

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

HIV-2: A vírus replikáció dinamikája, evolúciós rátája és a dupla fertőzésben betöltött szerepe

Szojka Zsófia Ilona

Témavezető: Dr. Tőzsér József



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2020.

HIV-2: A vírus replikáció dinamikája, evolúciós rátája és a dupla fertőzésben betöltött szerepe

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: **Szójka Zsófia Ilona**

Molekuláris Biológus

Készült a Debreceni Egyetem

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Tőzsér József, MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

Elnök:

Prof. Dr. Fésüs László, MD, PhD, akadémikus

Tagok:

Prof. Dr. Nyitray László, PhD,

Dr. Szabó Judit MD, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, ÉTK, 3.506

2019. október 15. 10:30

Az értekezés bírálói: Dr. Fehér Enikő, PhD

Dr. Bácsi Attila, PhD

A bírálóbizottság:

Elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, MD, PhD, MTA doktora

Tagok: Prof. Dr. Minárovits János, PhD, MTA doktora

Dr. Szabó Judit MD, PhD

Az értekezés védésének (online formátum) időpontja:

2020. december 8. 10:00

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze a szojka.zsofia@med.unideb.hu e-mail címre küldött üzenetben a 2020. december 4. 12 óráig. A határidő lejáratát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

BEVEZETÉS

HIV-2 epidemiológiája és klinikai megjelenése

A WHO adatai alapján, megközelítőleg 37.9 millió HIV fertőzött van világszerte. A fertőzések jelentős hányada HIV-1 fertőzés, azonban jelenleg is hiányosak az adatok a HIV-2 fertőzöttek számáról; egy régebbi statisztika alapján 1-2 millió HIV-2 fertőzött él világszerte, mely szám magában foglalja a HIV-2 és a HIV-1/HIV-2-vel duplán fertőzött (HIV-D) betegeket is. A HIV-2 és a HIV-D fertőzéseket leginkább Nyugat Afrikában regisztráltak, illetve az e területtel történelmi kapcsolatot ápoló régiókban, mint például: Portugália, Franciaország és Spanyolország. A legtöbb HIV-2 fertőzöttet Sierra Leone, Gambia, Szenegál, Elefántcsontpart, Guinea és Bissau-guineai Köztársaság területén regisztráltak. A HIV-2 fertőzés, - a HIV-1-hez képest - kevésbé patogén, a plazma vírus szint alacsony vagy nem detektálható (Avettand-Fenoel et al., 2014), a CD4+ szint lassabb csökkenése (Van der Loeff et al., 2002) és az AIDS progressziójának lassabb kialakulása jellemző, még antiretrovirális terápiában nem részesülő betegek esetén is.

HIV-1 és HIV-2 dupla fertőzés

Azokon a területeken, ahol mind a két HIV vírus előfordul, a betegek fertőzöttek lehetnek mind a két vírussal. A HIV dupla fertőzés (HIV-D) prevalenciája megközelítőleg 0-3,2 % olyan nyugat afrikai országokban, mint Guinea és a Bissau-guineai Köztársaság (Da Silva et al., 2008). Továbbá, a francia HIV betegek 0,2%-a és a spanyol HIV-2 fertőzöttek 32%-a dupla fertőzött (Barin et al., 2007) (de Mendoza et al., 2017). A CD4+ T-sejtek csökkenése a fertőzés előrehaladásának egyik indikátora lehet. A HIV-D fertőzöttek esetén a CD4+ és a CD8+ T sejtek szintje szignifikánsan magasabb, illetve a CD8+ T-sejt szint lassabb csökkenését regisztrálták, HIV-1 fertőzöttekhez képest (Esbjörnsson et al., 2012). HIV-D fertőzöttek közel felénél a plazma vírus szint nem volt meghatározható, hasonlóan a HIV-2 infekciónál tapasztaltakhoz (Gottlieb et al., 2018). Továbbá a dupla fertőzött betegek esetén a HIV-1 plazma vírus szint is alacsonyabb volt, mint a csak HIV-1-el fertőzött egyéneknél. Ezen felül a dupla fertőzésre jellemző az AIDS lassabb progressziójának kialakulása, a HIV-1 monoinfekcióhoz képest. A dupla fertőzés mechanizmusa jelenleg nem ismert. Traver és mtsai., 70 %-os HIV-1-el szembeni "protekciót" jegyeztek le a dupla fertőzöttek esetén (Travers et al., 1995), míg más tanulmány nem talált ilyen, a HIV-1-el szembeni gátló hatást (Greenberg, 2001).

