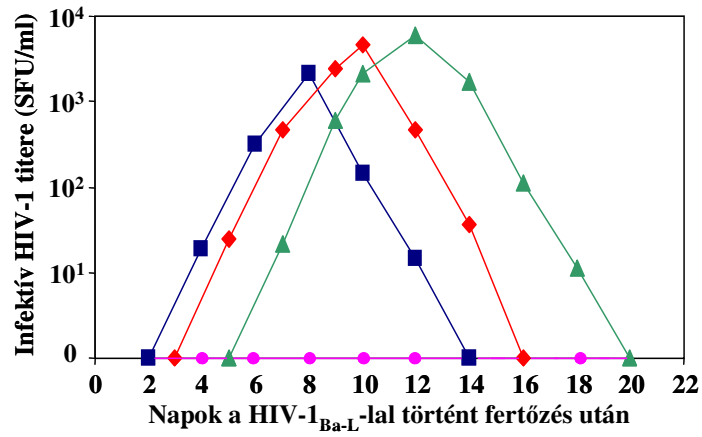
Jelmagyarázat:

- ◆ : szimultán fertőzés
- : előfertőzés HHV-6A-val, majd 3 nap múlva felülfertőzés HIV-1_{Ba-L}-lal
- ▲ : előfertőzés HIV-1_{Ba-L}-lal, majd 3 nap múlva felülfertőzés HHV-6A-val
- : HIV-1_{Ba-L}-lal fertőzött, kontroll tenyészet

2. A ábra: p24 antigén titere a kultúrák felülúszójában



2. B ábra: Infektív HIV-1 titere a kultúrák felülúszójában

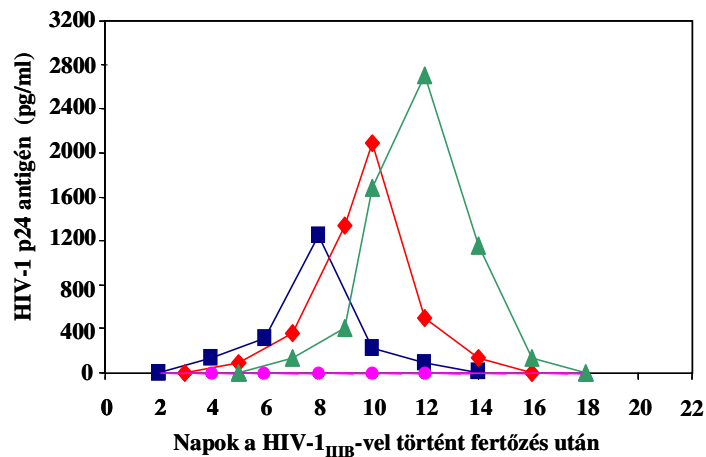


3. ábra: HIV-1_{III-B}-vel és HHV-6A-val történt kettős fertőzés hatása a HIV-1 replikációjára syncytiotrophoblastokban

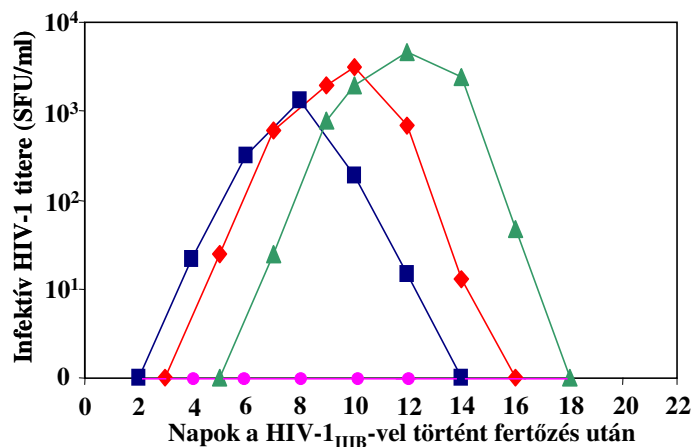
Jelmagyarázat:

- ♦ : szimultán fertőzés
- : előfertőzés HHV-6A-val, majd 3 nap múlva felülfertőzés HIV-1_{III-B}-vel
- ▲ : előfertőzés HIV-1_{III-B}-vel, majd 3 nap múlva felülfertőzés HHV-6A-val
- : HIV-1_{III-B}-vel fertőzött, kontroll tenyészet

3. A ábra: p24 antigén titere a kultúrák felülúszójában



3. B ábra: Infektív HIV-1 títtere a kultúrák felülúszójában

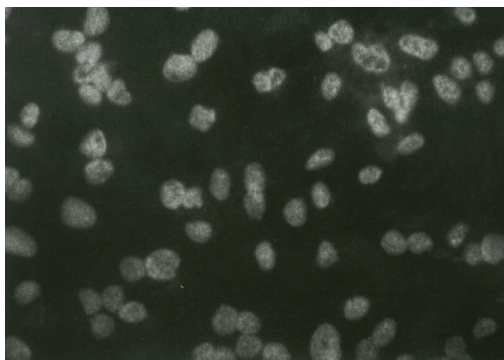


Annak eldöntésére, hogy a kettősen fertőzött kultúrák HIV-1 termelése az infektív HHV-6A virionoknak köszönhető-e, hővel inaktivált (1 óra, 56 °C) HHV-6A-val is elvégeztük a kettős fertőzéseket. Mivel ebben az esetben sem infektív HIV-1 virionokat, sem p24 antigént nem tudtunk kimutatni, feltételezhetően aktív HHV-6A expresszió szükséges a HIV-1 szaporodásához.

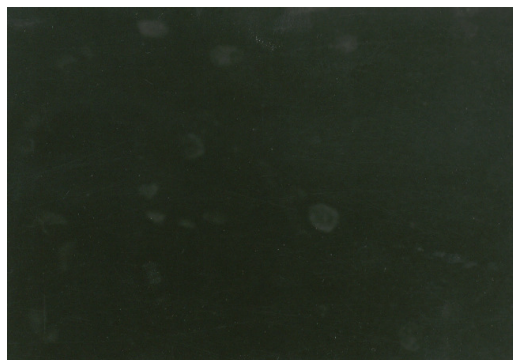
A szimultán fertőzött koinfekciós kultúrában a fertőzést követően indirekt immunfluoreszcenciás módszerrel vizsgáltuk a HIV-1 Tat fehérje jelenlétét. A vírusspecifikus antigént már a fertőzést követő 32. órában ki tudtuk mutatni (**4. ábra**), ami arra utal, hogy a HHV-6A valószínűleg a HIV-1 replikációjának korai fázisában fejti ki stimuláló hatását.

4. ábra: Tat protein kimutatása indirekt immunfluoreszcenciával a kettősen fertőzött syncytiotrophoblastokban (400 X nagyítás)

kettősen fertőzött sejtek



HIV-1-gyel fertőzött sejtek

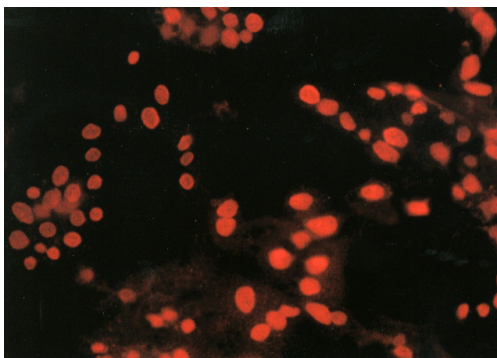


Ugyanakkor a HIV-1 nem befolyásolta a HHV-6A szaporodását, hiszen sem L antigént, sem pedig infektív HHV-6A virionokat nem tudtunk kimutatni ezekben a kettősen fertőzött kultúrákban.

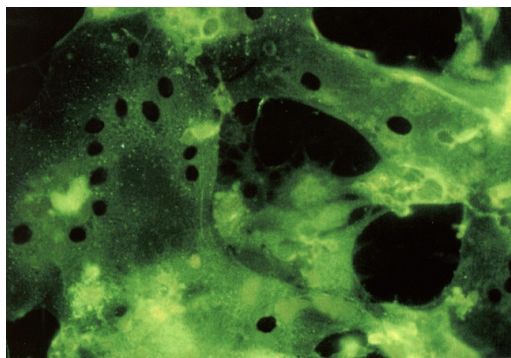
Ezt követően kettős immunfluoreszcenciás vizsgálattal detektáltuk a HIV-1 p24 és a HHV-6A korai antigén együttes jelenlétét a mindkét vírussal fertőzött ST sejtekben 7 nappal a fertőzést követően (**5. ábra**).

5. ábra: HIV-1-specifikus p24 protein és HHV-6A E antigén szimultán kimutatása kettős immunfluoreszcenciával a koinfekciós tenyészetben (200 X nagyítás)

HHV-6A E antigén a kettősen fertőzött sejtek magjában



HIV-1 p24 fehérje a kettősen fertőzött sejtek citoplazmájában



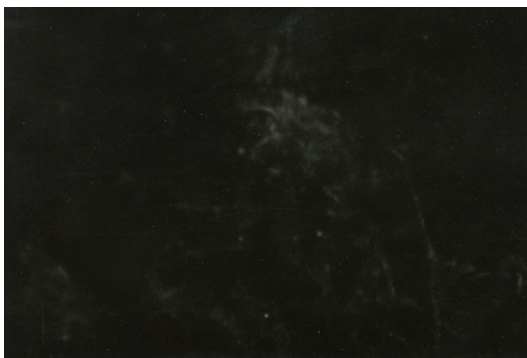
I. 3. Felszíni molekulák expressziójának vizsgálata fertőtlen és fertőzött syncytiotrophoblast sejteken

A kísérlet következő szakaszában azt vizsgáltuk, hogy a HHV-6A vajon a sejt felszíni molekulák expressziójának befolyásolása révén, a HIV-1-re fogékony sejtek számának növelésével hat-e a HIV-1 replikációjára. Először indirekt immunfluoreszcenciával fertőtlen ST sejteken vizsgáltuk a CD4, CXCR4, CCR5 és CCR3 molekulák jelenlétét. (**6. ábra**). A képeken jól látszik, hogy CD4 és CCR5 receptor nincs az ST sejteken, míg CXCR4 és CCR3 kimutatható.

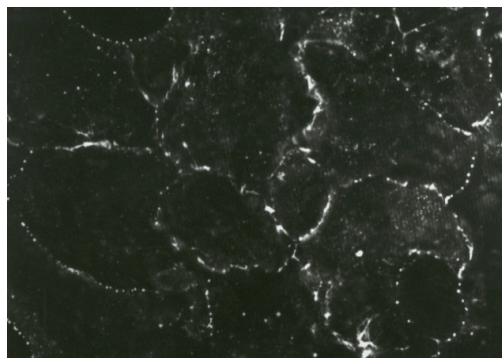
Ezt követően fertőzött sejteken vizsgáltuk ugyanezen molekulák jelenlétét. Sem a HIV-1-vel, sem a HHV-6A-val, sem pedig a kettősen fertőzött sejteken nem tapasztaltunk változást.

