

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**Humán herpesvírus-8 által okozott  
emberi malignitások jellemzése**

**Ötvös Rita**

Témavezető: Dr. Kónya József



**DEBRECENI EGYETEM**

**GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2014**



## **Humán herpeszvírus-8 által okozott emberi malignitások jellemzése**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a Gyógyszerészeti Tudományok tudományágban

Írta: Ötvös Rita okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája  
(Mikrobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Kónya József, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, MTA doktora  
tagok: Dr. Somogyvári Ferenc, PhD  
Dr. Bácsi Attila, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2014. június 19. 11.00  
DE GYTK Gyógyszerhatástani Tanszék könyvtára

Az értekezés bírálói: Dr. Burián Katalin, PhD  
Dr. Méhes Gábor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, MTA doktora  
tagok: Dr. Somogyvári Ferenc, PhD  
Dr. Burián Katalin, PhD  
Dr. Bácsi Attila, PhD  
Dr. Méhes Gábor, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2014. június 19. 13.00  
DE ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

## BEVEZETÉS

### A humán herpesvírus 8

*Kaposi sarcomás* (KS) betegek bőrbioptizás szövetmintáiban reprezentációs differencia analízis (RDA) segítségével 1994-ben Patrick Moore és felesége, Yuan Chang kutatók vírus eredetű DNS-szekvenciákat találtak. A vírust Kaposi szarkóma-asszociált herpesvírusnak (Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus, KSHV), később humán herpesvírus 8-nak (HHV-8) nevezték el. A KS mindegyik formájában igazolták a HHV-8 jelenlétét és bebizonyosodott, hogy ténylegesen onkogén hatású vírusról van szó. A vírust *HIV/AIDS-hez társuló testüregi B-sejtes lymphomák* esetén (Body-cavity-based lymphoma, BCBL vagy primary effusion lymphoma, PEL) is megtalálták az Epstein-Barr-vírussal (EBV) együtt, azonban néhány esetben csak a HHV-8-at sikerült kimutatni, ezért feltételezték direkt sejtranszformáló hatását. Kimutatták a HHV-8-at *multicentrikus Castleman-betegségben* (MCD, ritka, atípusos lymphoproliferatív elváltozás, amelyet vascularis hyperplasia kísér), valamint *myeloma multiplexes* és *benignus monoklonális gammopathiás* betegek néhány csontvelőmintájában is. Igazolták a HHV-8-DNS jelenlétét HIV-negatív angiosarcomás betegek tumorszövetében, továbbá *eosinophiliával járó angiolymphoid hyperplasiában* is.

### A HHV-8 törzsek és elterjedésük

Az orf-K1 gén VR1 és VR2 hipervariábilis régióinak szignifikáns szekvencia és hossz variabilitása alapján a 7 fő szubtypust különböztetünk meg, A, B, C, D, E, F és Z. A szubtypusokon belül eddig 24 különböző variánst írtak le (A1-A10, B1-3, C1-C6, D1-3, E1-2). A HHV-8 törzsek variánsainak megoszlása függ földrajzi és etnikai hovatartozástól is. Európában, az Egyesült Államokban, a Közel-Keleten és Ázsiában az A és C szubtypusok fordulnak elő gyakrabban. Közép-, és Kelet-Európából jelenleg kevés adat áll rendelkezésre a HHV-8 törzsek genetikai variabilitását tekintve. Csak Oroszországból és Görögországból jelentek meg adatok, melyek szerint a törzsek többsége az A és C szubtypusba sorolhatóak. Afrikában és Francia-Guyanában a B szubtypus dominál. A ritka D szubtypusról először a Csendes-óceán térségéből, valamint Tajvanból és Ausztráliából számoltak be. Az E szubtypusra a dél-amerikai (ecuadori, brazilai) indián lakosság körében és az Amazonas térségében bukkantak, amely az összes többi szubtypustól kb 25-30%-ban különbözik. A nagyon ritka Z szubtypust zambiai gyerekek között identifikáltak, és a legújabb F szubtypus Ugandában terjedt el.

## **A Kaposi sarcoma**

A *Kaposi sarcoma* (angiosarcoma idiopathicum haemorrhagicum Kaposi - KS) éréredetű, bőrtumorokkal járó daganatos megbetegedés. A kórkép első leírója Kaposi Mór magyar származású bécsi bőrgyógyász volt 1872-ben. A megbetegedés lassú lefolyású, 5-10 év alatt vezet halálhoz, de olyan eset is ismert, ahol még 25 évig élt a beteg a betegség felismerését követően. A bőr mellett körülbelül 10 százalékban belső szervi tünetek is lehetnek, leggyakrabban az emésztőtraktus vagy a máj területén. Viszonylag gyakran a szájnyálkahártyán észlelhetőek az első tünetek, melyre fogászati kezelés kapcsán derülhet fény. Belsőszervi érintettség esetén bizonytalan hasi panaszok hívhatják fel a figyelmet a daganatra. Néhány beteg esetében nyiroködéma jön létre amiatt, hogy a túlburjánzó daganatos sejtek összenyomják a nyirokereket. A *Kaposi sarcoma*-nak négy klinikai formája ismert: klasszikus (Kaposi által leírt), epidémiás vagy AIDS-hez társuló, endémiás afrikai, iatrogén vagy poszt-transzplantációs KS. A KS Észak-Amerikában és Észak-Európában régebben szórványosan fordult elő, majd a HIV pandémia terjedésével világszerte gyakori tumorrá vált (sokan ezzel a betegséggel azonosítják az AIDS-t).

## **A testüregi B-sejtes lymphoma (BCBL)**

A *testüregi B-sejtes lymphoma* (BCBL, *body-cavity-based lymphoma* vagy PEL, *primary effusion lymphoma*) - a nagy sejtes non-Hodgkin lymphoma egyik ritka, ám végzetes formája, elsősorban immundeficiens egyéneknél fejlődik ki. A túlélési idő kevesebb mint 6 hónap. Jellemző a lymphomatous folyadék jelenléte, mely a pleurális, pericardiális és peritoneális testüregeket érinti. Általában HIV pozitív, néha szervátültetett betegekben, vagy nagyon ritkán idős korban jelentkező megbetegedés HHV-8 pozitivitás mellett. Az esetek többségében (kb. 70%-ban) a HHV-8 az EBV-vel együtt fordul elő (kettős fertőzöttség). A testüregi B-sejtes lymphoma B-sejt eredetű daganat, azonban a tumorsejtek sem morfológiailag, immunfenotípusukat tekintve nem sok hasonlóságot mutatnak a normális B-sejtekkel. Az összes ismert esetben a monoklonális B-sejt-populáció fertőzött HHV-8-cal (ezáltal elengedhetetlen bizonyíték a diagnózis felállításához). Tekintettel arra, hogy ritka betegség, a legtöbb klinikai és patológiai adat esettanulmányból ismert. Épp ezért a HHV-8-ra vonatkozó releváns biológiai információ a BCBL-ből származó sejtvonalak tanulmányozásából származik, melyek számos virális gént (látens és lítikus) fejeznek ki, valamint segítségével kutatni lehet a proliferációt, angiogenezist és a gyulladással járó folyamatokat. A leggyakrabban használt terápiás

protokollok a B-sejtes lymphomák sémáját követik, mely a betegség stádiumától függően különböző polikemoterápiát javasol.