Vírus evolúció és a betegség progressziójának kapcsolata

A magas mutációs és replikációs rátának köszönhetően mind a két HIV vírusra jellemző a gyors evolúciós készség. A spontán mutációk magas rátájából kifolyólag kialakuló gyors virális evolúció következtében a vírus képes az immunválaszok kijátszására, mint például neutralizáció „elkerülésére”, illetve a betegség progressziójának felgyorsítására is. A HIV vírusok gyors evolúciójának hátterében a reverz transzkriptáz (RT) hibajavító aktivitásának hiánya és a virális cDNS celluláris citidin deaminázok általi módosítása áll (Andrews and Rowland-Jones, 2017) (Cuevas et al., 2015). A HIV-1 mutációs rátája extrém magas, ezzel szemben a HIV-2 mutációs rátájáról az adatok hiányosak. A HIV evolúció és a betegség progressziójának kapcsolata már régóta ismert a szakirodalomban (MacNeil et al., 2007) (Lemey et al., 2007). Míg ez a kapcsolat a HIV-1 esetén jól karakterizált (Salemi, 2013), a HIV-2 vírus evolúciójáról, specifikusan a fertőzöttekben lejátszó evolúciós folyamatokról ismereteink hiányosak.

A HIV-2 genomjának specifikus elemei a HIV-1 genomjához viszonyítva

A két HIV vírus 55-48% hasonlóságot mutat a nukleinsav összetételben. A HIV-1-hez hasonlóan 3 fő csoportba oszthatóak a HIV-2 gének is: a szerkezeti gének: *gag*, *pol*, *env*; szabályozó gének: *tat*, *rev*, és a kiegészítő gének: *vif*, *nef*, *vpr* and *vpx*. A fő szerkezeti gének esetén: *gag*: 54 %, *pol*: 55 % és *env*: 35 % hasonlóság figyelhető meg. A két vírus esetén a legnagyobb eltérést a kiegészítő gének esetén figyelhetünk meg. Például a HIV-2 kódol virális protein X (*vpx*) gént, míg a HIV-1 nem. Továbbá, habár mind a két HIV vírus kódol szabályozó géneket, ezek jelentős mértékben eltérhetnek aminosav szinten, ilyen például a transzkripció transz-aktivátor fehérje (Tat).

HIV-2 Transzkripció transz-aktivátor protein (Tat)

A Tat jelentős szerepet tölt be a virális transzkripció elindításában. Habár mind a két HIV vírus Tat-ja a transzkripció indukciójáért felelős, jelentős különbségek figyelhetők meg a két Tat között. A HIV-2 Tat mindössze 30 % hasonlóságot mutat aminosav szinten a HIV-1 Tat-tal. A Tat transzkripció aktivitásában az első három doménje játszik szerepet (Pro-gazdag, Cys-gazdag, és a mag régió). Habár a Pro-gazdag régió is felelős a transzaktivátor funkcióért, a két vírus Tat-jának ezen régiója között mindössze 10 % hasonlóság figyelhető meg. Továbbá, míg a HIV-1 Tat Pro-gazdag doménjében létrejövő mutációknak semmilyen hatása nincs a fehérje funkciójára, HIV-2 Tat esetén ismereteink hiányosak (Rossenkhon et al., 2012). Ezzel szemben a Cys-gazdag régióban kialakuló

Tyr -Ala szubsztitúciók a HIV-1 és a SIV Tat fehérjék hibás feltekeredését, ezáltal inaktiválását okozzák (Das et al., 2007).