6. ábra: CD4, CXCR4, CCR3 és CCR5 felszíni molekulák kimutatása indirekt immunfluoreszcenciával a fertőzetlen syncytiotrophoblastokon (100 X nagyítás)

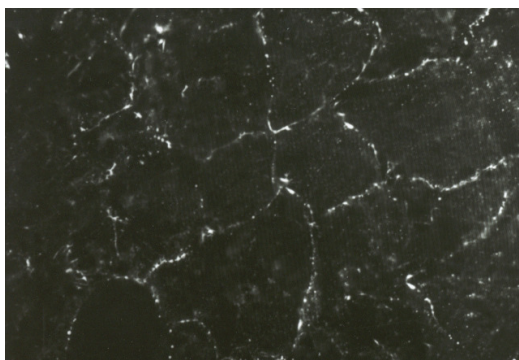
CD4



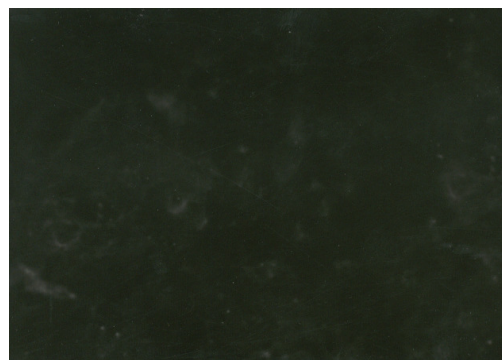
CXCR4



CCR3



CCR5



A következő lépésben blokkolós kísérleteket végeztünk. Ennek során a HHV-6A-val fertőzött ST sejteket 3 nap múlva felülfertőztük a HIV-1 Ba-L, illetve IIIB törzsével, miközben anti-CXCR4, anti-CCR3 és anti-CCR5 MAb-okat adtunk a kultúrákhoz külön-külön, illetve anti-CD4 ellenanyaggal kombinálva. A blokkoló ellenanyagokat 20 µg/ml-es koncentrációban 1 órán át, 37 °C-on inkubáltuk a tenyészetekkel a HIV-1-gyel történő fertőzés előtt. Kontrollként normál, egér IgG-t használtunk. Ezután vizsgáltuk a felülúszók infektív HIV-1 titerét (**I. táblázat**). A táblázatból jól látszik, hogy egyik receptor blokkolása sem gátolta a trophoblastok HIV-1-gyel történő fertőződését. Ez összhangban van azzal a ténnyel, hogy a trophoblastok felszínén nem található CD4, illetve CCR5 receptor; valamint

egy korábbi eredményünkkel is, miszerint a HIV-1 IIIB és Ba-L törzsek sem CD4, sem pedig kemokin receptorokat nem használnak az ST sejtek fertőzése során.

I. táblázat: *Infektív HIV-1 titere CD4-, CXCR4-, CCR5- és CCR3-specifikus ellenanyagokkal kezelt, kettősen fertőzött sejtek felülszójában*

HIV-1 titere (SFU/ml) az alábbi vírusokkal fertőzött sejtek felülszójában		
	HIV-1 _{IIIB}	HIV-1 _{Ba-L}
Ellenanyagok		
nem kezelt	3×10^3	$1,7 \times 10^3$
anti-CD4	$1,6 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$
anti-CXCR4	$1,8 \times 10^3$	nem végeztük
anti-CCR5	nem végeztük	$3,3 \times 10^3$
anti-CCR3	$1,6 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$
anti-CD4 és anti-CXCR4	$1,9 \times 10^3$	nem végeztük
anti-CD4 és anti-CCR5	nem végeztük	$3,0 \times 10^3$
anti-CD4 és anti-CCR3	$1,6 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$
normál, egér IgG	$1,5 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$

I. 4. A HHV-6A transzaktivátor géntermékeinek hatása a HIV-1 replikációjára

Az előző kísérlet eredményei alapján az ST sejtekben a HHV-6A nem a HIV-1-gyel szembeni fogékonyságot növelve fejt ki stimuláló hatását. Feltételezéseink szerint a HHV-6A transzaktiváló géntermékeinek lehet ebben szerepe. Ezért olyan kísérleteket végeztünk, melyekben az ST sejteket a HHV-6A IE-A és IE-B régiójának ORF-eit hordozó plazmidokkal transzfektáltuk, majd 48 óra elteltével HIV-1-gyel fertőztük. Ezután harmadnaponként 22 napig vizsgáltuk a kultúrák infektív HIV-1 termelését.

A transzfekció hatékonyságát 48 óra elteltével immunfluoreszcenciával ellenőriztük, kontrollként HHV-6A-val fertőzött HSB-2 sejteket használtunk. Az 1,5 µg/ml koncentrációjú, a HHV-6A génjeit kódoló plazmidokkal transzfektált sejtek esetében az antigénpozitív sejtek

aránya 44-51 % volt. A kontrollként alkalmazott „üres” vektorok esetén fluoreszcens jelet nem tapasztaltunk.

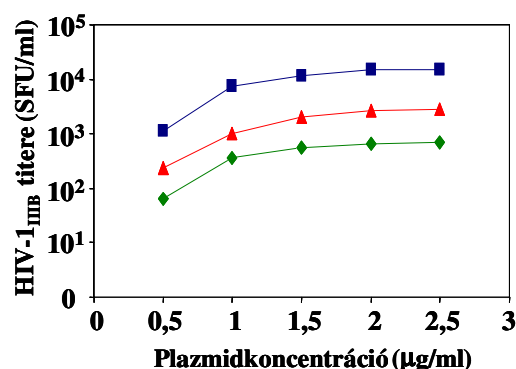
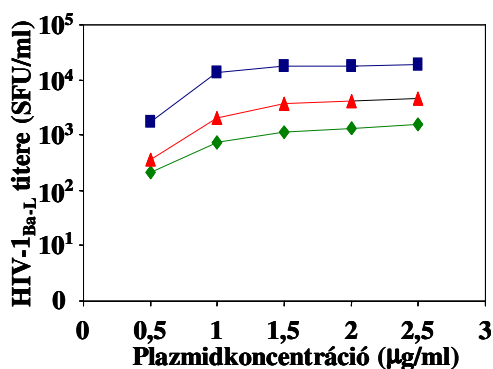
A kísérletek első szakaszában az ST sejteket U86 és U89 géntermékeket expresszáló plazmidokkal külön-külön, illetve együttesen is transzfektáltuk. Mind a HIV-1_{III_B}-vel, mind pedig a HIV-1_{Ba-L}-al fertőzött sejtek esetében már 0,5 µg/ml plazmidkoncentráció esetén jelentős mennyiségű infekzív HIV-1 virion ürült, aminek mennyisége mintegy tízszeresre emelkedett a plazmidkoncentráció 1,5 µg/ml-re emelésével (**7. ábra**). Az U89 géntermék önmagában kevésbé volt hatékony, ellenben az U86 géntermékkel együtt szinergista hatásúnak bizonyult. A kontroll plazmidokkal transzfektált, majd HIV-1-gyel fertőzött sejtek felülúszójában HIV-1 nem volt kimutatható.

A kísérleteket az IE-B régió ORF-eit tartalmazó plazmidokkal is elvégeztük. A kultúrák felülúszójában mindkét HIV-1 törzs esetén infekzív virionokat tudtunk kimutatni, melynek mennyisége 2 µg/ml-es plazmidkoncentráció esetében érte el a maximumot (**8. ábra**). A két plazmiddal együttesen transzfektált kultúrák esetében azonban nem tapasztaltunk nagyobb mértékű HIV-1 termelést az egy-egy génterméket expresszáló sejtekhez képest. A kontroll plazmidokkal transzfektált, HIV-1-gyel fertőzött ST sejtek felülúszójából vírust nem tudtunk kimutatni.

7. ábra: HHV-6 IE-A géntermékek hatása a HIV-1 replikációjára fertőzött syncytiotrophoblastokban

Jelmagyarázat:

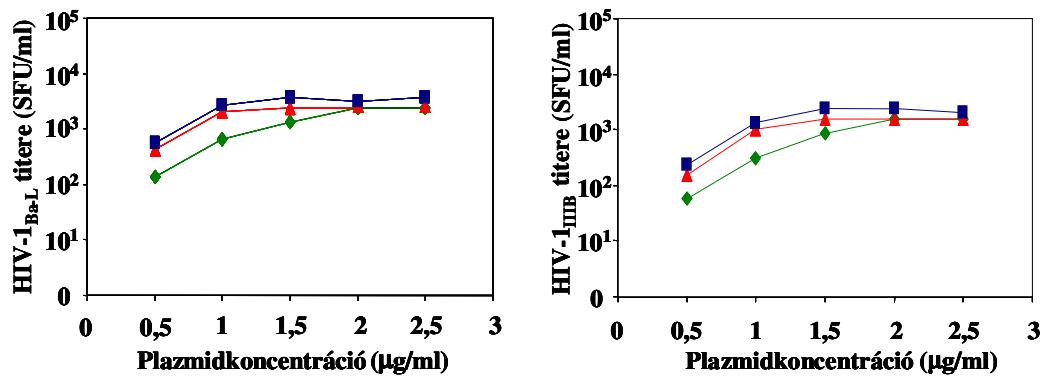
- : IE-A U86 és U89 ORF-et hordozó plazmiddal kotranszfektált sejtek HIV-1-gyel fertőzve
- ▲ : IE-B U86 ORF-et hordozó plazmiddal transzfektált sejtek HIV-1-gyel fertőzve
- ◆ : IE-B U89 ORF-et hordozó plazmiddal transzfektált sejtek HIV-1-gyel fertőzve



8. ábra: HHV-6 IE-B géntermékek hatása a HIV-1 replikációjára fertőzött syncytiotrophoblastokban

Jelmagyarázat:

- : IE-B U16-U17 és U18-U19 ORF-et hordozó plazmiddal kotranszfektált sejtek HIV-1-gyel fertőzve
- ▲ : IE-B U18-U19 ORF-et hordozó plazmiddal transzfektált sejtek HIV-1-gyel fertőzve
- ◆ : IE-B U16-U17 ORF-et hordozó plazmiddal transzfektált sejtek HIV-1-gyel fertőzve



II. 1. A HHV-6A szuppresszálja a HIV-1 replikációját macrophagokban

A HHV-6A HIV-1 replikációra kifejtett hatását 7 napos, monocytá eredetű macrophagokon vizsgáltuk, az eredmények a **9. ábrán** láthatóak.

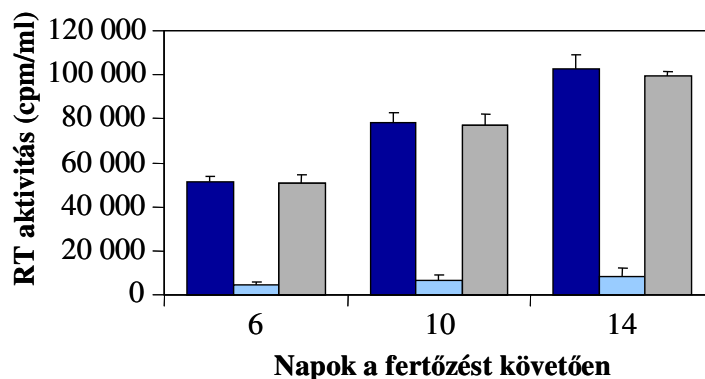
A HIV-1 RT aktivitását először a fertőzést követően 6 nappal mértük a csak HIV-1-gyel, és a HHV-6A-val és HIV-1-gyel kettősen fertőzött tenyészetekben. A kísérletek időtartama alatt a szimultán kettősen fertőzött macrophagok esetén a HIV-1 replikációja szignifikánsan ($n=5$, $p<0,05$) lecsökkent a csak HIV-1-gyel fertőzött sejtekhez képest. A kettősen fertőzött sejtek életképessége a csak Ada-M-mel fertőzöttekhez képest nem különbözött.

Ahhoz, hogy megállapíthassuk, a szuppresszív hatás az infektiós HHV-6A virionoknak köszönhető-e, kontrollként hővel inaktivált (56°C , 1 óra) HHV-6A-val is végeztünk koinfekciós kísérleteket. Ebben az esetben azonban a kettősen fertőzött tenyészetekben az inaktivált HHV-6A nem gátolta a HIV-1 replikációját (**9. ábra**).