### **A jövő útja: in vitro gyógyszerérzékenységi vizsgálat**

Ha két betegnél ugyanazt a daganatos megbetegedést diagnosztizálják, akkor is előfordulhat, hogy különbözőképpen reagálnak ugyanarra a terápiára. Az egyik betegnél hatékony a kezelés, míg a másik páciens kellemetlen mellékhatásokat tapasztal a terápiás célok elérése nélkül. Ezek a különbségek a betegek genetikai és egyéb biológiai eltéréseiből fakadnak, valamint a tumorok rendkívül változatos, időben és térben változó genetikai módosulásából fakadnak. Minden rák személyenként különböző, ahogy minden ember más. A személyre szabott gyógyászati megközelítés lényege, hogy betekintést nyerjünk ezekbe az eltérésekbe molekuláris szinten olyan tesztek és gyógyszerek kifejlesztése révén, amelyek speciális betegcsoportok szükségleteit elégítik ki. A személyre szabott gyógyszerek olyanok, melyekről diagnosztikus eszközökkel meg tudjuk mondani, mely páciensek számára előnyös, mely betegek számára semleges vagy egyenesen hátrányos. Az eddiginél differenciáltabb terápia több módon is megvalósítható. Az egyik lehetőség, egy részletes molekuláris tumor térkép létrehozása, mely a tumor viselkedésének alapos megértéséhez vezet. Több tumoros megbetegedés pontos molekuláris mechanizmusát leírták, mely segítségével célzott kezelés alkalmazása vált lehetővé. Az egyénre szabott terápia kidolgozásának másik lehetősége, hogy a daganatsejtek gyógyszerérzékenységét direkt módon vizsgáljuk. Több próbálkozás történt erre alkalmas in vitro módszer kialakítására. Minden esetben az volt a cél, hogy olyan in vitro vizsgálati körülményeket alakítsanak ki, ahol a kapott eredmény jól korrelál az in vivo hatással.

## CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásaim során az alábbi két témakörbe tartozó kérdések megválaszolását tűztem ki célul:

1. Kollaboráció keretében a stockholmi Karolinska Intézetben kaptam lehetőséget Dr. Székely László és Skribek Henriette munkacsoportjában, ahol egy speciális fluoreszcens *in vitro* gyógyszerérzékenységi módszer segítségével lehetőség kínálkozott daganatellenes terápiás kérdések tanulmányozására. Céljaim:
  - a. A testüregi B-sejtes lymphoma sejtvonalak *in vitro* gyógyszerérzékenységének vizsgálata.
  - b. A tesztelt 27 citosztatikum között HHV-8 indukált BCBL betegségek kezelésére eddig még nem használt, *in vitro* hatásosnak bizonyuló gyógyszerek keresése.
  
2. Munkámat a DEOEC Bőrgyógyászati Klinikán kezelt *Kaposi sarcomas* betegektől gyűjtött paraffinos metszetekből nyert DNS mintákon elvégzett molekuláris biológiai vizsgálatokra alapoztam. Vizsgálataimban az alábbi kérdésekre kívántam választ kapni:
  - a. A hazai *Kaposi sarcomas* betegekben előforduló HHV-8 genotípusok meghatározása.
  - b. A HHV-8 K1 génjének részleges szekvenciáiból adatbázis létrehozása, majd ennek felhasználásával a törzsek filogenetikai vizsgálata.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### **BCBL sejtvonalak gyógyszerérzékenységének vizsgálata**

#### **Sejtvonalak és tenyésztési körülmények**

Az első tanulmányban 11 testüregi B-sejtes lymphoma eredetű sejtvonalat használtunk: CRO-AP/2, CRO-AP/5, CRO-AP/6, BC-2, BC-3, CRO-AP/3, HBL-6, BC-3, BCBL-1, JSC-1, és BCP-1. A sejtek tenyésztéséhez 10% borjúsavóval (FCS, Sigma), 100 IU/ml penicillinnel (Sigma), 100µg/ml streptomycinnel (Sigma), 80µg/ml gentamycinnel és 2mM L-glutaminnal (Sigma) kiegészített IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma) tápfolyadékot

használtunk. A sejtszuspenziókat párásított inkubátorban 37°C-on 5% széndioxidot tartalmazó légkörben tartottuk. A sejteket hetente két alkalommal passzáltuk, hogy a tenyésztés alatt a sejtkoncentráció kb.  $0.5 \times 10^6$  sejt/ml legyen. A mycoplasma fertőzés kizárására a kultúrákat Hoechst 33258 festéssel rendszeresen ellenőriztük.

## Gyógyszerek

Az in vitro gyógyszerérzékenységi vizsgálat elvégzéséhez 27 klinikumban is használt gyógyszert használtunk. A gyógyszereket 50% dimethyl-sulfoxidban (DMSO, Sigma) oldottuk fel és 50nl pöttyökben tettük fel a 384 lyukú lemezre HDRT (high density replicator tool, Beckman) rozsdamentes acéltűk segítségével Biomek 2000 robot (Beckman) használatával. Ugyanezt a robotot használtuk a gyógyszerenként négy hígítást tartalmazó törzslemezek (masterplate) elkészítéséhez egy- és nyolccsatornás pipettafejek alkalmazásával. A lemezen a legmagasabb gyógyszerkoncentrációkat a fizikai és kémiai szempontból maximálisan elérhető gyógyszerkoncentrációk 600-szoros hígításai adták meg (30µl sejtszuspenzió + 50nl gyógyszer). Az így készült gyógyszer lemezeket több vizsgálatban is teszteltük, sejtvonalakon, valamint primer tumor mintákon egyaránt. Ezekben a vizsgálatokban igazolódott, hogy a gyógyszerek a lemezeken aktívak, ugyanis minden egyes gyógyszerre találtunk érzékeny sejtvonalat. Az in vitro és in vivo gyógyszerkoncentráció közötti kapcsolat kiszámolásához az egyes gyógyszerek klinikumban használt dózisából, valamint a gyógyszerek felezési idejéből kalkulált 72 óra alatt in vivo AUC értékét (area under curve; a felszívódott és a szisztémás keringésbe jutott hatóanyag mennyiség), valamint az in vitro alkalmazott koncentrációból kalkulált értékeket használtuk, mely a QUAC ( $QAUC^{72hr}$ , Quotient of Area Under Curve) melyet a következő formulával számoltunk ki:

$$QAUC^{72óra} = in\ vitro\ AUC^{72óra} / in\ vivo\ AUC^{72óra} (\mu g \cdot h / ml)$$

$$In\ vitro\ AUC = In\ vitro\ alkalmazott\ koncentráció \times 72\ óra (\mu g \cdot hr / ml)$$

Az in vivo  $AUC^{72óra}$ : kalkulált érték, mely 72 óra alatti gyógyszerhatás a klinikai dózis és a félidőből lett számolva a trapezoid szabály szerint.