Vpx

Virális protein X (vpx) csak a HIV-2 és az SIVsmm (kormos mangabé) genomjában kódolt. Egyik fő funkciója a preinetrációs komplex nukleáris trnaszportja, amelyben a K⁶⁸ és R⁷⁰ aminosavrészek vesznek részt (Belshan, 2002). A Vpx másik fő funkciója a celluláris restrikciós faktorról, a SAMHD1-el való kapcsolódás, mely restrikciós faktor specifikusan képes a HIV-1 replikációjának gátlására; a fertőzés korai fázisában a celluláris szabad dNTP szint lecsökkentése révén (Hollenbaugh et al., 2014).

A Vpx a SAMHD1 proteozómális lebontását indukálja a Cullin4-DDB1-DCAF1 E3 ligáz komplexszel való kapcsolódás révén (Ciftci et al., 2015). Ezen kapcsolódásban a K68 aminosavrésszel kiemelt jelentőséggel bír (Mcculley et al., 2012).

CÉLKITŰZÉS

Habár a HIV-2 vírust és az ehhez kapcsolódó fertőzést már több mint 30 éve leírták a vírus patomechanizmusáról, a vírus evolúciójáról ismereteink hiányosak. Ehhez hasonlóan a két HIV vírus által okozott dupla fertőzés (HIV-D) patomechanizmusáról is kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre. Annak ellenére, hogy a két HIV vírus hasonló replikációs ciklussal rendelkezik, genomjuk mindössze 40 %-os hasonlóságot mutat, és mind a két HIV vírus kódol egyedi géneket, mint például: a virális protein x (*vpx*) a HIV-2 esetén. Továbbá a legtöbb HIV virális protein polimorf, és ugyan mind a két vírus esetén azonos, vagy hasonló funkciót töltenek be, az aminosav szekvenciájuk jelentősen eltér; erre példa az egyik szabályozó fehérje, a transzkripció transz-aktivátor, a Tat (Kurnaeva et al., 2019).

A HIV-2 fertőzés többnyire az AIDS lassú, vagy a HIV-1 infekcióhoz képest lassabb progressziójával jellemezhető (Esbjörnsson et al., 2018), annak ellenére, hogy feltételezhetőleg a HIV-2 is magas mutációs rátával rendelkezik, akár csak a HIV-1 (Rambaut et al., 2004). Az eltérő progresszió ellenére is limitáltak az ismereteink a HIV-2 evolúciós rátája és a betegség progressziója közötti összefüggésről.

Céljaink a következők voltak:

1. HIV-1/2 dupla fertőzés karakterizálása sejt laboros körülmények között
2. A HIV-2 Tat savas doménjában lévő mutációk hatásának tanulmányozása *in silico* és *in vitro*
3. Szenzitív HIV-2 DNS kvantifikálási protokoll belállítása
4. A HIV-2 evolúciós rátájának összehasonlítása a gyors és lassú betegség progresszorok között

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Plazmidok

A HIV-1 és HIV-2 pszeudovirion termeléshez 2. generációs lentivirális vektor rendszert alkalmaztunk. A HIV-1 pszeudovirion termeléshez a következő plazmidokat alkalmaztuk: psPAX₂ csomagoló plazmid, amit Dr. D. Trono-tól (Geneva Orvosi Egyetem) kaptunk ajándékba; pWOX-CMV-GFP transzfer vektor, mely zöld fluoreszcens proteint (Green Fluorescent Protein (GFP)) kódol, valamint a pMD.G plazmid; ami a vezikuláris sztomatitisz vírus burok fehérjéjét kódolja. A HIV-2 pszeudovirion termeléshez a következő plazmidokat használtuk: HIV-2 CGP (HIV-2 ROD alapú expressziós vektor), CRU5SINCGW transzfer plazmid, mely egy CMV promóter indukálta GFP expresszós kazetta rendszer és a pMD.G plazmid. A HIV-2-CRU5SIN-WPRE vektor U5 és HIV-2 *gag* régiókat tartalmaz, azonban a *pol* és *env* régiók eliminálva vannak a rendszerből. HIV-2 CGP és CRU5SINCGW plazmidokat Joseph P. Dougherty -től kaptuk (Robert Wood Johnson Medical School). A pcDNA3.1-Vpx-NeGFP egy HIV-2 Vpx-GFP fúziós fehérjét kódoló plazmid, amiben a kódolt HIV-2 *vpx* gén szekvenciája azonos a HIV-2 CGP vektorban kódolt *vpx* gén szekvenciájával. A mock plazmidot, a pcDNA3.1-NeGFP-t a pcDNA3.1-Vpx-NeGFP, KpnI és XbaI restriktációs enzimekkel történt hasítása, majd ligálása révén hoztuk létre. A THP-1 sejteken elvégzett kísérleteink során a pTY-EFeGFP vektort használtuk kontrollként.