9. ábra: HIV-1 szaporodásának vizsgálata különböző sejt kultúrákban

Jelmagyarázat:

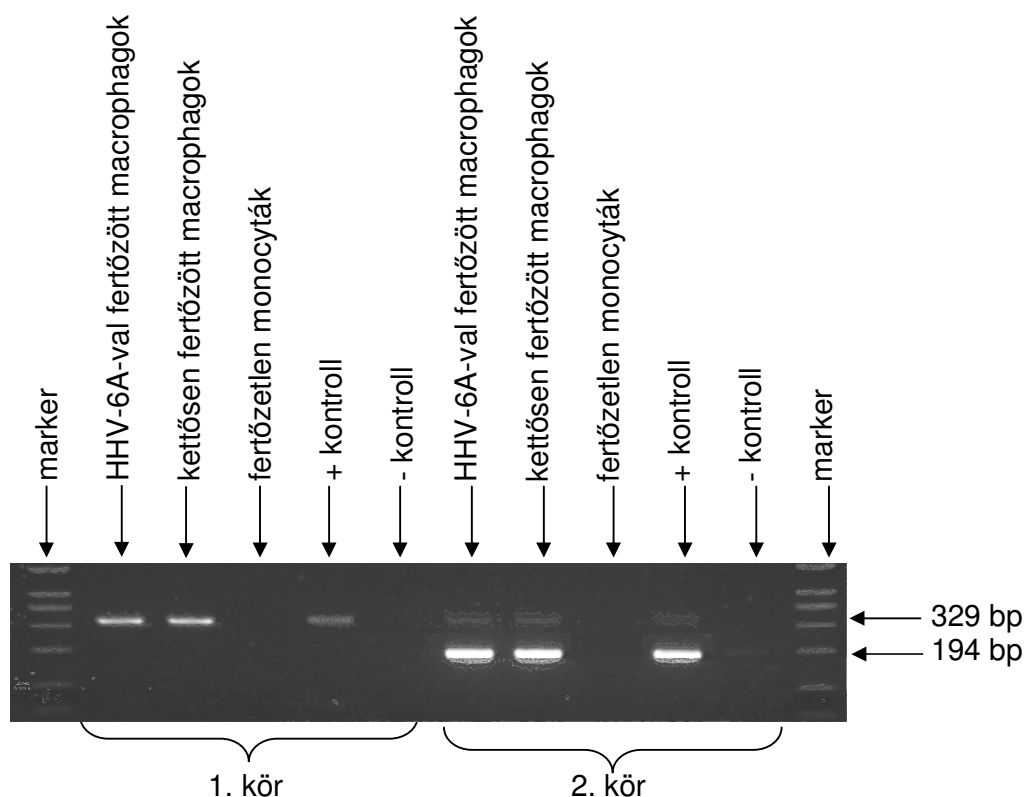
- : csak HIV-1-gyel fertőzött macrophagok
- : HHV-6A-val és HIV-1-gyel fertőzött macrophagok
- : hővel inaktivált HHV-6A-val és HIV-1-gyel fertőzött macrophagok



II. 2. HHV-6A replikáció a macrophagokban

Korábbi tanulmánnyal (Smith et al., 2003) összhangban, infekzív HHV-6A termelést sem a vírussal egyszeresen, sem pedig a HIV-1-gyel és HHV6-A-val kettősen fertőzött macrophagok esetében nem tapasztaltunk. A vizsgálatokat HSB-2 monolayeren 14 napon keresztül infekzív titrálással végeztük. Kísérleteink során a HHV-6A p150 kapszid proteinjének jelenlétét nem tudtuk kimutatni. A kultúrák felülúszójában HHV-6A genomekvivalensek megjelenését nested PCR-rel nem tapasztaltuk, ugyanakkor HHV-6A specifikus DNS-t detektáltunk a macrophagokban, igazolva, hogy a HHV-6A képes megfertőzni a macrophagokat (10. ábra). Az ábrán hat független kísérlet egy-egy reprezentatív eredménye látható.

10. ábra: HHV-6A specifikus DNS kimutatása a fertőzött macrophagokban és frissen izolált monocytákban



II. 3. A HHV-6A fokozza a macrophagok IL-8 és RANTES ürítését

Ezt követően vizsgáltuk, hogy a HHV-6A megváltoztathatja-e a macrophagok kemokintermelését, a RANTES, illetve az IL-8 ürítését, amelyek befolyásolhatják a CCR5 receptor HIV-1 iránti érzékenységet. Ezen kísérletek során fertőzetlen, egyszeresen, illetve kettősen fertőzött kultúrák felülűszoját tanulmányoztuk.

A HHV-6A fertőzés hatására a macrophagok nagy mennyiségű RANTES-t ürítettek (11. ábra; n=2). A GS törzssel egyszeresen, illetve GS-sel és Ada-M-mel szimultán fertőzött kultúrák esetében is az ürítés maximumát a fertőzést követő 2. napon tapasztaltuk. Ezután az ürítés mértéke csökkent, és a fertőzést követő 10. naptól a kemokin mennyisége nem különbözött a fertőzetlen, kontroll kultúrákétól.

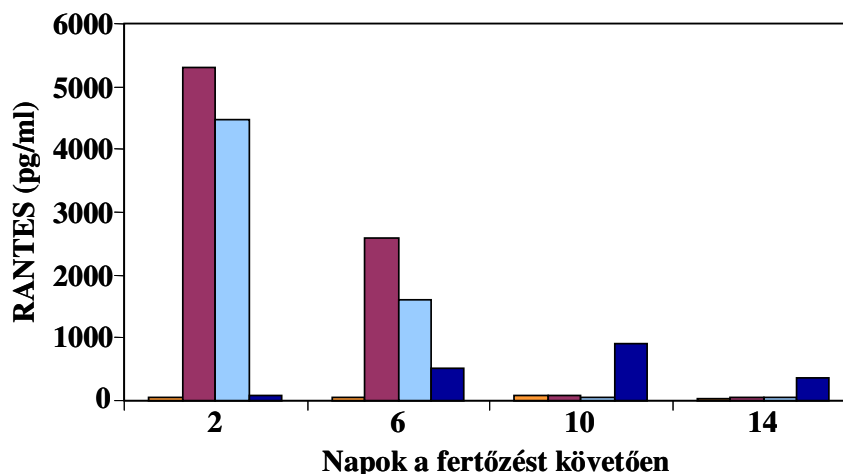
A csak HIV-1-gyel történő fertőzés szintén fokozott RANTES ürítést eredményezett, amit a fertőzést követő 6. naptól a 14. napig tapasztaltunk.

Míg a csak HIV-1-gyel történő fertőzés esetén 10-szeres, addig a HHV-6A-val való fertőzés esetén megközelítően 100-szor magasabb kemokin ürítést tapasztaltunk a kontroll kultúrákhoz képest.

11. ábra: HHV-6A fertőzés hatása az RANTES ürítésre

Jelmagyarázat:

- : csak HIV-1-gyel fertőzött macrophagok
- : HHV-6A-val fertőzött macrophagok
- :HHV-6A-val és HIV-1-gyel szimultán fertőzött sejtek
- : fertőzetlen macrophagok

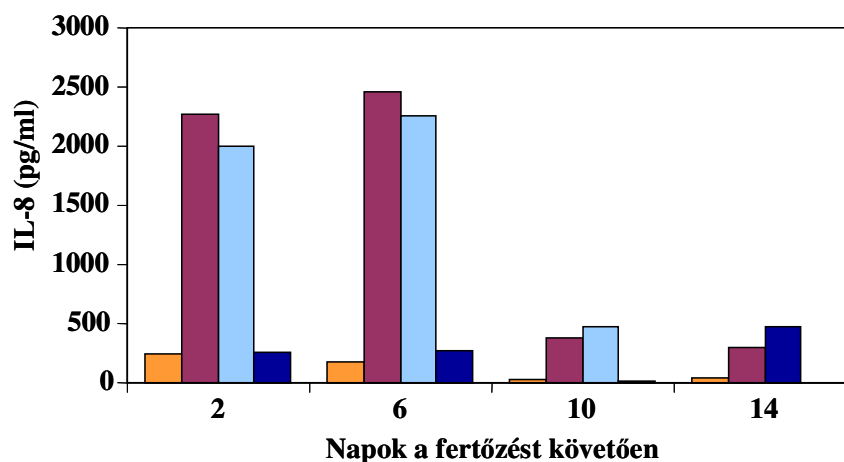


Ezután a sejtek IL-8 termelését mértük. Ahogy az a **12. ábrán** (n=2) látható, a kísérlet 14 napja alatt a csak HHV-6A-val, illetve a HIV-1-gyel és a HHV-6A-val szimultán fertőzött kultúrák esetében is fokozott IL-8 ürítést figyeltünk meg. A fertőzést követő 6. napig az IL-8 mennyisége a HHV-6A-val fertőzött kultúrák esetében megközelítően 10-szeres volt a fertőzetlen kultúrákhoz képest, majd a szekréció mértéke csökkent. A HIV-1 Ada-M törzsével fertőzött macrophagok felülúszójában mérhető IL-8 mennyisége számottevően nem különbözött a kontroll sejtektől.

12. ábra: HHV-6A fertőzés hatása az IL-8 ürítésre

Jelmagyarázat:

- : csak HIV-1-gyel fertőzött macrophagok
- : HHV-6A-val fertőzött macrophagok
- : HHV-6A-val és HIV-1-gyel szimultán fertőzött sejtek
- : fertőzetlen macrophagok



II. 4. Exogén IL-8 és RANTES hatása a HIV-1 replikációjára

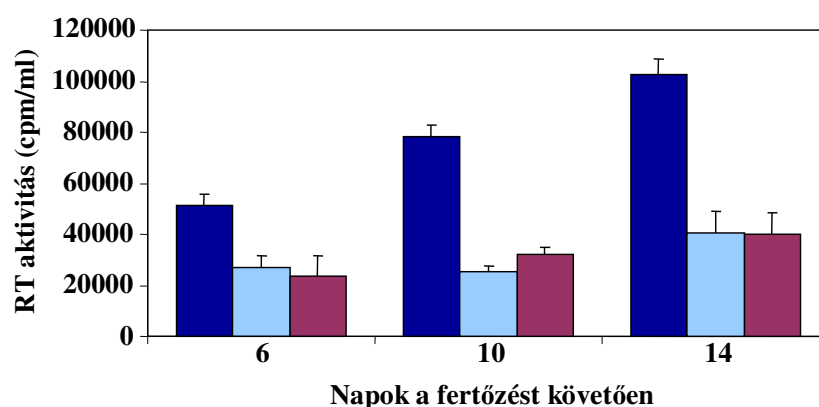
Azt, hogy a HHV-6A fertőzés által kiváltott RANTES és IL-8 ürítésnek milyen hatása van a HIV-1 replikációjára, exogén kemokinek segítségével vizsgáltuk. A HHV-6A-val és HIV-1-gyel kettősen fertőzött kultúrák esetén mért kemokinek mennyiségével megegyező mennyiségű exogén RANTES-t és IL-8-at (humán, rekombináns, R&D) adtunk a macrophagokhoz a csak HIV-1-gyel történő fertőzést követően. Amint az **13. ábrán** látható,

mind az exogén RANTES, mind az exogén IL-8 képes volt szignifikánsan gátolni a HIV-1 replikációját ($p < 0,05$; $n = 3$).