## **Fluoreszcens in vitro gyógyszerérzékenységi teszt**

A testüregi B-sejtes sejtvonalak in vitro gyógyszerérzékenységének meghatározását három napos kultúrákon végeztük 384 lyukú lemezek (Greiner, Germany) felhasználásával. 27 gyógyszert vizsgáltunk négy különböző koncentrációban triplikátumban. Minden lyuk 9000 sejtet tartalmazott 30  $\mu$ l sejtszuszpenzióban. Három napos inkubációt követően az élő és az elpusztult sejtek megkülönböztetésére VitalDye (Biomarker, Hungary) fluoreszcens festéket használtunk. Az élő és az elpusztult sejtek pontos meghatározásához stockholmi Karolinska Intézetben (Karolinska Institute core Visualization Facility; KIVIF) egyedileg összeállított automatizált lézer fluoreszcens konfokális mikroszkópot alkalmaztunk. A képeket a QuantCapture 4.0 számítógépes program segítségével rögzítettük, a képeken az élő és az elpusztult sejtek számát a QuantCount 5.0 számolóprogram segítségével határoztuk meg. Mindkét programot OpenLab (Improvision) programhátteret használva a Karolinska Intézetben lett kifejlesztve (KIVIF). Tizenöt kontrollként használt lyuk csak sejtszuszpenziót tartalmazott 50nL DMSO-val, öt lyuk csak sejtszuszpenziót DMSO nélkül. A kétféle kontrollt összehasonlítva DMSO által okozott toxikus hatást nem tapasztaltuk. Az átlag túlélést (mean cell survival; MCS) a 11 BC sejtvonal túlélési átlagából határoztuk meg.

## **Hazai HHV-8 törzsek filogenetikai vizsgálata**

### **Klinikai minták**

Összesen 17 betegtől 36 formalin-fixált paraffinba ágyazott preparátumot vizsgáltunk. Egy betegtől több minta is rendelkezésünkre állt, melyek különböző időpontokban lettek véve. A *Kaposi sarcomás* betegek a DEOEC Bőrgyógyászati Klinikáján feküdtek. A betegek nemek szerinti eloszlása 14 férfi és 3 nő, átlag életkoruk 68,9 év (38-86). A betegektől szövetmintát vírusvizsgálat szempontjából kapott a Mikrobiológiai Intézet.

### **Sejtkultúra**

Vizsgálatainkban a HHV-8-at látens hordozó BCBL-1 testüregi lymphoma sejtvonalat használtuk pozitív kontrollként. A sejtvonalat 10% borjúsavóval (FCS, Sigma), 2 mM L-glutaminnal (Sigma), 100  $\mu$ g/ml streptomycinnel és 100 IU/ml penicillinnel kiegészített Dulbeccos Medium Eagle's MEM (DMEM, Sigma) tápfolyadékban tartottuk fenn.

## **DNS preparálás paraffinba ágyazott metszetből**

Minimum 3-4 szelet 20 µm vastagságú metszetek álltak a rendelkezésünkre. A mintákat xilollal történt deparaffinálás után (az anyag mosása 2x1 ml xilollal, vízfürdő 50°C, 10perc majd 2x1ml ethanollal szárítás) emésztettük 200 µl proteinsase K lysis pufferban (100mmol/l NaCl, 10mmol/l Tris-HCl, pH 8.0, 1% sodium dodecyl sulfate, 25 mmol/l EDTA, pH 8.0 and 200 µg/ml proteinase K 1 óra 70°C). Majd az üledéket 0,1 N NaOH oldatban hidrolizáltuk 95°C-n 10 percig. 200 µl szérum, illetve plazma mintához 20 µl proteináz-K-t és kétszeres mennyiségű (400µl) lízispuffert (100ml-re: 0,2 M Tris-HCl, 25mM EDTA, 0,3 M NaCl, 2% SDS, DEPC kezelt desztillált víz) adtunk. Vortexelés után 1,5 órát inkubáltuk rázó vízfürdőben 55°C-on. A proteináz-K enzimet 5 perc inkubációval 95°C-on degradáltuk. Ezután fenol:kloroform 1:1 arányú keverékét adtuk hozzá (310µl + 310µl), majd alapos vortexelés után 15 percig centrifugáltuk 13.000 rpm-en. A felülúszóhoz (600 µl) azonos mennyiségű kloroformot adtunk, majd vortexelés és centrifugálás (15 perc, 13.000 rpm) után szintén a felülúszóhoz azonos mennyiségű (600 µl) izopropanolt adtunk és -20°C-on éjszakán át inkubáltuk. Centrifugálást követően (15 perc, 13.000 rpm) 400 µl 70% alkohollal mostuk az üledéket. Újabb centrifugálás (15 perc, 13.000 rpm) után az üledéket szárítottuk és 25µl DEPC-cel kezelt desztillált vízben reszuszpendáltuk.

## **PCR**

A PCR vizsgálatokat GeneAmpR PCR System 2700 (Applied Biosystem) gépben végeztük. Minden egyes amplifikálásnál pozitív és negatív kontrollokat is használtunk. Pozitív kontrollként BCBL-1 sejtenyészetből kivont HHV-8 DNS-t alkalmaztunk. A negatív kontrollhoz a minta DNS helyett desztillált vizet adtunk.

## **A PCR mixek összetétele és reakció körülményeik**

A PCR reakcióelegyhez JumpStart RedTaq® ReadyMix™-et (Sigma Aldrich, Hungary) használtunk, mely mix előre tartalmazza a deoxynukleotidokat (dNTP), valamint a Taq polimerázt. A mintából 2,5µl-t adtunk az első, 1,5µl-t a második körben az elegyhez. A PCR reakciólegy minden esetben a következő tartalmazta: 6,25µl JSRTRM, 3,25 illetve 4,25µl desztillált víz, 0,25µl primer 50 pmol/µl primer F, 0,25µl primer 50 pmol/µl primer R.