Mutagenézis

“QuikChange II és QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit”-eket (Agilent Technologies) használtunk a HIV-2 CGP plazmidban létrehozandó mutációk kialakításához. Proteáz: D25N, Tat: Y44A / Y55A, Rev: H73R, Vif: S144A, Vpr: R78A, Vpx: K68A és R70A. A Vpx inaktíváló mutációt (K68A és R70A) a pcDNA3.1-Vpx-NeGFP vektorban is létrehoztuk. A mutagenézis sikerességét szekvenáló PCR reakcióval ellenőriztük.

Tat mutációk *in silico* predikációja

Az *in silico* jóslásokhoz a HIV-2 Tat protein szekvenciákat az UniProt adatbázisból (UniProt ID: P04605), a fehérje modell szerkezeteket a Swissmodel rendszeréből töltöttük le (Bienert et al. 2017). A pontmutációk indukálta stabilitási változásokat és a rendezetlenségi vizsgálatokat IUPred (Dosztanyi et al. 2005) és I-Mutant 2.0 szerverek segítségével jóslottuk (Capriotti, Fariselli, and Casaio 2005); míg a másodlagos szerkezet vizsgálatokhoz a JPred4 szerveret alkalmaztuk (Drozdetskiy et al. 2015). A jóslott

pontmutációk Tat protein stabilitásra kifejtett hatását SDM szerver (Pandurangan et al. 2017) és FoldX algoritmus segítségével vizsgáltuk (Guerois, Nielsen, and Serrano 2002).

HIV-1/2 dupla fertőzés vizsgálata HEK293T sejteken

HIV-1 és HIV-2 virionok termelése

A pszeudovironok termeléséhez HEK293T, humán embrionális vese-eredetű sejtvonalat használtunk (Invitrogen). A HIV-1 pszeudovironok termeléséhez: psPAX2, pWOX-CMV-mCherry, és pMD.G plazmidokat; míg HIV-2 termeléshez: HIV-2 CGP, HIV-2 CRU5SINCGW, és pMD.G lentivirális vektorokat használtunk. Az Y44A és Y55A Tat mutáns HIV-2 virionok termeléséhez olyan CGP plazmidot használtunk a transzfekció során, mely a fent említett Tat mutációkat kódolja. HEK293T sejteket a transzfekciót megelőző napon úgy passzáltuk, hogy másnap a konfluencia megközelíthetőleg 70% legyen. A transzfekciós reagensünk polietilén-imin (PEI) volt, és miután a PEI-DNS elegyet a HEK293T sejtekhez adtuk, a sejteket 5-6 órán át 37°C-on, 5 % CO₂ tartalom jelenlétében antibiotikum mentes, 1 %-os FBS-t tartalmazó DMEM-ben tartottuk. Az inkubálást követően a sejteken médiumot cseréltünk és 72 órán keresztül, 24 óránként a termelt vírusokat tartalmazó felülúszót összegyűjtöttük és a sejtekhez új médiumot (DMEM) adtunk. A vírusokat ultracentrifugálás segítségével koncentráltuk, majd a pelletet 200 µl PBS-ben oldottuk. A reverz transzkriptáz (RT) aktivitást és a HIV-1 (p24) és HIV-2 (p27) kapszid termelést, ELISA alapú kolorimetriás esszék segítségével végeztük.

HIV-1 és HIV-2 dupla transzdukciós esszék

Szimultán infekció (transzdukciós) modell

A transzdukciót megelőző napon a HEK293T sejteket 48-lyukú sejtenyésző edényre osztottuk, majd a transzdukció napján 30 ng RT mennyiségnek megfelelő HIV-1 és HIV-2 pszeudovirionokkal szimultán transzduktáltuk, szérum- és antibiotikum-mentes médiumban, mely 8 µg/ml koncentrációjú polibrént tartalmazott.