13. ábra: Exogén RANTES és IL-8 hatása a HIV-1 replikációjára

Jelmagyarázat:

- : csak HIV-1-gyel fertőzött macrophagok
- : csak HIV-1-gyel fertőzött sejtek IL-8-cal kezelve
- : csak HIV-1-gyel fertőzött sejtek RANTES-szel kezelve

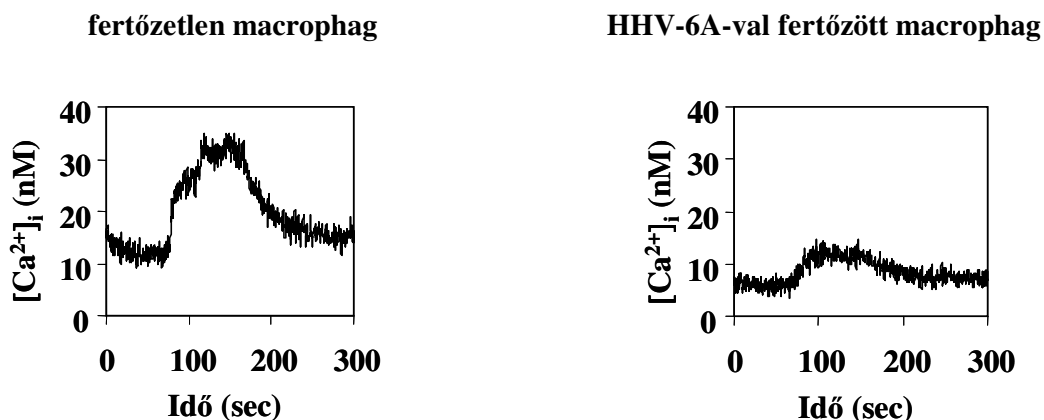


II. 5. HHV-6A hatása a CCR5 ligandérzékenységére

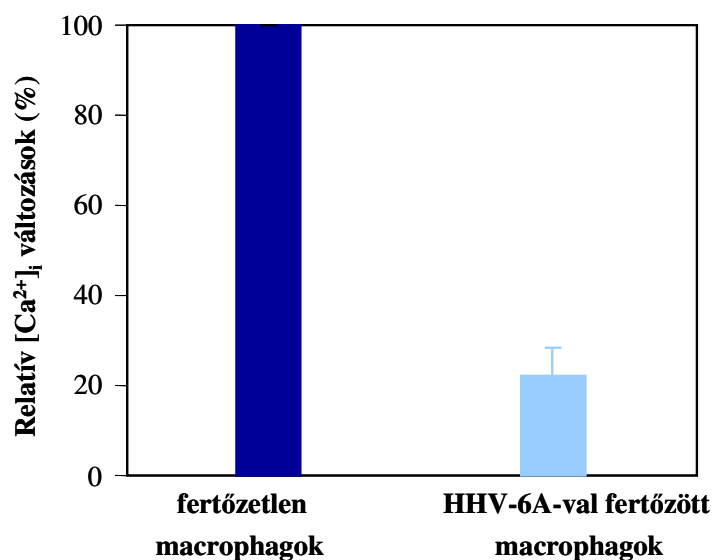
Eddigi eredményeink alapján feltételeztük, hogy a HHV-6A befolyásolhatja a CCR5 receptor ligandérzékenységét. A szenzitivitás vizsgálatához a kemokin receptor természetes ligandját, a RANTES-t használtuk. A RANTES által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} mobilizációt fertőzetlen és HHV-6A-val fertőzött macrophagokon tanulmányoztuk a fertőzést követő 6. napon. A 14. A ábrán az egyedi sejteken mért eredményeket láthatjuk (az ábrán három független kísérletről egy-egy reprezentatív adatsor látható). A HHV-6A-val fertőzött macrophagok esetében a RANTES adagolást követő $[Ca^{2+}]_i$ növekedés kisebb mértékű volt. Macrophag-populációk esetén a relatív R340/380 változás szignifikánsan kisebb volt ($p = 0,032$; $n = 6$), mintegy 22 %-nyi a fertőzetlen populációkéhoz képest (14. B ábra).

14. ábra: HHV-6A hatása a CCR5 ligandérzékenységre

14. A ábra: Egyedi sejteken mért intracelluláris Ca^{2+} mobilizáció 25 nM RANTES adagolását követően (20-140 sec)



14. B ábra: RANTES adagolást követő intracelluláris Ca^{2+} mobilizáció fertőzetlen és fertőzött macrophag populációkban

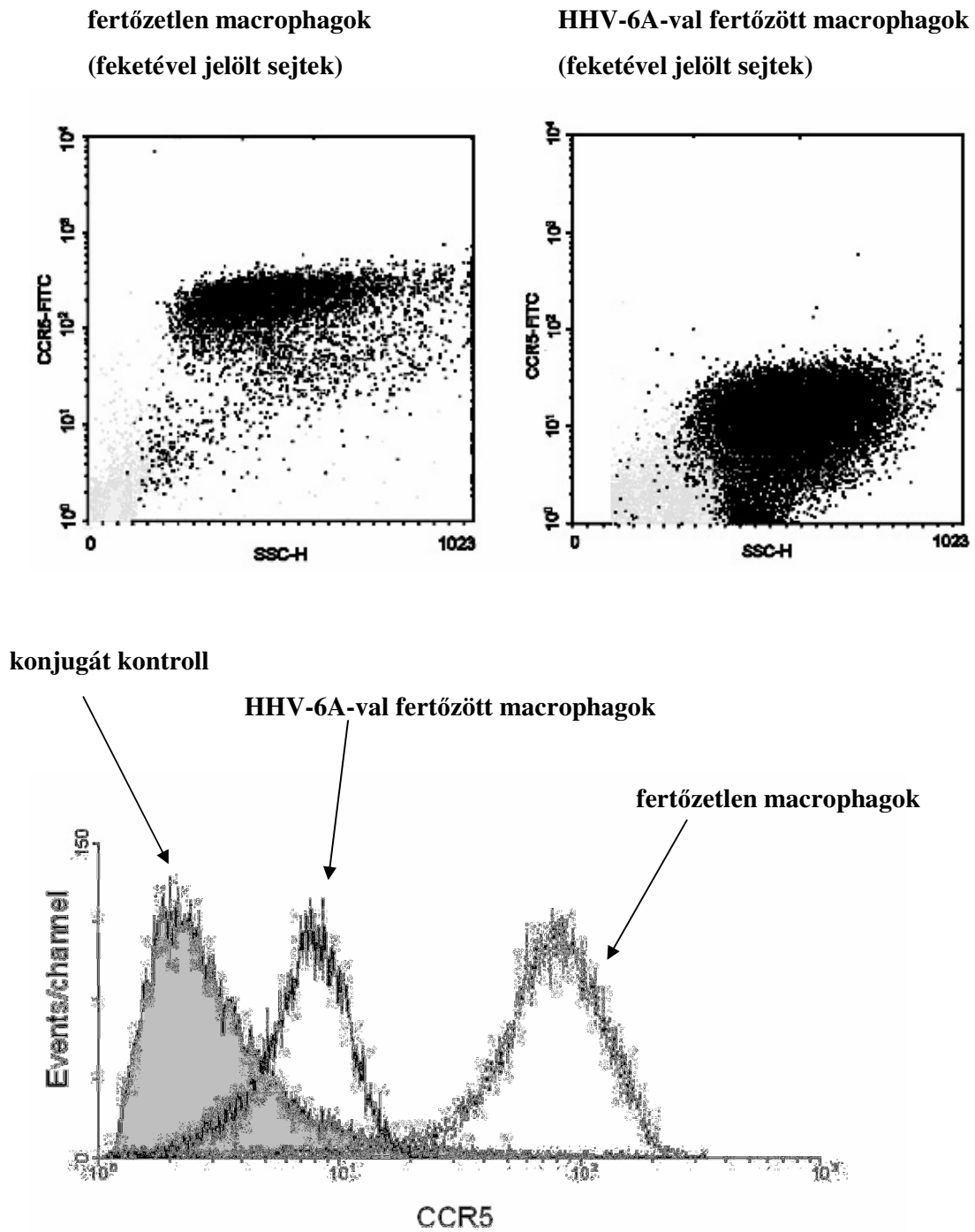


II. 6. A HHV-6A fertőzés befolyásolja a macrophagok CCR5 expresszióját

A fertőzetlen kontroll és a HHV-6A-val fertőzött macrophagok CCR5 expresszióját 6 nappal a fertőzést követően fluorocytometriával tanulmányoztuk. Mint ahogyan az a **15. ábrán** látható, a HHV-6A-val fertőzött macrophagokon a CCR5 sejtfelszíni expressziója

jelentős mértékben kisebb volt a kontroll sejtekéhez képest (az ábrák hat független kísérlet egy-egy reprezentatív adatát ábrázolják).

15. ábra: HHV-6A hatása a CCR5 sejt felszíni expressziójára



MEGBESZÉLÉS

Munkacsoportunk egy korábbi vizsgálata egyértelműen bizonyította, hogy egyes HIV-1 törzsek képesek a syncytiotrophoblast sejtekbe bejutni (Bacsi et al., 2001). Az *in vitro* HIV-1-gyel fertőzött trophoblast kultúrákban azonban vírusürítés általában nem figyelhető meg, vagy annak mértéke igen csekély (Fazely et al., 1995; Mano and Chermann, 1991; Zachar et al., 1991b).

Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az ST sejtek megfertőzhetők HHV-6A-val, a vírusreplikáció azonban ebben az esetben sem produktív, a szaporodás egy korai lépésnél blokkolt. Késői antigént, illetve infektív virionot nem tudtunk ezekben a tenyészetekben kimutatni. HHV-6A-val és HIV-1-gyel kettősen fertőzött tenyészetekben azonban végbement a HIV-1 teljes replikációs ciklusa, fertőzőképes virionok ürültek, míg HHV-6A esetében ekkor sem.

Eredményeink szerint – más kutatókkal összhangban (Douglas et al., 2001; Lairmore et al., 1993) – a fertőzetlen ST sejtek expresszálják CXCR4 és CCR3 kemokin receptorokat, de sem CD4, sem pedig CCR5 nem mutatható ki a felszínükön.

A HHV-6 bizonyos sejtekben – CD8+ T-lymphocytában (Lusso et al., 1991), NK sejtekben (Lusso et al., 1993), illetve egy myeloid sejt vonalban (KG-1) (Furlini et al., 1996) – képes a CD4 gént aktiválni. Ugyanakkor erythromyeloid progenitor sejteken (TF-1) ezt nem tapasztalták (Vignoli et al., 2000). A CXCR4 koreceptort illetően is különböző eredményeket találunk az irodalomban. CD4+ T-lymphocyták esetében a HHV-6 hatására a receptorszám jelentős mértékű csökkenését figyelték meg (Yasukawa et al., 1999), míg CXCR4+ vérsejtképző őssejteken a receptor expressziója nem változott (Vignoli et al., 2000). Mindebből az következik, hogy a HIV-1 által használt receptorok expresszióját a HHV-6 különböző sejt típusokban különböző módon vagy nem befolyásolja. Kísérleteink során a HHV-6A-val fertőzött trophoblastok esetében nem tapasztaltunk változást az említett receptorok expresszióját illetően.

Mutáns III_B és NDK HIV-1 törzsek képesek kizárólag CXCR4 receptort használva megfertőzni bizonyos sejteket (Dumoncaux et al., 1998; Hoxie et al., 1998), a legtöbb X4 variáns azonban nem. Az irodalomban nem található adatok arra vonatkozóan, hogy a HIV-1 csak CCR3 receptoron keresztül jutna be sejtekbe. Blokkoló kísérleteink szerint a HIV-1_{III_B} és a HIV-1_{Ba-L} trophoblastok esetében a CD4-től független fertőzéshez sem CXCR4-et, sem pedig CCR3-at nem használ. A HHV-6 stimuláló hatását tehát nem a vírussal szemben

fogékony sejtek számának növelésén keresztül fejti ki. Későbbi vizsgálatok szerint a HIV-1 az ST sejtekbe endocitózissal juthat be (Vidricaire et al., 2004).

Feltételezésünket, miszerint a HHV-6A HIV-1 replikációt stimuláló hatásában a transzaktivátor géntermékeinek lehet szerepe, transzfekciós kísérleteink igazolták. A HHV-6A U16-U17, U18-U19, U86 és U89 gének termékei mind képesek voltak az ST sejtekben az abortív HIV-1 replikációt produktívvá változtatni. Sőt, az U86 és U89 szinergista hatásúnak bizonyult. Egy korábbi tanulmány szerint az U89 géntermék promóterindukáló hatásához szükséges a HIV-1 LTR-ben található TATA box, illetve az NF- κ B és SP-1 kötőhely (Martin et al., 1991), az U16-U17 transzaktiválásához pedig nélkülözhetetlen az NF- κ B kötőhely (Geng et al., 1992). Ezek alapján feltételezhető, hogy ezek a géntermékek transzkripció enhancerekként hatnak a transzkripció egységek aktiválása vagy felerősítése révén. HHV-6A esetében az U16-U17, illetve az U18-U19 gének a HHV-6B-től eltérően nem csak a transzkripció nagyon korai, hanem korai szakaszában is átíródnak (Flebbe-Rehwaldt et al., 2000; Mirandola et al., 1998). Így tehát a HHV-6A szaporodásának IE és E szakaszában is képes a HIV-1 LTR-t stimulálni.