## **Agaróz gélelektroforézis**

A PCR-termékek mennyiségét és méretét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük 1,5%-os (Promega) gélben, melyet 0,5-szörös töménységű TBE-pufferrel készítettünk. A PCR-termékekből 2,5 $\mu$ l-t mértünk a gélbe, az elektroforézis 0,5-szörös TBE-pufferben 100 V feszültség mellett történt 40 percen keresztül. A kapott fragmentumok méretének viszonyításához 1 kbp-os molekulatömeg markert használtunk (Promega). A gél az elektroforézist követően 1,5 mg/ml ethídium-bromid oldattal festettük, mostuk, majd a DNS-t UV-lámpa segítségével tettük láthatóvá. Archiváláshoz a gél Kodak Digital Science DC120 kamerával fényképeztük.

## **Szekvenálás**

A PCR termékek tisztítása a szekvenáláshoz MICROCON YM-100 (Millipore CO., Bedford, USA) tisztító oszloppal történt. Az K1-N-2B nested primerek PCR termékek szekvenciáját a BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) felhasználásával határoztuk meg. A szekvenálási PCR reakció elegy 20  $\mu$ l osztérfogatban a következőket tartalmazta: 4  $\mu$ l 5x szekvenálási puffer, 4  $\mu$ l BigDye ReadyMix, 1  $\mu$ l 3,3 pmol/ $\mu$ l primer, 3  $\mu$ l desztillált víz és 8  $\mu$ l PCR termék. A szekvenálási PCR termék tisztítása SigmaSpin Post-Reaction Clean-Up Columns (Sigma Aldrich, Hungary) tisztító oszlopon történt. A szekvenálás ABI Prism 3130 kapilláris elektroforézis készülék (Genetic Analyser automata szekvenáló, Applied Biosystems) segítségével történt bér munka keretében a KBMPI (Debreceni Egyetem) kutatóközpontban.

## **Szekvencia – és filogenetikai analízis**

A szekvenálás eredményét vizuálisan ellenőriztük az esetleges hibák kiszűrése végett. A szekvenciák illesztéséhez a Lasergene programcsomag (DNASTAR Inc, Madison, WI, USA) Megalign programot használtuk, mely a Clustal algoritmust alkalmazza [169]. A módszert lehetőséget nyújtott a törzsek közötti genetikai távolság meghatározásához, és a nukleinsav szekvenciákból származtatott aminosav szekvenciák elemzésére. A nukleotid szekvenciákat az ExPASy (Bioinformatics Resource Portal, <http://web.expasy.org/translate/>) programmal fordítottuk fehérje szekvenciákra. A filogenetikai törzsfát a phylogeny.fr segítségével konstruáltuk, melyhez a távolság mátrix alapú neighbor-joining algoritmust [75] alkalmaztuk. Az evolúciós távolság alulbecslésének kiküszöbölése érdekében a Kimura két-paraméteres kor-

rekciós modellt alkalmaztuk, mely különbözőképpen értékeli a statisztikailag gyakrabban előforduló tranzíciót (purin-purin, illetve pirimidin-pirimidin csere), és a ritkábban bekövetkező transzverziót (purin-pirimidin, illetve pirimidin-purin csere). A törzsfák megbízhatóságát 100 „bootstrap” értékkel ellenőriztük. A törzsfát a DrawTree (version 1.6.6) programmal tekintettük meg.

## **EREDMÉNYEK**

### **A testüregi B-sejtes lymphoma sejtvonalak gyógyszerérzékenységi vizsgálata**

11 különböző BCBL sejtvonalat vizsgáltunk egy speciális fluoreszcens in vitro gyógyszerérzékenységi vizsgálat segítségével. Minden egyes sejtvonalat 27 klinikumban is használt gyógyszerrel szemben teszteltük, négy különböző koncentrációban, triplikátumban 384 lyukú lemezen. 3 nap inkubálás után az élő és döglött sejteket megfestettük speciális festék keverékkel, majd minden lyukat lefényképeztünk. Egy erre kifejlesztett programmal megszámláltuk a sejteket. Az egyes lyukakhoz a túlélő sejtek százalékos arányát úgy számítottuk, hogy összehasonlítottuk az élő sejtek számát az adott a kontroll lyukak (kezeletlen) átlagával.

### **Klaszteranalízis**

Annak érdekében, hogy szisztematikusan össze tudjuk hasonlítani a sejtvonalak érzékenységét egymással minden egyes gyógyszer esetében, elvégeztük az adatainkkal a hierarchikus, euklideszi távolságmérésen alapuló klaszter analízist (Cluster 3.0, MacOS X) az egyszerűsített hatóanyag érzékenységi adatokkal. A klaszteranalízis egy olyan dimenziócsökkentő eljárás, amellyel adattömböket tudunk homogén csoportokba sorolni, klasszifikálni. Ezeket a csoportokat nevezzük klasztereknek. Az egyes klasztereken belüli adatok valamilyen dimenzió szerint hasonlítanak egymáshoz, és e dimenzió mentén különböznek a többi klaszter elemeitől. A csoportosítás alapját különböző távolság- vagy hasonlóságmértékek képezik. A klaszterelemzés algoritmusai lehet hierarchikus vagy nem hierarchikus. A hierarchikus algoritmus az új klasztereket az előzőleg kialakított klaszterek alapján keresi meg, míg a nem hierarchikus algoritmus egyszerre határozza meg az összes klasztert. A klaszteranalízis ereje a mintaszámmal nő, esetünkben a 11 darab sejtvonal, még az értékelhetőség határán van. Az eredményeket a TreeView segítségével vizualizáltuk. A gyógyszerek érzékenységét egy ötlé-

péses skálán numerizáltuk, ahol minden lépés reprezentált egy számot (a legérzékenyebb 4, a rezisztens 0, stb). A klaszteranalízis grafikus ábrázolását követően az alábbi következtetések vonhatóak le:

- a legjobban hasonlító gyógyszerek, valamint sejtvonalak egymás mellé kerültek, ezek alapján a BC-1, valamint BCBL-1 sejtvonalak érzékenységi mintázata áll egymáshoz a legközelebb.
- A gyógyszerhatás szemszögéből tekintve megfigyelhető, hogy az anthracyclinek csoportja hat a legjobban.