A HIV-1 és HIV-2 mono-infekciós kontrollok esetén a sejteket 30 ng RT mennyiségnek megfelelő HIV-1 vagy HIV-2 pszeudovirionokkal fertőztük meg. A transzdukció másnapján a sejtekhez dupla DMEM-et mértünk (20 % FBS, 2 % glutamin, és 2 % penicillin-streptomocint tartalmazó DMEM), majd 4 napig inkubáltuk. Ezt követően a fertőzés mértékének detektálását áramlási citométer segítségével állapítottuk meg.

“Szuperinfekció” (szuper-transzdukció) modellek

Hasonlóan a szimultán transzdukcióhoz, a HEK293T 48-lyukú sejttenyésztő edényre osztottuk. A HIV-1 „szuperinfekció” esetén a sejteket először 30 ng HIV-2-vel, majd 24 óra elteltével 30 ng RT mennyiségnek megfelelő HIV-1 pszeudovironnal transzduktáltuk és 4 napig inkubáltuk. A HIV-2 „szuperinfekció” esetén a sejteket először 30 ng RT mennyiségnek megfelelő HIV-1 vírussal fertőztük, majd 24 óra elteltével 30 ng HIV-2 pszeudovironnal transzduktáltuk és 4 napig inkubáltuk. Az inkubálást követően a HIV-1 (mCherry) és HIV-2 (GFP) pozitívítást FACS segítségével kvantifikáltuk.

Vad típusú és mutáns HIV-2 CGP vektorokkal elő-transzfektált HEK293T sejtek HIV-1 transzdukciója

A fent említett transzfekeiós protokollt alkalmazva, a HEK293T sejteket 10 µg vad típusú és mutáns proteáz, szabályozó vagy kiegészítő géneket kódoló CGP plazmiddal transzfektáltunk PEI reagenst használva, majd 5-6 óra elteltével a felülúszót lecseréltük új sejttenyésztő médiumra. Majd 30 óra inkubálást követően a transzfektált sejteket 48-lyukú sejttenyésztő edényre osztottuk, és 30 ng HIV-1 vírussal transzduktáltuk, 50 µl szérum- és antibiotium-mentes médiumban, mely 8 µg/ml koncentrációjú polibrént tartalmazott, 24 óra elteltével a sejteket kiegészítettük „dupla” DMEM-mel, majd további 3 napig inkubáltuk. Ezt követően a sejteket felkapartuk, 1 % formaldehidet tartalmazó PBS-ben fixáltuk és áramlási citométer segítségével, a HIV-1 pozitívítást (mCherry) megállapítottuk.

HIV-1 transzdukció a Vpx transzfektált HEK293T sejteken

A fent említett transzfekeiós protokollt alkalmazva, a HEK293T sejteket 10 µg pcDNA3.1-Vpx-NeGFP plazmiddal transzfektáltunk, majd 30 óra elteltével a Vpx-transzfektált sejteket 48-lyukú sejttenyésztő edényre osztottuk, és 20 ng HIV-1 vírussal transzduktáltuk. A fent említett protokollhoz hasonló körülmények között inkubáltuk, majd áramlási citométer segítségével a HIV-1 pozitívítást detektáltuk. Kontroll kísérleteinkben nem transzfektált; csak HIV-1 pszeudovironnal transzduktált; pcDNA3.1-NeGFP vektorral, és K68A-R70A funkcióképtelen Vpx mutánssal transzfektált, majd HIV-1 szuperinfektált sejteket detektáltunk.