Ugyanakkor a HHV-6A replikációja az ST sejtekben a korai fázisban blokkolt, és a HIV-1-gyel történő kettős fertőzés hatására sem vált produktívvá. Korábbi vizsgálatok szerint a HIV-1 nem stimulálta (Asada et al., 1999; Carrigan et al., 1990; Pietroboni et al., 1988) vagy kissé gátolta (Levy et al., 1990) a HHV-6 szaporodását kettősen fertőzött sejtekben. A későbbiekben részletezendő, macrophagokon végzett kísérleteinkben mi sem tapasztaltuk a HIV-1 stimulatív hatását a kettősen fertőzött sejtekben.

Syncytiotrophoblastokon végzett kísérleteink szerint tehát a HHV-6A hozzájárulhat a HIV-1 transzplacentális átviteléhez, míg a HIV-1 nem befolyásolja az amúgy is ritka méhlepényen át történő HHV-6A fertőzést.

Macrophagokon végzett kísérleteink szerint a HHV-6A képes szignifikánsan gátolni a HIV-1 replikációját a kettősen fertőzött sejtekben. Minthogy kísérleteink során – egy korábbi tanulmánnyal (Smith et al., 2003) összhangban – nem tapasztaltunk infektív HHV-6A termelést, ez a gátló hatás nem függ a produktív HHV-6A fertőzéstől.

Asada és munkatársai korábban leírták (Asada et al., 1999), hogy HHV-6 preinfekció esetén a vírus rendelkezik némi HIV-1 replikációt gátló hatással a két vírussal kettősen fertőzött macrophag kultúrák esetében, bár az nem volt olyan nagyfokú, mint ahogy azt mi a szimultán fertőzött kultúráinknál megfigyeltük. A különbség feltehetően az eltérő kísérleti körülményekből adódik (eltérő sejtzoláció, sejt kultúrák, vírustörzsek, illetve az, hogy a munkacsoport alacsony multiplicitással fertőzött).

Ex vivo lymphoid szöveteken végzett vizsgálatokhoz hasonlóan (Grivel et al., 2001) HHV-6A fertőzés hatására fokozott RANTES ürítést figyeltünk meg. Korábbi tanulmányok szerint a RANTES a HIV-1 replikációját gátolhatja, de fokozhatja is a sejtkultúrák állapotától és differenciáltságától függően (Stantchev and Broder, 2001). A RANTES, a CCR5 természetes ligandjaként, receptorához kötődve a HIV-1 R5 variánsának kompetítora, tehát a macrophagok HIV-1-gyel történő fertőződésekor gátolhatja a vírus replikációját (Kelly et al., 1998). Ráadásul a RANTES kötődése a CCR5-höz a receptor foszforilációjához, homológ deszenzitizációjához és internalizációjához vezet (Oppermann, 2004).

Kísérleteink során a kettősen fertőzött monocyta-eredetű macrophagok esetében mért RANTES-szel megegyező mennyiségű exogén kemokin gátolta a HIV-1 replikációját a vírussal egyszeresen fertőzött sejtekben. A kemokin receptorok homológ deszenzitizációja és down-regulációja mellett ezen receptorok kereszt szabályozás útján is hatnak egymásra (Richardson et al., 2000). Ez ösztönzött minket arra, hogy más mechanizmusokat is keressünk arra vonatkozóan, hogyan képes a HHV-6A gátolni a HIV-1 replikációját macrophagokban.

A CXCR1 kemokin receptor aktivációjának – ligandja, az IL-8 kötődésének – hatására a CCR5 kereszt-deszenzitizálódik. Legalább két mechanizmusnak van szerepe ebben a heterológ érzékenysévesztésben. Ezek közül az egyik lehetőség a CCR5 keresztfoszforilációja másodlagos hírvivők által aktivált protein kináz C útján, amelyet a receptor és a G-fehérje szétválása kísér. A másik lehetőség pedig a foszfolipáz C gátlása. Emellett a CXCR1 aktivációja a CCR5 keresztinternalizációjával jár (Richardson et al., 2003). HHV-6 indukálta IL-8 felszabadulást már két különböző sejtípus (endothel sejtek és egy májeredetű sejt vonal) esetén is megfigyelték (Caruso et al., 2002; Inagi et al., 1996), ám macrophagokkal kapcsolatban eddig még nem vizsgálták.

Kísérleteink alapján a csak HHV-6A-val, illetve a HIV-1-gyel és HHV-6A-val szimultán fertőzött macrophag kultúrák fokozott mennyiségű IL-8-at ürítenek a fertőzetlen tenyészetekhez képest. Ugyanakkor a HIV-1 fertőzés számottevően nem befolyásolja az IL-8 szekréciót. A kettősen fertőzött kultúrák esetében mért IL-8-cal megegyező mennyiségű, exogén IL-8 képes szignifikánsan gátolni a HIV-1 replikációját a vírussal egyszeresen fertőzött macrophag tenyészetek esetében.

Minthogy a macrophagok felszínén a CXCR1 jelen van (Murphy et al., 2000), feltételeztük, hogy a HHV-6A által indukált IL-8 receptorához kötődve megváltoztatja a CCR5 receptor HIV-1-fogékonyságát. Mindemellett a nagymennyiségű RANTES szintén jelentősen befolyásolhatja a CCR5 érzékenységét és sejt felszíni expresszióját.

A RANTES által kiváltott sejten belüli kalciumkoncentráció növekedését egyedi, HHV-6A-val fertőzött macrophagokban mérve a CCR5 érzékenységének csökkenését figyeltük meg a kontroll, fertőzetlen sejtekhez viszonyítva. Fertőzetlen populációkkal összevetve a fertőzött macrophagpopulációkon ugyancsak csökkent receptorérzékenységet tapasztaltunk.

Azonban a kisebb receptorérzékenység abból is adódhat, hogy a deszenzitizáció mellett a sejtfelszíni receptorok száma is kevesebb lehet. Irodalmi adatok szerint a HIV-1-fertőzés gátlásához a receptor deszenzitizációja nem is elegendő, a receptor internalizációja is szükséges (Richardson et al., 2003). A sejtfelszíni receptorok száma fluorocytometriás vizsgálataink alapján a HHV-6A-val fertőzött macrophagokon jelentősen kevesebb, mint a fertőzetlen sejteken.

Eredményeink alapján tehát a HHV-6A képes szignifikáns módon csökkenteni a HIV-1 szaporodását a kettősen fertőzött macrophagokban. Feltételezésünk szerint a HHV-6A fertőzés hatására ürülő nagymennyiségű IL-8-nak és RANTES-nek kulcsszerepe lehet ebben azáltal, hogy megváltoztatják a CCR5 kemokin koreceptor érzékenységét és sejtfelszíni expresszióját, így a HIV-1-gyel szembeni fogékonyságot. Emellett természetesen egyéb tényezők is szerepet játszhatnak, és valószínűleg játszanak is a HHV-6A szuppresszív hatásában, amelyek további kutatások témái lehetnek.

Bár *in vitro* kísérleteink szerint a HHV-6A jelentősen csökkenti a HIV-1 szaporodását a HIV-1 patogenezisében és disszeminációjában igen fontos szerepet betöltő macrophagokban, a vizsgálat tárgyát az R5 variánsok képezték. A Bevezetésben már részletesen bemutatásra került, hogy a fertőzés rendszerint ezen variánsokkal történik, ezek dominálnak a kezdeti, aszimptomatikus fázisban, illetve hogy általában a betegség teljes ideje alatt jelen vannak a szervezetben. Klinikai tapasztalatok alapján az X4 variánsok megjelenése rossz prognózist jelent (Philpott, 2003). Ugyanakkor a CCR5 koreceptorok csökkent érzékenysége, száma jelentős mértékű szelektív nyomás lehet a CXCR4 kemokin koreceptort használó X4 variánsok felé. Így tehát a HIV-fertőzésben igen gyakran reaktiválódó HHV-6 nemcsak a lymphocyták számának csökkentésével, de a HIV-1 R5 variánsaival szembeni fogékonyság csökkentésével az AIDS progresszió igen fontos kofaktora lehet.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink eredményeit az alábbiakban foglalhatjuk össze:

1. A HHV-6A, illetve a HIV-1 bizonyos törzsei képesek az ST sejteket megfertőzni, de a replikáció egyik esetben sem produktív, infekzív virionok nem ürülnek.
2. A HHV-6A-val és HIV-1-gyel történő koinfekció hatására ST sejtekben végbemegy a HIV-1 teljes replikációs ciklusa, míg HHV-6A esetében ekkor sem.
3. ST sejtekben a HHV-6A nem befolyásolja a CD4, CXCR4, CCR3 és CCR5 felszíni molekulák expresszióját, a HIV-1 szaporodását stimuláló hatását nem a vírusra fogékony sejtek számának növelésén keresztül fejti ki. A HIV-1 trophoblastok esetében a fertőzés során sem CD4, sem pedig kemokin receptorokat nem használ.
4. A HHV-6 IE-A és IE-B gének transzaktiváló hatásuk révén stimulálják a HIV-1 replikációját a fertőzött ST sejtekben.
5. A HHV-6A képes kettősen fertőzött macrophagokban a HIV-1 szaporodását szignifikánsan gátolni.
6. A HHV-6A fertőzés macrophagokban nem produktív, a HIV-1-gyel történő kettős fertőzés sem indukálja a vírus szaporodását.
7. HHV-6A fertőzés hatására a macrophagok RANTES és IL-8 ürítése jelentősen fokozódik.
8. Ezek a kemokinek képesek szignifikánsan gátolni a HIV-1 szaporodását.
9. HHV-6A fertőzés hatására a macrophagok felszínén található CCR5 receptorok ligandérzékenysége és száma számottevően csökken.

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy a HHV-6A feltételezhetően szerepet játszik a HIV-1 transzplacentális átvitelében, míg a HIV-1 valószínűleg nem befolyásolja a HHV-6 anyáról magzatra terjedését. Macrophagokon végzett kísérleteink szerint a HHV-6A fertőzés hatására ürülő nagymennyiségű kemokinek feltehetően a HIV-1 R5 variánsaival szembeni fogékonyságot csökkentve gátolják a HIV-1 ezen variánsainak szaporodását.

DISCUSSION

1. ST cells in vitro could be infected with HHV-6A and certain HIV-1 strains, but the replication of these viruses was abortive, production of infectious virus particles was not observed.
2. Coinfection of HIV-1 infected ST cells with HHV-6A turned the replication of HIV-1 from an abortive to a productive one, while HIV-1 did not influence the replication of HHV-6A.
3. HHV-6A infection did not alter the expression of CD4, CXCR4, CCR3 and CCR5 surface receptors on ST cells. The stimulatory effect of HHV-6A on HIV-1 replication in ST cells was not mediated by an increase uptake of HIV-1.
4. Transactivator gene products of HHV-6A were able to stimulate the replication of HIV-1 in ST cells.
5. HV-6A significantly suppressed the replication of HIV-1 in dually infected macrophages.
6. The replication of HHV-6A was abortive in macrophages, coinfection with HIV-1 did not stimulate the replication of HHV-6A.
7. HHV-6A infection enhanced the IL-8 and RANTES production in macrophages.
8. These chemokine were able to significantly inhibit the replication of HIV-1 in macrophages.
9. HHV-6A infection resulted in decreased sensitivity and expression level of CCR5 receptor on macrophages.

In conclusion, data presented above suggest that HHV-6A may have importance in the vertical transmission of HIV-1, while HIV-1 may not influence the rarely occurred transmission of HHV-6 from mother to child. We assume that IL-8 and RANTES evoked by HHV-6A affect the sensitivity and surface expression of CCR5, hence HHV-6A infection is able to decrease the susceptibility of macrophages to R5 variants of HIV-1. Low-level CCR5 sensitivity and expression might be a selective pressure in favour of CXCR4 utilizing X4 variants, which might result in rapid progression of AIDS. Consequently, HHV-6 can be a cofactor in AIDS progression not only by decreasing the number of lymphocytes, but also by altering cell susceptibility to R5 variants of HIV-1.