### **Farmakokinetikai összehasonlítás**

A gyógyszerek hígítási sorainak legmagasabb koncentrációit (1x, 5x, 25x, 125x) azok oldhatósága határozza meg. Az *in vitro* gyógyszerérzékenységi adatoknak viszonylag kevés klinikai jelentősége van, ha azok nem korrelálnak a klinikailag elérhető *in vivo* koncentrációkkal. Annak érdekében, hogy a kapott adatok összehasonlíthatóvá váljanak a klinika gyógyszerdózissal, létrehoztuk a QAUC (Quotient of the Area Under Curve QAUC<sup>72hr</sup>) értéket, mely meghatározása a következőképpen történt:

$$\textit{in vitro} \text{ használt koncentráció} \times 72 \text{ óra } (\mu\text{gxhr/ml}) / \textit{in vivo} \text{ AUC}^{72\text{hr}} (\mu\text{gxh/ml})$$

Az *in vivo* AUC<sup>72óra</sup> meghatározásához gyógyszerenként kigyűjtöttük az irodalomban található klinikai dózist valamint felezési időt és ebből kalkuláltuk a 72 órára vonatkozó valódi biológiai értékülését a hatóanyagoknak. A sejtvonalak túlélési görbéinek átlagát a QAUC értékek függvényében ábrázolva lehetővé vált az egyes gyógyszerek hatékonyságának összehasonlítása. Ezen görbék a következő információt szolgáltatják: a leghatékonyabb gyógyszerek a következők: daunorubicin, epirubicin, paclitaxel és vinorelbine (alacsony QAUC<sup>72óra</sup> értékek alacsony túlélés mellett). A legtöbb BCBL sejtvonal érzékeny ezekre a gyógyszerekre. Fontos kiemelni, hogy egyetlen anthracyclin származék, a doxorubicin része a terápiás protokollnak, melynek a BC sejtvonalakra mutatott hatása meglehetősen heterogén. 2 sejtvonal a 11-ből volt erősen érzékeny, míg 2 teljesen rezisztens az elérhető maximális koncentrációnál (QAUC=0.11). Két sejtvonal (JSC-1 és BC-3) mutatott kisebb érzékenységet a kemoterápiás gyógyszerekre, de ezekben az esetekben is hatásosnak bizonyult a daunorubicin, epirubicin és vinorelbin. A dactinomycin mutatta a legnagyobb ölés hatékonyságot a jelenlegi vizsgálatban. Azonban a QAUC<sup>72óra</sup> kalkulációból látható, hogy az általunk használt koncentráció ma-

gasabb, mint ami maximálisan elérhető a betegben. Carboplatin használatakor relatív sejtszám növekedést tapasztalunk mind a 11 sejtvonal esetén a kontrollhoz képest, azaz a túlélés 100% felett van. Ez a jelenség arra utalhat, hogy az alacsony dózisu carboplatin véd a spontán sejt haláltól.

### **Hazai HHV-8 törzsek filogenetikai vizsgálata**

17 beteg 36 formalin-fixált paraffinba ágyazott KS pozitív preparátumán az orf-K1 génrégiót amplifikáltuk fel PCR segítségével és szekvenáltuk.

### **HHV-8 pozitivitás vizsgálata orf26 PCR segítségével**

A 34 kDa minor kapszid proteint kódoló orf26 régióra tervezett primerek, melyek egy 233 bp hosszúságú fragmentumot amplifikálnak fel nested PCR segítségével, a legáltalánosabban elterjedtek a HHV-8 DNS jelenlétének kimutatására. Ez a módszer bizonyul a legérzékenyebbnek is, ugyanis a HHV-8 pozitív KS mintákban már 3-10 kópia kimutatható. 17 beteg 36 paraffinba ágyazott KS pozitív szövetmintájából nyert DNS esetén végzett PCR vizsgálat minden esetben pozitívást mutatott. Ezen eredményeinket mások is megerősítik, ugyanis Magyarországon végzett kutatások az AIDS-KS betegek szövetmintáinak 92%-ában, míg poszt-transzplantációs és klasszikus KS esetek mindegyikében kimutatták a HHV-8 DNS-t PCR technikával. A HHV-8 DNS jelen van a KS léziók több mint 95%-ában, míg KS-ás betegek PBMC mintáinál kb 50%, a KS negatív betegeknél 8-13%-ban mutatták ki. Egy szövetminta negatív orf26 PCR eredménye nem zárja ki más szövetek HHV-8 fertőzését, ezért az antivirális ellenanyagok kimutatására szolgáló szerológiai vizsgálatok a legalkalmasabbak az epidemiológiai felmérésekre. A PCR pozitív, ellenanyag negatív betegek esetében valószínűsíthető, hogy a fertőzés korai szakaszában detektáltuk a vírust, mielőtt az immunválasz indukálódott. A HHV-8 kimutatása PBMC-ből látens infekcióra, míg szérumból és plazmából (nem-sejt asszociált HHV-8) aktív replikációra utalhat. Reaktiváció vagy késői elsődleges fertőzés esetén mind a vírus ellenanyag, mind a vírus DNS kimutatható. Eredményeink igazolják, hogy az orf26 nukleotid polimorfizmus vizsgálata szövetmintából hatékonyan bizonyul a HHV-8 DNS kimutatására.

### **Az orf-K1 heminested PCR eredményei**

Az orf-K1 régióra tervezett primerekkel a fent említett 17 beteg 36 mintáját vizsgáltuk meg és 12 esetben sikerült kimutatni HHV-8 orf-K1 DNS-ét. Az optimalizálás BCBL-1-ből nyert DNS-sel történt.

### **Az orf-K1 fragmentum szekvenálási eredménye**

A HHV-8 pozitív KS szövetből izolált DNS szekvenciája alapján az orf-K1 A1 valamint A2 variánsai közé sorolhatóak a minták. Részletesen, a Hun30a, Hun30b, Hun31b, Hun32, Hun33, Hun34a az A1 szubtypussal, a Hun31a, Hun34b, Hun35, Hun36 az A2 szubtypussal mutat homológiát. Az A1 törzsbe tartozó nukleotid és aminosav szekvenciák 100% azonosságot mutatnak az A1 típusú K1/E25 és K177/47 prototípussal. Míg a Hun31a 96,5%, a Hun34b és Hun35 94,8%, míg a Hun36 93% azonosságot mutat a A2 típusú K1/E41 prototípussal aminosav szinten. A pontmutációk három esetben jártak aminosav cserével, a többi esetben "néma" mutáció történt (aminosavcserét nem okozó bázisváltozás).