HIV-2 Vpx expresszió detektálása HEK293T sejtekben Western Blot segítségével

A HIV-2 Vpx jelenlétének bizonyítására Western blottot alkalmaztunk. A fent említett transzfekciós protokollt alkalmazva a HEK293T sejteket transzfektáltuk 10 µg HIV-2 CGP, pcDNA3.1-Vpx-NeGFP vagy pcDNA3.1-NeGFP plazmidokkal, majd 30 órás inkubációt követően a felülúszót eltávolítottuk és a sejteket PBS-ben kapartuk fel. Centrifugálási lépést követően a sejteket pH 7,4 lízis pufferben vettük fel (50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 0.5 % NP-40, 5 mM EDTA, 50 mM NaF), és szokinálással segítettük elő a feltárást, majd a lizátumot centrifugáltuk és a fehérjét 14 % SDS poliakrilamid gélben szeparáltuk és nirtrocellulóz membránon detektáltuk. A Vpx detektálására HIV-2 Vpx monoklonális antitestet (Kappes et al., 1993), majd anti-egér IgG (Sigma-Aldrich) másodlagos antitestet alkalmaztunk. A protein mennyiségét β -aktinra normalizáltuk (primer antitestnek β -aktin antitestet (Covalab) alkalmaztunk, majd a másodlagos antitest anti- egér IgG volt).

A Vpx transzfektált és HIV-1 transzduktált sejtek qPCR analízise

„Qiagen Blood and Cell culture DNA Mini Kit (Qiagen)” segítségével vontuk ki a virális DNS-t a HIV-1 transzduktált, és Vpx-el elő-transzfektált sejtekből. Ezt követően a HIV-1 2-LTR cirkuláris junkciók mennyiségét qPCR segítségével kvantifikáltuk. A qPCR lépései a következők voltak: iniciációs denaturálási lépés 95°C, 10 perc; ezt követte 45 ciklus: 95°C 1 perc, és 60°C 1 perc. Standardként pWOX-CMV-mCherry plazmidot alkalmaztunk, mivel LTR régiókat kódol. A HIV-1 DNS mennyiségét PBDG-re (porfobilinogén deamináz) normalizáltuk.

A HIV-2 Vpx HIV-1 pszeudovirionokba való beépülésének kimutatása

Először a HEK293T sejteket 10 µg pcDNA3.1-Vpx-NeGFP plazmiddal transzfektáltuk, majd 30 óra inkubálást követően a sejteket elvégeztük a HIV-1 pszeudovirion termeléshez szükséges transzfekciót. A kontroll kísérletekben pTY-EFeGFP plazmidot alkalmaztunk. Az így termelt virionok RT aktivitását RT ELISA segítségével állapítottuk meg. Továbbá Western blottot alkalmazva detektáltuk a Vpx jelenlétét a termelt HIV-1 pszeudovirionokban. Ennek során a virionokat pH 7,8 lízis pufferbe vettük fel (50 mM Tris, 80 mM KCl, 25mM DTT, 0,75 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100), majd a vírus lizátumot 14 % SDS poliakrilamid gélen történő elválasztás után vizsgáltuk Vpx jelenlétére. Primer antitestként anti-Vpx és anti-p24 monoklonális antitesteket alkalmaztunk (Chesebro et al., 1992), a szekunder antitest anti-egér IgG volt

(Sigma-Aldrich). Továbbá a termelt virionokkal új HEK293T sejteket transzduktáltunk, a már említett protokoll alapján. A transzdukció hatékonyságát fluoreszcens mikroszkóp segítségével határoztuk meg.

Kísérletek THP-1, monocita sejteken

Szimultán és „szuperinfekciós” (transzdukciós) vizsgálatok THP-1 sejteken

A THP-1 sejteket 96-lyukú sejttenyésztő edénybe osztottuk, szérum- és antibiotikummentes médiumban (RPMI-1640), mely 8 µg/ml koncentrációjú polibrént tartalmazott és 10 ng HIV pszeudovirionokkal transzduktáltuk. A transzdukciót követő napon a sejteket dupla RPMI médiummal egészítettük ki, majd további 3 napig inkubáltuk. A HIV-1 „szuperinfekció” esetén a sejteket először 10 ng HIV-2 virionnal transzduktáltuk, majd 30 óra inkubálást követően 10 ng HIV-1 vírussal ismételt transzdukáltuk a sejteket. Szintén 3 nap inkubálást követően a transzdukciós hatékonyságot áramlási citométer segítségével határoztuk meg.