IRODALOMJEGYZÉK

- Ablashi, D.V., Balachandran, N., Josephs, S.F., Hung, C.L., Krueger, G.R., Kramarsky, B., Salahuddin, S.Z. and Gallo, R.C. 1991. Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology*. 184 (2), 545-52.
- Adams, R.A., Flowers, A. and Davis, B.J. 1968. Direct implantation and serial transplantation of human acute lymphoblastic leukemia in hamsters, SB-2. *Cancer Res*. 28 (6), 1121-5.
- Asada, H., Klaus-Kovtun, V., Golding, H., Katz, S.I. and Blauvelt, A. 1999. Human herpesvirus 6 infects dendritic cells and suppresses human immunodeficiency virus type 1 replication in coinfecting cultures. *J Virol*. 73 (5), 4019-28.
- Asada, H., Yalcin, S., Balachandra, K., Higashi, K. and Yamanishi, K. 1989. Establishment of titration system for human herpesvirus 6 and evaluation of neutralizing antibody response to the virus. *J Clin Microbiol*. 27 (10), 2204-7.
- Backe, E., Jimenez, E., Unger, M., Schafer, A., Jauniaux, E. and Vogel, M. 1992. Demonstration of HIV-1 infected cells in human placenta by in situ hybridisation and immunostaining. *J Clin Pathol*. 45 (10), 871-4.
- Bacsi, A., Ebbesen, P., Szabo, J., Beck, Z., Andirko, I., Csoma, E. and Toth, F.D. 2001. Pseudotypes of vesicular stomatitis virus-bearing envelope antigens of certain HIV-1 strains permissively infect human syncytiotrophoblasts cultured in vitro: implications for in vivo infection of syncytiotrophoblasts by cell-free HIV-1. *J Med Virol*. 64 (4), 387-97.
- Balestra, E., Perno, C.F., Aquaro, S., Panti, S., Bertoli, A., Piacentini, M., Forbici, F., D'Arrigo, R., Calio, R. and Garaci, E. 2001. Macrophages: a crucial reservoir for human immunodeficiency virus in the body. *J Biol Regul Homeost Agents*. 15 (3), 272-6.
- Blanche, S., Mayaux, M.J., Rouzioux, C., Teglas, J.P., Firtion, G., Monpoux, F., Ciraru-Vignerou, N., Meier, F., Tricoire, J., Courpotin, C. and et al. 1994. Relation of the course of HIV infection in children to the severity of the disease in their mothers at delivery. *N Engl J Med*. 330 (5), 308-12.
- Boppana, S.B., Miller, J. and Britt, W.J. 1996. Transplacentally acquired antiviral antibodies and outcome in congenital human cytomegalovirus infection. *Viral Immunol*. 9 (4), 211-8.

- Bourinbaïar, A.S. and Nagorny, R. 1993. Human immunodeficiency virus type 1 infection of choriocarcinoma-derived trophoblasts. *Acta Virol.* 37 (1), 21-8.
- Carrigan, D.R., Knox, K.K. and Tapper, M.A. 1990. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by human herpesvirus-6. *J Infect Dis.* 162 (4), 844-51.
- Caruso, A., Rotola, A., Comar, M., Favilli, F., Galvan, M., Tosetti, M., Campello, C., Caselli, E., Alessandri, G., Grassi, M., Garrafa, E., Cassai, E. and Di Luca, D. 2002. HHV-6 infects human aortic and heart microvascular endothelial cells, increasing their ability to secrete proinflammatory chemokines. *J Med Virol.* 67 (4), 528-33.
- Caserta, M.T., Mock, D.J. and Dewhurst, S. 2001. Human herpesvirus 6. *Clin Infect Dis.* 33 (6), 829-33.
- Chan, P.K., Ng, H.K., Hui, M. and Cheng, A.F. 2001. Prevalence and distribution of human herpesvirus 6 variants A and B in adult human brain. *J Med Virol.* 64 (1), 42-6.
- Chandwani, S., Greco, M.A., Mittal, K., Antoine, C., Krasinski, K. and Borkowsky, W. 1991. Pathology and human immunodeficiency virus expression in placentas of seropositive women. *J Infect Dis.* 163 (5), 1134-8.
- Chouquet, C., Burgard, M., Richardson, S., Rouzioux, C. and Costagliola, D. 1997. Timing of mother-to-child HIV-1 transmission and diagnosis of infection based on polymerase chain reaction in the neonatal period by a non-parametric method. *Aids.* 11 (9), 1183-4.
- Cone, R.W., Huang, M.L., Hackman, R.C. and Corey, L. 1996. Coinfection with human herpesvirus 6 variants A and B in lung tissue. *J Clin Microbiol.* 34 (4), 877-81.
- Courgnaud, V., Laure, F., Brossard, A., Bignozzi, C., Goudeau, A., Barin, F. and Brechot, C. 1991. Frequent and early in utero HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 7 (3), 337-41.
- Curtis, B.M., Scharnowske, S. and Watson, A.J. 1992. Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89 (17), 8356-60.
- Cseri, J., Szappanos, H., Szigeti, G.P., Csernatony, Z., Kovacs, L. and Csernoch, L. 2002. A purinergic signal transduction pathway in mammalian skeletal muscle cells in culture. *Pflugers Arch.* 443 (5-6), 731-8.
- Dabis, F., Msellati, P., Dunn, D., Lepage, P., Newell, M.L., Peckham, C. and Van de Perre, P. 1993. Estimating the rate of mother-to-child transmission of HIV. Report of a

- workshop on methodological issues Ghent (Belgium), 17-20 February 1992. The Working Group on Mother-to-Child Transmission of HIV. *Aids*. 7 (8), 1139-48.
- Dahl, H., Fjaertoft, G., Norsted, T., Wang, F.Z., Mousavi-Jazi, M. and Linde, A. 1999. Reactivation of human herpesvirus 6 during pregnancy. *J Infect Dis*. 180 (6), 2035-8.
- De Andreis, C., Simoni, G., Rossella, F., Castagna, C., Pesenti, E., Porta, G., Colucci, G., Giuntelli, S., Pardi, G. and Semprini, A.E. 1996. HIV-1 proviral DNA polymerase chain reaction detection in chorionic villi after exclusion of maternal contamination by variable number of tandem repeats analysis. *Aids*. 10 (7), 711-5.
- De Bolle, L., Naesens, L. and De Clercq, E. 2005. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev*. 18 (1), 217-45.
- Dewhurst, S., McIntyre, K., Schnabel, K. and Hall, C.B. 1993. Human herpesvirus 6 (HHV-6) variant B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of U.S. infants. *J Clin Microbiol*. 31 (2), 416-8.
- Di Luca, D., Secchiero, P., Bovenzi, P., Rotola, A., Caputo, A., Monini, P. and Cassai, E. 1991. Reciprocal in vitro interactions between human herpesvirus-6 and HIV-1 Tat. *Aids*. 5 (9), 1095-8.
- Di Marzio, P., Tse, J. and Landau, N.R. 1998. Chemokine receptor regulation and HIV type 1 tropism in monocyte-macrophages. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 14 (2), 129-38.
- Donati, D., Akhyani, N., Fogdell-Hahn, A., Cermelli, C., Cassiani-Ingoni, R., Vortmeyer, A., Heiss, J.D., Cogen, P., Gaillard, W.D., Sato, S., Theodore, W.H. and Jacobson, S. 2003. Detection of human herpesvirus-6 in mesial temporal lobe epilepsy surgical brain resections. *Neurology*. 61 (10), 1405-11.
- Douglas, G.C. and King, B.F. 1989. Isolation of pure villous cytotrophoblast from term human placenta using immunomagnetic microspheres. *J Immunol Methods*. 119 (2), 259-68.
- Douglas, G.C., Thirkill, T.L., Sideris, V., Rabieh, M., Trollinger, D. and Nuccitelli, R. 2001. Chemokine receptor expression by human syncytiotrophoblast. *J Reprod Immunol*. 49 (2), 97-114.
- Dumonceaux, J., Nisole, S., Chanel, C., Quivet, L., Amara, A., Baleux, F., Briand, P. and Hazan, U. 1998. Spontaneous mutations in the env gene of the human immunodeficiency virus type 1 NDK isolate are associated with a CD4-independent entry phenotype. *J Virol*. 72 (1), 512-9.

- Dunn, D.T., Newell, M.L., Ades, A.E. and Peckham, C.S. 1992. Risk of human immunodeficiency virus type 1 transmission through breastfeeding. *Lancet*. 340 (8819), 585-8.
- Ehrnst, A., Lindgren, S., Dictor, M., Johansson, B., Sonnerborg, A., Czajkowski, J., Sundin, G. and Bohlin, A.B. 1991. HIV in pregnant women and their offspring: evidence for late transmission. *Lancet*. 338 (8761), 203-7.
- Eizuru, Y. and Minamishima, Y. 1992. Evidence for putative immediate early antigens in human herpesvirus 6-infected cells. *J Gen Virol*. 73 (Pt 8), 2161-5.
- Enders, A.C. 1989. Trophoblast differentiation during the transition from trophoblastic plate to lacunar stage of implantation in the rhesus monkey and human. *Am J Anat*. 186 (1), 85-98.
- Ensoli, B., Lusso, P., Schachter, F., Josephs, S.F., Rappaport, J., Negro, F., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F. 1989. Human herpes virus-6 increases HIV-1 expression in co-infected T cells via nuclear factors binding to the HIV-1 enhancer. *Embo J*. 8 (10), 3019-27.
- Ezekowitz, R.A., Kuhlman, M., Groopman, J.E. and Byrn, R.A. 1989. A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus. *J Exp Med*. 169 (1), 185-96.
- Fantini, J., Cook, D.G., Nathanson, N., Spitalnik, S.L. and Gonzalez-Scarano, F. 1993. Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90 (7), 2700-4.
- Fazely, F., Fry, G.N., Thirkill, T.L., Hakim, H., King, B.F. and Douglas, G.C. 1995. Kinetics of HIV infection of human placental syncytiotrophoblast cultures: an ultrastructural and immunocytochemical study. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 11 (9), 1023-30.
- Fear, W.R., Kesson, A.M., Naif, H., Lynch, G.W. and Cunningham, A.L. 1998. Differential tropism and chemokine receptor expression of human immunodeficiency virus type 1 in neonatal monocytes, monocyte-derived macrophages, and placental macrophages. *J Virol*. 72 (2), 1334-44.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. and Danielsen, M. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84 (21), 7413-7.
- Flamand, L., Romerio, F., Reitz, M.S. and Gallo, R.C. 1998. CD4 promoter transactivation by human herpesvirus 6. *J Virol*. 72 (11), 8797-805.