A Hun31 és Hun34 betegek két eltérő időpontban levett mintájából a HHV-8 két különböző orf-K1 variánsát identifikáltuk. Az első mintájának (Hun31a) szekvenciája A2 variánsúnak bizonyult, míg a másik időpontban levett minta A1, a Hun34 betegnél ugyanezt tapasztaltuk. Az orf-K1 eredményeinkhez hasonlóan több munkacsoport személyen és mintán belüli genotípusos különbséget talált KS léziók, vér és szájüregi minták orf73, orf K1 és orf26 fragmentumok szekvenálása során. Cook és munkatársai egy afrikai betegben A4 és B1 orf-K1 szubtypusokat identifikáltak. Habár úgy tűnik, hogy egy betegben egyetlen HHV-8 variánssal történő fertőződés dominál, azonban a rekombináns genomok izolálása felveti a különböző szubtypusokkal történő egyidejű fertőzés lehetőségét. Azonban mások nem igazolták ezen eredményeket, ugyanazon beteg több mintájában nem találtak variabilitást. Mivel úgy tűnik, hogy a K1 gén nem variálódik egy fertőzött személy életében, ezért valószínűsíthető, hogy a betegek többszörösen fertőződtek a HHV-8 különböző törzsével. Jelenleg még nem tudjuk, hogy ez koinfekció, reaktiváció vagy szuperinfekció következménye.

A Hun30a, Hun30b, Hun31a, Hun31b, Hun32, Hun33, Hun34a, Hun34b, Hun35, Hun36 szekvenciákat elküldtük az NCBI GenBank adatbázisába, regisztrációs számuk a következő: KF829938, KF829939, KF829940, KF829941, KF829942, KF829943, KF829944, KF829945, KF829946, KF829947.

## **Filogenetikai analízis**

Az ORF-K1 gén 400 bp hosszúságú (VR1 régiót tartalmazó) fragmentumának szekvenálása elegendőnek bizonyult a filogenetikai analízishez, mint azt már Meng és munkatársai is igazolták és egyenértékű a teljes gén alapján készített analízissel. A K1 törzsek filogenetikai analíziséhez 19 referencia törzset választottunk, melyek szekvenciái a GenBank adatbázisából származnak: B1 (K1-431KAP, AF133040), B2, (UgD1, AF130292), D1 (TKS10, AF133043), D2 (ZKS3, AF133044), E (Tupi2, AF220293), C (K1-43Berr, AF178810), C (K1-8Dem, AF178780), C1 (ASM72, AF133041), C3 (BC-2, AF133042), A5 (K1-7/Ngo, AF178779), A3 (BCBL-1, U86667), A3 (K1/E36, AY204662), A2 (K1-E41, AY204657), A2 (K1/E12, AY204663), A2 (BC-1, U75698), A2 (K1-E23, AY204668), A1 (BCBL-R, AF133038), A1 (K1-E25, AY204654), A1 (K1-77/47, AF201850). Az A, B, C, D, E a szubtypusokat jelöli. Törzsfánk tartalmazza az eddig Magyarországon elvégzett egyéb K1 szekvencia eredményeket is.

A genetikai távolságokat a Lasergene Megalign programmal becsültük meg, a Kimura 2-paraméteres modell alapján. A törzsfát a phylogeny.fr honlap segítségével szerkesztettük, a megbízhatóságát 100 „bootstrap” értékkel ellenőriztük. A filogenetikai analízis során 2 különböző set-et használtunk. Az első az összes szubtypust tartalmazza, míg a másik csak a közeli A típusokat.

## **MEGBESZÉLÉS**

### **A testüregi B-sejtes lymphoma sejtvonalak érzékenységevel kapcsolatos megállapítások**

A ritka testüregi B-sejtes lymphoma biológiai tanulmányozása az in vitro körülmények között növekvő sejtvonalak segítségével lehetséges. Az általunk használt sejtvonalak különböző eredetűek, melyek testüregi B-sejtes lymphomás betegek ascitesből, testüregi folyadékból, valamint perifériás vérből lett előállítva. Eredményeink azt mutatják, hogy a BC sejtvonalak gyógyszerérzékenységei mintázata a sejtek eredetétől függetlenül megegyezik. Egyedül egy sejtvonal mutatott viszonylag nagyobb rezisztenciát, míg 2 sejtvonal (BC-1 és BCBL-1) erősen érzékeny minden tesztelt gyógyszerre.

A kapott eredmények alapján a BC sejtvonalak egy közös érzékenységi profilt mutatnak. Ezek mintázatok nem mutatnak egyértelmű összefüggést a lymphomák biológiai vagy klinikai

háttérével. A gyógyszerérzékenységek klaszter analízise során nem látható összefüggés az EBV, HIV státusszal, az anatómiai lokalizációval, az életkorral, vagy a betegség lefolyásának a gyorsaságával. 2 sejtvonal (BCP-1 és BC-3), melyek HIV negatív betegből származnak, viszonylag kisebb gyógyszerérzékenységi mintázatot mutatnak.

A jelenleg alkalmazott terápia a methotrexát kombinációja a CHOP-nal (cyclophosphamide, doxorubicin, prednisolone, vincristine), valamint előrehaladott stádiumú, rossz prognózisú esetekben szóba jöhet a BEACOPP alapdózisú protokoll (bleomycin, etoposid, doxorubicin, cyclophosphamid, vincristin, procarbazin, prednisolon). Az adataink a sejtvonalak változatos érzékenységét mutatta a methotrexatra, bleomycinre, doxorubicinra, etoposidra, vinblastinra és vincristinre, de prednisolonra teljesen rezisztensek voltak. Sajnálatos módon a cyclophosphamide és ifosfamid nem a lista tagja, ugyanis egyik gyógyszer sem aktív önmagában, mindkettőt a máj konvertálja aktív metabolittá (4-OH cyclophosphamide és chloroacetaldehyde).

Korábban közölték hogy a proteosoma inhibitor bortezomib apoptózist indukál BCBL-1 és BCP-1 sejtvonalak esetén. A mérésink során csak a BCBL-1 mutatott érzékenységet a bortezomibra és csak a legnagyobb koncentrációban.

Vizsgálataink szerint a BC sejtvonalak különösen érzékenyek a mikrotubulus ellenes szerekre és az anthracyclin származékokra. Habár mindkét említett csoport gyógyszerei mindegyik sejtvonalon mutatott dóziszfüggő sejtpusztulást, ha az in vitro használt gyógyszerkoncentrációt hasonlítottuk össze a legmagasabban elérhető plazmakoncentrációval (QAUC<sup>72óra</sup>), az epirubicin, a daunorubicin, a paxlitacel és a vinorelbin bizonyult a leghatásosabbnak.

Eredményeink alapján javasoljuk a fent említett gyógyszerek használatát és beépítését a HHV-8 indukálta testüregi B-sejtes lymphoma betegségek során használt protokollokba. A gyógyszer válaszok heterogenitása miatt érdemes lenne személyre szabott terápiát végezni minden beteg kezelése előtt.