- Flebbe-Rehwaldt, L.M., Wood, C. and Chandran, B. 2000. Characterization of transcripts expressed from human herpesvirus 6A strain GS immediate-early region B U16-U17 open reading frames. *J Virol.* 74 (23), 11040-54.
- Fox, J.D., Briggs, M., Ward, P.A. and Tedder, R.S. 1990. Human herpesvirus 6 in salivary glands. *Lancet.* 336 (8715), 590-3.
- Furlini, G., Vignoli, M., Ramazzotti, E., Re, M.C., Visani, G. and La, P. 1996. A concurrent human herpesvirus-6 infection renders two human hematopoietic progenitor (TF-1 and KG-1) cell lines susceptible to human immunodeficiency virus type-1. *Blood.* 87 (11), 4737-45.
- Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B. and et al. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science.* 224 (4648), 500-3.
- Gartner, S., Markovits, P., Markovitz, D.M., Kaplan, M.H., Gallo, R.C. and Popovic, M. 1986. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science.* 233 (4760), 215-9.
- Gendelman, H.E., Orenstein, J.M., Martin, M.A., Ferrua, C., Mitra, R., Phipps, T., Wahl, L.A., Lane, H.C., Fauci, A.S., Burke, D.S. and et al. 1988. Efficient isolation and propagation of human immunodeficiency virus on recombinant colony-stimulating factor 1-treated monocytes. *J Exp Med.* 167 (4), 1428-41.
- Geng, Y.Q., Chandran, B., Josephs, S.F. and Wood, C. 1992. Identification and characterization of a human herpesvirus 6 gene segment that trans activates the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J Virol.* 66 (3), 1564-70.
- Grivel, J.C., Ito, Y., Faga, G., Santoro, F., Shaheen, F., Malnati, M.S., Fitzgerald, W., Lusso, P. and Margolis, L. 2001. Suppression of CCR5- but not CXCR4-tropic HIV-1 in lymphoid tissue by human herpesvirus 6. *Nat Med.* 7 (11), 1232-5.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260 (6), 3440-50.
- Hall, C.B., Caserta, M.T., Schnabel, K.C., Boettrich, C., McDermott, M.P., Lofthus, G.K., Carnahan, J.A. and Dewhurst, S. 2004. Congenital infections with human herpesvirus 6 (HHV6) and human herpesvirus 7 (HHV7). *J Pediatr.* 145 (4), 472-7.
- Hoffman, A.D., Banapour, B. and Levy, J.A. 1985. Characterization of the AIDS-associated retrovirus reverse transcriptase and optimal conditions for its detection in virions. *Virology.* 147 (2), 326-35.

- Hoxie, J.A., LaBranche, C.C., Endres, M.J., Turner, J.D., Berson, J.F., Doms, R.W. and Matthews, T.J. 1998. CD4-independent utilization of the CXCR4 chemokine receptor by HIV-1 and HIV-2. *J Reprod Immunol.* 41 (1-2), 197-211.
- Inagi, R., Guntapong, R., Nakao, M., Ishino, Y., Kawanishi, K., Isegawa, Y. and Yamanishi, K. 1996. Human herpesvirus 6 induces IL-8 gene expression in human hepatoma cell line, Hep G2. *J Med Virol.* 49 (1), 34-40.
- Irving, W.L. and Cunningham, A.L. 1990. Serological diagnosis of infection with human herpesvirus type 6. *Bmj.* 300 (6718), 156-9.
- Jekle, A., Schramm, B., Jayakumar, P., Trautner, V., Schols, D., De Clercq, E., Mills, J., Crowe, S.M. and Goldsmith, M.A. 2002. Coreceptor phenotype of natural human immunodeficiency virus with nef deleted evolves in vivo, leading to increased virulence. *J Virol.* 76 (14), 6966-73.
- Kashanchi, F., Thompson, J., Sadaie, M.R., Doniger, J., Duvall, J., Brady, J.N. and Rosenthal, L.J. 1994. Transcriptional activation of minimal HIV-1 promoter by ORF-1 protein expressed from the SalI-L fragment of human herpesvirus 6. *Virology.* 201 (1), 95-106.
- Kedzierska, K. and Crowe, S.M. 2002. The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection. *Curr Med Chem.* 9 (21), 1893-903.
- Kedzierska, K., Crowe, S.M., Turville, S. and Cunningham, A.L. 2003. The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Rev Med Virol.* 13 (1), 39-56.
- Kelly, M.D., Naif, H.M., Adams, S.L., Cunningham, A.L. and Lloyd, A.R. 1998. Dichotomous effects of beta-chemokines on HIV replication in monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol.* 160 (7), 3091-5.
- Kilani, R.T., Chang, L.J., Garcia-Lloret, M.I., Hemmings, D., Winkler-Lowen, B. and Guilbert, L.J. 1997. Placental trophoblasts resist infection by multiple human immunodeficiency virus (HIV) type 1 variants even with cytomegalovirus coinfection but support HIV replication after provirus transfection. *J Virol.* 71 (9), 6359-72.
- Knox, K.K. and Carrigan, D.R. 1994. Disseminated active HHV-6 infections in patients with AIDS. *Lancet.* 343 (8897), 577-8.
- Knox, K.K. and Carrigan, D.R. 1996. Active HHV-6 infection in the lymph nodes of HIV-infected patients: in vitro evidence that HHV-6 can break HIV latency. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 11 (4), 370-8.

- Kondo, K., Kondo, T., Okuno, T., Takahashi, M. and Yamanishi, K. 1991. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol.* 72 (Pt 6), 1401-8.
- Kondo, K., Kondo, T., Shimada, K., Amo, K., Miyagawa, H. and Yamanishi, K. 2002. Strong interaction between human herpesvirus 6 and peripheral blood monocytes/macrophages during acute infection. *J Med Virol.* 67 (3), 364-9.
- Krivine, A., Firtion, G., Cao, L., Francoual, C., Henrion, R. and Lebon, P. 1992. HIV replication during the first weeks of life. *Lancet.* 339 (8803), 1187-9.
- Kusuhara, K., Ueda, K., Okada, K., Miyazaki, C., Tokugawa, K., Hirose, M., Takahashi, K. and Yamanishi, K. 1991. Do second attacks of exanthema subitum result from human herpesvirus 6 reactivation or reinfection? *Pediatr Infect Dis J.* 10 (6), 468-70.
- Lairmore, M.D., Cuthbert, P.S., Utley, L.L., Morgan, C.J., Dezzutti, C.S., Anderson, C.L. and Sedmak, D.D. 1993. Cellular localization of CD4 in the human placenta. Implications for maternal-to-fetal transmission of HIV. *J Immunol.* 151 (3), 1673-81.
- Lallemant, M., Jourdain, G., Le Coeur, S., Kim, S., Koetsawang, S., Comeau, A.M., Phoolcharoen, W., Essex, M., McIntosh, K. and Vithayasai, V. 2000. A trial of shortened zidovudine regimens to prevent mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. Perinatal HIV Prevention Trial (Thailand) Investigators. *N Engl J Med.* 343 (14), 982-91.
- Lanari, M., Papa, I., Venturi, V., Lazzarotto, T., Faldella, G., Gabrielli, L., Guerra, B., Landini, M.P. and Salvioli, G.P. 2003. Congenital infection with human herpesvirus 6 variant B associated with neonatal seizures and poor neurological outcome. *J Med Virol.* 70 (4), 628-32.
- Laure, F., Courgnaud, V., Rouzioux, C., Blanche, S., Veber, F., Burgard, M., Jacomet, C., Griscelli, C. and Brechot, C. 1988. Detection of HIV1 DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. *Lancet.* 2 (8610), 538-41.
- Levy, J.A., Landay, A. and Lennette, E.T. 1990. Human herpesvirus 6 inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in cell culture. *J Clin Microbiol.* 28 (10), 2362-4.
- Lewis, S.H., Reynolds-Kohler, C., Fox, H.E. and Nelson, J.A. 1990. HIV-1 in trophoblastic and villous Hofbauer cells, and haematological precursors in eight-week fetuses. *Lancet.* 335 (8689), 565-8.
- Luppi, M., Barozzi, P., Marasca, R., Ceccherini-Nelli, L., Ceccherelli, G. and Torelli, G. 1995. Human herpesvirus-6 (HHV-6) in blood donors. *Br J Haematol.* 89 (4), 943-5.

- Lusso, P., De Maria, A., Malnati, M., Lori, F., DeRocco, S.E., Baseler, M. and Gallo, R.C. 1991. Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8+ T lymphocytes by human herpesvirus 6. *Nature*. 349 (6309), 533-5.
- Lusso, P., Ensoli, B., Markham, P.D., Ablashi, D.V., Salahuddin, S.Z., Tschachler, E., Wong-Staal, F. and Gallo, R.C. 1989. Productive dual infection of human CD4+ T lymphocytes by HIV-1 and HHV-6. *Nature*. 337 (6205), 370-3.
- Lusso, P., Malnati, M.S., Garzino-Demo, A., Crowley, R.W., Long, E.O. and Gallo, R.C. 1993. Infection of natural killer cells by human herpesvirus 6. *Nature*. 362 (6419), 458-62.
- Luzuriaga, K., McQuilken, P., Alimenti, A., Somasundaran, M., Hesselton, R. and Sullivan, J.L. 1993. Early viremia and immune responses in vertical human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis*. 167 (5), 1008-13.
- Mano, H. and Chermann, J.C. 1991. Replication of human immunodeficiency virus type 1 in primary cultured placental cells. *Res Virol*. 142 (2-3), 95-104.
- Martin, M.E., Nicholas, J., Thomson, B.J., Newman, C. and Honess, R.W. 1991. Identification of a transactivating function mapping to the putative immediate-early locus of human herpesvirus 6. *J Virol*. 65 (10), 5381-90.
- Maury, W., Potts, B.J. and Rabson, A.B. 1989. HIV-1 infection of first-trimester and term human placental tissue: a possible mode of maternal-fetal transmission. *J Infect Dis*. 160 (4), 583-8.
- Meltzer, M.S., Nakamura, M., Hansen, B.D., Turpin, J.A., Kalter, D.C. and Gendelman, H.E. 1990. Macrophages as susceptible targets for HIV infection, persistent viral reservoirs in tissue, and key immunoregulatory cells that control levels of virus replication and extent of disease. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 6 (8), 967-71.
- Miller, C.J. and Shattock, R.J. 2003. Target cells in vaginal HIV transmission. *Microbes Infect*. 5 (1), 59-67.
- Mirandola, P., Menegazzi, P., Merighi, S., Ravaioli, T., Cassai, E. and Di Luca, D. 1998. Temporal mapping of transcripts in herpesvirus 6 variants. *J Virol*. 72 (5), 3837-44.
- Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J. and Power, C.A. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*. 52 (1), 145-76.
- Nara, P.L., Hatch, W.C., Dunlop, N.M., Robey, W.G., Arthur, L.O., Gonda, M.A. and Fischinger, P.J. 1987. Simple, rapid, quantitative, syncytium-forming microassay for

- the detection of human immunodeficiency virus neutralizing antibody. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 3 (3), 283-302.
- Nicholas, J. and Martin, M.E. 1994. Nucleotide sequence analysis of a 38.5-kilobase-pair region of the genome of human herpesvirus 6 encoding human cytomegalovirus immediate-early gene homologs and transactivating functions. *J Virol*. 68 (2), 597-610.
- Ohashi, M., Yoshikawa, T., Ihira, M., Suzuki, K., Suga, S., Tada, S., Udagawa, Y., Sakui, H., Iida, K., Saito, Y., Nisiyama, Y. and Asano, Y. 2002. Reactivation of human herpesvirus 6 and 7 in pregnant women. *J Med Virol*. 67 (3), 354-8.
- Ometto, L., Zanotto, C., Maccabruni, A., Caselli, D., Truscia, D., Giaquinto, C., Ruga, E., Chieco-Bianchi, L. and De Rossi, A. 1995. Viral phenotype and host-cell susceptibility to HIV-1 infection as risk factors for mother-to-child HIV-1 transmission. *Aids*. 9 (5), 427-34.
- Oppermann, M. 2004. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cell Signal*. 16 (11), 1201-10.
- Patterson, B.K., Landay, A., Andersson, J., Brown, C., Behbahani, H., Jiyamapa, D., Burki, Z., Stanislawski, D., Czerniewski, M.A. and Garcia, P. 1998. Repertoire of chemokine receptor expression in the female genital tract: implications for human immunodeficiency virus transmission. *Am J Pathol*. 153 (2), 481-90.
- Peckham, C.S. 1994. Human immunodeficiency virus infection and pregnancy. *Sex Transm Dis*. 21 (2 Suppl), S28-31.
- Philpott, S.M. 2003. HIV-1 coreceptor usage, transmission, and disease progression. *Curr HIV Res*. 1 (2), 217-27.
- Pietroboni, G.R., Harnett, G.B., Farr, T.J. and Bucens, M.R. 1988. Human herpes virus type 6 (HHV-6) and its in vitro effect on human immunodeficiency virus (HIV). *J Clin Pathol*. 41 (12), 1310-2.
- Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E. and Gallo, R.C. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*. 224 (4648), 497-500.
- Princen, K. and Schols, D. 2005. HIV chemokine receptor inhibitors as novel anti-HIV drugs. *Cytokine Growth Factor Rev*. 16 (6), 659-77.
- Rapp, J.C., Krug, L.T., Inoue, N., Dambaugh, T.R. and Pellett, P.E. 2000. U94, the human herpesvirus 6 homolog of the parvovirus nonstructural gene, is highly conserved