### **K1 törzsek evolúciójával és eredetével, hazai előfordulásával kapcsolatos megállapítások**

17 betegből 36 minta állt a rendelkezésünkre, azonban nehéznek bizonyult az K1 régió amplifikálása. 22 esetben (61%) sikerült seminested PCR-rel orf-K1 régiót amplifikálni. Ebből 12 amplicon bizonyult megfelelő minőségűnek mind tisztaságban, mind mennyiségben a szekvenáláshoz, tehát tapasztalataink szerint az orf-K1 PCR-nek alacsony a hatékonysága.

Ennek oka, hogy az ORF-K1 génen belüli nukleotid változások kb. 85%-a vezet aminosav cseréhez, ami arra utal, hogy a K1 gén pozitív szelekciós nyomás alatt evolválódott. Habár úgy tűnik, hogy betegenként az egyetlen HHV-8 variánssal történő fertőződés dominál, azonban több variáns detektálása felveti a különböző szubtypusokkal történő egyidejű fertőzés és rekombináns genomok kialakulásának lehetőségét.

Hayward és munkatársai feltételezik, hogy a HHV-8 egy ősi emberi vírus, mely ugyan világszerte elterjedt a migrációval, de etnikai és földrajzi különbségek megfigyelhetők. Az első hatalmas migráció 100.000 évvel ezelőtt indult a Szaharától délre fekvő afrikai régióba (B szubtypus), majd 60.000 évvel ezelőtt Dél-Ázsiába és Afrikába (D szubtypus). Végül kb 35.000 évvel ezelőtt 2 főág vándorolt Európába és Észak-Ázsiába (A és C szubtypus). A B szubtypus filogenetikailag ősbibnek tűnik és távolabbi rokonságban áll az A és C szubtypusokkal (28-44% protein szekvencia eltérés), mint az A és C szubtypus egymástól (12-24% eltérés fehérje szinten).

Kínában KS-ás betegek szövetszövetmintáiból, valamint orosz és görög KS betegekből A és C szubtypust mutattak ki, Iránból a C típust jelentették. Ugandában az A5, B1 és az új F törzsek előfordulásáról jelentek meg közlemények. Zimbabweban az A5, B és a főként gyermek populációt fertőző Z szubtypus található meg. Új-Caledóniából és a Salamon-szigetekről, ahol az endémiás KS megjelenése a jellemző, a D szubtypus tipizálása történt. Peruban az A és C szubtypus dominál, melyet valószínűleg az európai bevándorlók (spanyol kolonizáció) szórta szét, de találtak A5 és B törzseket is, melyet az afrikai rabszolgák jelenlétére utal. Ritka E típust is analizáltak, mely az amerindianokra jellemző, a történelem folyamán ők hódították meg először ezt a régiót. Hasonló divergencia megfigyelhető Francia Guyanában is.

Gazouli és munkatársai felvetették, miszerint kapcsolat lehet a KS kliniko-epidemiológiai típusa és a különböző szubtypusok között, de kevés minta állt a rendelkezésükre. Továbbra is kérdéses, vajon egy bizonyos genotípus összefüggésbe hozható-e a KS (vagy egyéb HHV-8 asszociált betegségek) kifejlődésével vagy progressziójával, illetve a KS egy bizonyos kliniko-epidemiológiai formájával.

Jelen vizsgálataink során a különböző kliniko-epidemiológiai formájú KS betegek orf-K1 régió tipizálásával megállapíthatjuk, hogy a talált A szubtypus illeszkedik a régióban elterjedt törzsekhez, ám a viszonylag kevés mintaszám miatt a hazai HHV-8 törzsek genotípusainak meghatározásához további vizsgálatok szükségesek.

## Új eredmények

1. Testüregi B-sejtes lymphoma sejtvonal *in vitro* vizsgálata során kimutattuk, hogy a sejtvonalak eredetüktől függetlenül hasonló gyógyszerérzékenységi mintázatot mutatnak a több hatóanyagcsoportot felölelő citosztatikum sorozattal szemben.
2. Vizsgálataink szerint ezek a sejtvonalak különösen érzékenyek a mikrotubulusokra ható szerekre és az anthracyclin származékokra. *In vitro* gyógyszerérzékenységi eredményeink adatokat szolgáltatnak a jelenlegi empirikus terápia továbbfejlesztéséhez.
3. *Kaposi sarcomas* betegekből származó mintákban az orf-K1 génrégió szekvenálása alapján az HHV-8 szubtypusait identifikáltuk. Eredményeink alapján az A szubtypus, azon belül az A1 és A2 szubtypusok voltak azonosíthatóak. Két beteg mintájában az orf-K1 két különböző variánsát mutattuk ki.
4. A Kaposi sarcomás biopsziákban a régióban elterjedt törzsek egy részét lehetett kimutatni.

## ÖSSZEFOGLALÁS

A humán herpesvírus-8 (HHV-8) a *Kaposi sarcoma* (KS) patogenezisében bizonyítottan etiológiai szerepet játszik, amelynek felfedezése óta 20 év telt. A vírust *AIDS-hez társuló testüregi B-sejtes lymphomák* esetén, valamint *multicentrikus Castleman-betegségben*, és bizonyos esetekben *myeloma multiplexes* és *benignus monoklonális gammopathiás* betegek csontvelőmintájában is kimutatták. A malignus betegségben szenvedők kezelési eredményeinek javítása a jövőben a terápia agresszivitásának növelése helyett egyre inkább a személyre szabott terápiától várható. Az *in vitro* gyógyszerérzékenységi vizsgálatok segítségével meghatározott hatásos citosztatikumok alkalmazása javíthatja a betegség kimentetelét.

A HHV-8 kutatás sokat köszönhet a testüregi B-sejtes lymphomának, ugyanis ez ebből eredő immortalizált sejtvonalak *in vitro* kultúrában könnyen fenntarthatóak és a vírust látens episzomális formában hordozzák. 11 BC sejtvonal *in vitro* gyógyszerérzékenységét vizsgál-

tuk. Az élő és elpusztult sejtek számát automatizált lézer konfokális mikroszkóp segítségével határoztuk meg. A sejtvonalak eredetüktől függetlenül hasonló gyógyszerérzékenységi mintázatot mutattak a 27 tesztelt citosztatikummal szemben.

Vizsgálataink szerint a BC sejtvonalak különösen érzékenyek a mikrotubulus ellenes szerekre és az antraciklin származékokra, az epirubicin, a daunorubicin, a paxlitacel és a vinorelbin bizonyult a leghatásosabbnak.

Mivel a HHV-8 indukálta testüregi B-sejtes lymphoma viszonylag ritka betegség, nincs kialakult kezelési protokoll ezen betegség kezelésére, hanem a B-sejtes lymphomák sémáját követik, mely a betegség stádiumától függően különböző polikemoterápiát javasol. Eredményeink alapján javasoljuk a fent említett gyógyszerek használatát és beépítését betegségek során használt protokollokba.