- among isolates and is expressed at low mRNA levels as a spliced transcript. *Virology*. 268 (2), 504-16.
- Reardon, J.E. and Spector, T. 1989. Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase. Mechanism of inhibition by acyclovir triphosphate. *J Biol Chem*. 264 (13), 7405-11.
- Richardson, R.M., Pridgen, B.C., Haribabu, B. and Snyderman, R. 2000. Regulation of the human chemokine receptor CCR1. Cross-regulation by CXCR1 and CXCR2. *J Biol Chem*. 275 (13), 9201-8.
- Richardson, R.M., Tokunaga, K., Marjoram, R., Sata, T. and Snyderman, R. 2003. Interleukin-8-mediated heterologous receptor internalization provides resistance to HIV-1 infectivity. Role of signal strength and receptor desensitization. *J Biol Chem*. 278 (18), 15867-73.
- Rogers, M.F., Ou, C.Y., Rayfield, M., Thomas, P.A., Schoenbaum, E.E., Abrams, E., Krasinski, K., Selwyn, P.A., Moore, J., Kaul, A. and et al. 1989. Use of the polymerase chain reaction for early detection of the proviral sequences of human immunodeficiency virus in infants born to seropositive mothers. New York City Collaborative Study of Maternal HIV Transmission and Montefiore Medical Center HIV Perinatal Transmission Study Group. *N Engl J Med*. 320 (25), 1649-54.
- Salahuddin, S.Z., Ablashi, D.V., Markham, P.D., Josephs, S.F., Sturzenegger, S., Kaplan, M., Halligan, G., Biberfeld, P., Wong-Staal, F., Kramarsky, B. and et al. 1986. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 234 (4776), 596-601.
- Schmidtayerova, H., Alfano, M., Nuovo, G. and Bukrinsky, M. 1998. Human immunodeficiency virus type 1 T-lymphotropic strains enter macrophages via a CD4- and CXCR4-mediated pathway: replication is restricted at a postentry level. *J Virol*. 72 (6), 4633-42.
- Simmons, G., Reeves, J.D., McKnight, A., DeJucq, N., Hibbitts, S., Power, C.A., Aarons, E., Schols, D., De Clercq, E., Proudfoot, A.E. and Clapham, P.R. 1998. CXCR4 as a functional coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 infection of primary macrophages. *J Virol*. 72 (10), 8453-7.
- Smith, A., Santoro, F., Di Lullo, G., Dagna, L., Verani, A. and Lusso, P. 2003. Selective suppression of IL-12 production by human herpesvirus 6. *Blood*. 102 (8), 2877-84.
- Stantchev, T.S. and Broder, C.C. 2001. Human immunodeficiency virus type-1 and chemokines: beyond competition for common cellular receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 12 (2-3), 219-43.

- van Loon, N.M., Gummuluru, S., Sherwood, D.J., Marentes, R., Hall, C.B. and Dewhurst, S. 1995. Direct sequence analysis of human herpesvirus 6 (HHV-6) sequences from infants and comparison of HHV-6 sequences from mother/infant pairs. *Clin Infect Dis.* 21 (4), 1017-9.
- van't Wout, A.B., Kootstra, N.A., Mulder-Kampinga, G.A., Albrecht-van Lent, N., Scherpbier, H.J., Veenstra, J., Boer, K., Coutinho, R.A., Miedema, F. and Schuitemaker, H. 1994. Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. *J Clin Invest.* 94 (5), 2060-7.
- Verani, A., Gras, G. and Pancino, G. 2005. Macrophages and HIV-1: dangerous liaisons. *Mol Immunol.* 42 (2), 195-212.
- Verani, A., Sironi, F., Siccardi, A.G., Lusso, P. and Vercelli, D. 2002. Inhibition of CXCR4-tropic HIV-1 infection by lipopolysaccharide: evidence of different mechanisms in macrophages and T lymphocytes. *J Immunol.* 168 (12), 6388-95.
- Vidricaire, G., Imbeault, M. and Tremblay, M.J. 2004. Endocytic host cell machinery plays a dominant role in intracellular trafficking of incoming human immunodeficiency virus type 1 in human placental trophoblasts. *J Virol.* 78 (21), 11904-15.
- Vignoli, M., Furlini, G., Re, M.C., Ramazzotti, E. and La Placa, M. 2000. Modulation of CD4, CXCR-4, and CCR-5 makes human hematopoietic progenitor cell lines infected with human herpesvirus-6 susceptible to human immunodeficiency virus type 1. *J Hematother Stem Cell Res.* 9 (1), 39-45.
- Weinberg, J.B., Matthews, T.J., Cullen, B.R. and Malim, M.H. 1991. Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. *J Exp Med.* 174 (6), 1477-82.
- Wu, S.C., Spouge, J.L., Merges, M.J., Conley, S.R. and Nara, P.L. 1996. A cytopathic infectivity assay of human immunodeficiency virus type 1 in human primary macrophages. *J Virol Methods.* 59 (1-2), 45-55.
- Yalcin, S., Karpuzoglu, T., Suleymanlar, G., Mutlu, G., Mukai, T., Yamamoto, T., Isegawa, Y. and Yamanishi, K. 1994. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 infections in renal transplant recipients and healthy adults in Turkey. *Arch Virol.* 136 (1-2), 183-90.
- Yamanishi, K., Okuno, T., Shiraki, K., Takahashi, M., Kondo, T., Asano, Y. and Kurata, T. 1988. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet.* 1 (8594), 1065-7.

- Yasukawa, M., Hasegawa, A., Sakai, I., Ohminami, H., Arai, J., Kaneko, S., Yakushijin, Y., Maeyama, K., Nakashima, H., Arakaki, R. and Fujita, S. 1999. Down-regulation of CXCR4 by human herpesvirus 6 (HHV-6) and HHV-7. *J Immunol.* 162 (9), 5417-22.
- Yi, Y., Rana, S., Turner, J.D., Gaddis, N. and Collman, R.G. 1998. CXCR-4 is expressed by primary macrophages and supports CCR5-independent infection by dual-tropic but not T-tropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 72 (1), 772-7.
- Zachar, V., Norskov-Lauritsen, N., Juhl, C., Spire, B., Chermann, J.C. and Ebbesen, P. 1991a. Susceptibility of cultured human trophoblasts to infection with human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol.* 72 (Pt 6), 1253-60.
- Zachar, V., Spire, B., Hirsch, I., Chermann, J.C. and Ebbesen, P. 1991b. Human transformed trophoblast-derived cells lacking CD4 receptor exhibit restricted permissiveness for human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 65 (4), 2102-7.
- Zdravkovic, M., Aboagye-Mathiesen, G., Zachar, V., Mosborg-Petersen, P., Toth, F.D., Liu, X. and Ebbesen, P. 1994. In vitro cytotoxic activity of cord blood NK cells against herpes simplex virus type-1 infected purified human term villous cytotrophoblast. *Viral Immunol.* 7 (3), 133-40.
- Zhou, Y., Chang, C.K., Qian, G., Chandran, B. and Wood, C. 1994. trans-activation of the HIV promoter by a cDNA and its genomic clones of human herpesvirus-6. *Virology.* 199 (2), 311-22.

Az értekezésben felhasznált közlemények:

Eszter Csoma, Attila Bácsi, Xiangdong Liu, Judit Szabó, Peter Ebbesen, Zoltán Beck, József Kónya, István Andirkó, Etelka Nagy, and Ferenc D. Tóth: Human Herpesvirus 6 Variant A Infects Human Term Syncytiotrophoblasts In Vitro and Induces Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Dually Infected Cells
Journal of Medical Virology 67: 67-87 (2002)

Impakt faktor: 2,629, citáció: 3

Eszter Csoma, Tamás Deli, József Kónya, László Csernoch, Zoltán Beck and Lajos Gergely: Human Herpesvirus 6A Decreases the Susceptibility of Macrophages to R5 Variants of Human Immunodeficiency Virus 1: Possible Role of RANTES and IL-8
Virus Research. (2006) (in press)

Impakt faktor: 2,155

Egyéb közlemények:

Attila Bácsi, **Eszter Csoma**, Zoltán Beck, István Andirkó, József Kónya, Lajos Gergely, and Ferenc D. Tóth: Induction of HIV-1 Replication in Latently Infected Syncytiotrophoblast Cells by Contact with Placental Macrophages: Role of Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α .
Journal of Interferon and Cytokine Research 21: 1079-1088 (2001)

Impakt faktor: 2,281, citáció: 8

Attila Bácsi, Peter Ebbesen, Judit Szabó, Zoltán Beck, István Andirkó, **Eszter Csoma**, and Ferenc D. Tóth: Pseudotypes of Vesicular Stomatitis Virus-Bearing Envelope Antigens of Certain HIV-1 Strains Permissively Infect Human Syncytiotrophoblasts Cultured In Vitro: Implications for In Vivo Infection of Syncytiotrophoblasts by Cell-Free HIV-1.
Journal of Medical Virology 64: 387-397 (2001)

Impakt faktor: 2,881, citáció: 0

Etelka Nagy, Zoltán Beck, Attila Kiss, **Eszter Csoma**, Béla Telek, József Kónya, Éva Oláh, Kálmán Rák, Ferenc D. Tóth: Frequent methylation of *p16^{INK4A}* and *p14^{ARF}* genes implicated in evolution of chronic myeloid leukemia from its chronic phase to acceleration.

European Journal of Cancer 39: 2298-305 (2003)

Impakt faktor: 3,694; citáció: 5

Zoltán Beck, Attila Bácsi, Xiangdong Liu, Peter Ebbesen, István Andirkó, **Eszter Csoma**, József Kónya, Etelka Nagy, and Ferenc D. Tóth: Differential Patterns of Human Cytomegalovirus Gene Expression in Various T-Cell Lines Carrying Human T-Cell Leukemia-Lymphoma Virus Type 1: Role of Tax-Activated Cellular Transcription Factors.

Journal of Medical Virology 71: 94-104 (2003)

Impakt faktor: 2,371, citáció:0

Etelka Nagy, György Veress, Krisztina Szarka, **Eszter Csoma**, Zoltán Beck: Frequent methylation of p16INK4A/p14ARF promoters in tumorigenesis of Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid cell lines.

Anticancer Research 25: 2153-60 (2005)

Impakt faktor: 1,395, citáció: 0

TÁRGYSZAVAK

HIV-1, HHV-6A, syncytiotrophoblast, transzaktiválás, macrophag, CCR5

KEYWORDS

HIV-1, HHV-6A, syncytiotrophoblast, transactivating, macrophage, CCR5

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálával tartozom Dr. D. Tóth Ferenc professzor úrnak a témavezetésért, a segítségért és szakmai irányításért, bár sajnos személyesen már nem köszönhetem ezt meg.

Köszönettel tartozom Dr. Gergely Lajos professzor úrnak, intézetvezetőnek, hogy az Orvosi Mikrobiológiai Intézetben végezhettem kutatásaimat, és hogy témavezetőm halála után átvette munkám irányítását.

Külön köszönöm Dr. Csernoch Lászlónak és Dr. Deli Tamásnak azt a sok segítséget, melyet az Élettani Intézetben kaptam.

Köszönet illeti a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetet, mert fluorocytometriás méréseimet ott végezhettem. A Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika dolgozóit, akik nagyon gondosan ügyeltek arra, hogy a placentákat megfelelő állapotban és időben kapjuk meg.

Köszönettel tartozom Markovics Erika asszisztensnek, illetve az Orvosi Mikrobiológiai Intézet azon dolgozóinak, akik munkám során segítségemre voltak.

FÜGGELÉK