A HHV-8 orf-K1 membránprotein szokatlanul magas szintű genetikai variabilitását mutat, melyre a filogenetikai kutatások alapulnak, ez alapján a HHV-8 hét fő szubtypusát írták le: A, B, C, D, E, F és Z. Kutatásaink során az orf-K1 génrégiót amplifikáltuk fel PCR segítségével és szekvenáltuk hazai *Kaposi sarcomas* betegek mintáin. Összesen 17 betegtől 36 formalinfixált paraffinba ágyazott preparátumot vizsgáltunk.

Az orf-K1 génrégió alapján az A szubtypust identifikáltuk, azonbelül az A1 és A2 szubtypust. Két beteg mintájában az orf-K1 két különböző variánsát mutattuk ki.

Az általunk végzett munka fontos adatokat szolgáltat a HHV-8 magyarországi elterjedéséről és eredetéről, mely alapján megállapíthatjuk, hogy a vizsgálatainkban talált szubtypusok illeszkednek a régióban elterjedt törzsekhez.

Iktatószám: DEENKÉTK/53/2014.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Ötvös Rita

Neptun kód: VEEKST

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

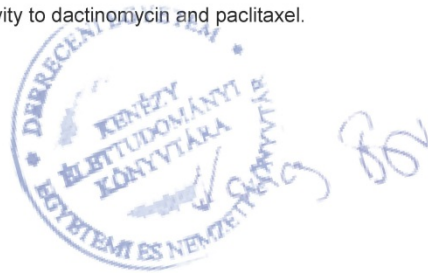
### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Ötvös, R.**, Juhász, A., Szalai, E., Újvári, D., Ötvös, K., Szabó, K., Remenyik, É., Székely, L., Gergely, L., Kónya, J.: Molecular Typing of Human Herpesvirus 8 Isolates from Patients with Kaposi's Sarcoma in Hungary.  
*Anticancer Res.* 34 (2), 893-898, 2014.  
IF:1.713 (2012)
2. **Ötvös, R.**, Skribek, H., Kis, L.L., Gloghini, A., Márkász, L., Flaberg, E., Eksborg, S., Kónya, J., Gergely, L., Carbone, A., Székely, L.: Drug sensitivity patterns of HHV8 carrying body cavity lymphoma cell lines.  
*BMC Cancer.* 11, 441, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-11-441>  
IF:3.011



### További Közlemények

3. Skribek, H., **Ötvös, R.**, Flaberg, E., Nagy, N., Márkász, L., Eksborg, S., Masszi, T., Kozma, A., Ádám, E., Miseta, A., Klein, É., Székely, L.: Chronic lymphoid leukemia cells are highly sensitive to the combination of prednisolone and daunorubicin, but much less to doxorubicin or epirubicin.  
*Exp. Hematol.* 38 (12), 1219-1230, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2010.09.001>  
IF:3.198
4. Márkász, L., Vanherberghen, B., Flaberg, E., **Ötvös, R.**, Stuber, G., Gustafsson Jernberg, Å., Oláh, É., Skribek, H., Székely, L.: NK cell-mediated lysis is essential to kill Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid B cells when using rituximab.  
*Biomed. Pharmacother.* 63 (6), 413-420, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2008.08.009>  
IF:2.238
5. Stuber, G., Flaberg, E., Petrányi, G., **Ötvös, R.**, Rökaeus, N., Kashuba, E., Wiman, K.G., Klein, G., Székely, L.: PRIMA-1MET induces nucleolar translocation of Epstein-Barr virus-encoded EBNA-5 protein.  
*Mol. Cancer.* 8, Article ID: 23, 1-12, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-8-23>  
IF:4.16
6. Márkász, L., Skribek, H., Uhlin, M., **Ötvös, R.**, Flaberg, E., Eksborg, S., Oláh, É., Stuber, G., Székely, L.: Effect of frequently used chemotherapeutic drugs on cytotoxic activity of human cytotoxic T-lymphocytes.  
*J. Immunother.* 31 (3), 283-293, 2008.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/CJI.0b013e3181628b76>  
IF:3.662
7. Márkász, L., Kis, L.L., Stuber, G., Flaberg, E., **Ötvös, R.**, Eksborg, S., Skribek, H., Oláh, É., Székely, L.: Hodgkin-lymphoma-derived cells show high sensitivity to dactinomycin and paclitaxel.  
*Leuk. Lymphoma.* 48 (9), 1835-1845, 2007.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10428190701559132>  
IF:1.512



8. Szalai, E., Takács, M., **Ötvös, R.**, Szlávik, J., Juhász, A., Berencsi, G.: Genotypic distribution of human herpesvirus-8 strains circulating in HIV-positive patients with and without Kaposi's sarcoma in Hungary.  
*Arch. Virol.* 150 (7), 1315-1326, 2005.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-005-0508-y>  
IF:1.819

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 21.313**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
4.724**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudánymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.03.12



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kónya József egyetemi docensnek, az Orvosi Mikrobiológiai Intézet vezetőjének, aki hozzáértő szakmai segítségével munkámat lelkiismeretesen irányította. Köszönöm a Karolinska Intézet professzorának Dr. Székely Lászlónak és Skribek Henriettének, akik a stockholmi munkám közvetlen irányítójaként segítettek és bevezettek a kutatómunka izgalmas világába. Mindhárman nélkülözhetetlen segítséget nyújtottak a munkaterv, a kéziratok és a PhD. dolgozat megszületésében.

Köszönetet szeretnék mondani Gergely Lajos Professor Úrnak, az Orvosi Mikrobiológiai Intézet korábbi vezetőjének, aki lehetővé tette, hogy az intézet keretei között végezhessem PhD tanulmányaimat.

Hálás köszönettel tartozom Balla György Professor Úrnak segítő észrevételeiért és a folyamatos támogatásáért.

Köszönettel tartozom korábbi témavezetőmnek Dr. Juhász Attilának, aki a téma felé irányította érdeklődésemet, és Remenyik Éva professzor asszonynak, aki a Bőrgyógyászati Klinikán biztosított háttérrel a kezdeti munkához.

Továbbá köszönetet mondok szerzőtársaimnak, különösen Dr. Márkász Lászlónak, Emilie Flabergnek, Ujvári Dorinának, akik támogattak a kutatómunkámban.

Kutatásaim végzéséhez elengedhetetlen technikai segítséget nyújtott Szécsiné Kerekes Margit, Ródné Ötvös Zita, Dr. Salamon Dániel és Muhari Orsolya, akiknek ezúton is köszönöm munkájukat.

Végül köszönöm férjemnek, édesanyámnak, családomnak és barátaimnak, hogy mindig melletttem álltak és támogattak a munkám során.