A THP-1 sejtek aktiválása, transzfekciója, és transzdukciója

A THP-1 sejteket 48-lyukú sejttenyésztő edénybe osztottuk és 50 nM forbol-12-mirisztát 13-acetát (PMA) segítségével aktiváltuk. A monociták adherens makrofágokká történő differenciálódását optikai mikroszkóp segítségével detektáltuk. Az aktivált monocitákat ezt követően pcDNA3.1-Vpx-NeGFP vagy pcDNA3.1-NeGFP vektorokkal transzfektáltuk, Lipofectamine LTX reagens felhasználásával (Thermo Fisher Scientific). 30 óra inkubálást követően 13 ng HIV-1 vírussal transzduktáltuk a sejteket, majd 3 nap inkubálást követően fluoreszcens mikroszkóp és áramlási citometria segítségével detektáltuk a fluoreszcens sejteket.

A HIV-2 Tat Y44A mutáció hatásának tanulmányozása

Kísérletek GHOST(3) sejteken

GHOST(3) sejtek transzdukciója

GHOST(3) sejteket 12-lyukú sejttenyésztő edényre passzáltuk, majd 5 ng (p27, kapszidra normalizált) HIV-2 pszeudovirionnal (vad típusú és Y44A / Y55A Tat mutáns) transzduktáltuk, majd 3 napig inkubáltuk. Ezt követően az LTR-indukálta GFP pozitivitást FACS segítségével detektáltuk.

Dot Blot

A Dot Blot analízishez 1 ng (p27, kapszidra normalizált) vad típusú vagy Tat mutáns (Y44A/ Y55A) HIV-2 pszeudoviriont pH 7,8 lízis pufferben lizáltunk, majd 20 µl

lizátumot nitrocellulóz membránra vittünk fel. Ezt követően HIV-2 Tat anti-szérumot (Echetebeu and Rice, 1993), használtunk elsődleges antitestnek, amit anti-nyúl IgG másodlagos antitest követett a HIV-2 Tat jelenlétének kimutatására. Dot-blottolást az 5 ng HIV-2 (vad és mutáns) indikátor, GHOST(3) sejteken is elvégeztük. A sejtekről a transzdukciót követően a médiumot eltávolítottuk, majd a sejteket PBS-ben kapartuk fel és centrifugálási lépést követően, pH 7,4 lízis pufferben vettük fel, majd szonikáltuk, majd ismételt centrifugáltuk a lizátumot. 20 µl lizált felülúszót vittünk fel, majd HIV-2 Tat anti-szérumot használtunk a Tat detektálására. β-aktint használtunk normalizáló kontrollként.

Kísérletek HEK293T sejteken

A HIV-2 RT és Tat detektálása Western-blottal

A HIV-2 RT és Tat pszeudovirionokból történő detektálására western-blot analízist végeztünk. Ennek során 1 ng (p27, kapszidhoz normalizált) HIV-2 pszeudoviriont pH 7,8 lízis pufferben lizáltunk, majd 14 % SDS poliakrilamid gélen szeparáltunk. A HIV-2 RT, Tat és a normalizásához alkalmazott p24 detektálására: HIV-2 Tat anti-szérumot, anti-HIV-2 RT (Klutch et al., 1993) és anti-p24 monoklonális antitestet alkalmaztunk.

Az intracellulárisan expresszáldó RT és Tat kimutatására, HEK293T sejteket transzfektáltunk 10 µg vad típusú és Y44A mutáns Tat-ot kódoló HIV2 CGP vektorral. A transzfektálást követő 24 és 72 órával a sejteket PBS-ben kapartuk fel és szonikálással tártuk fel. Ezt követően 30 µl sejtlyizátumot (β-aktinhez normalizálva) 10 % SDS poliakrilamid gélen szeparáltuk és nitrocellulóz membránon detektáltuk. Az RT és Tat kimutatására HIV-2 Tat anti-szérumot, és anti-HIV-2 RT primer antitestet használtunk.

HIV-2 DNS kvantifikálása teljes vérből

DNS extrakció PM1, U1 sejtekből és teljes vérből

A DNS-t 5×10^6 PM1 sejtekből és 5×10^6 U1 sejtekből (U937 krónikusan HIV-1 fertőzött sejtek szubklónja) „Qiagen QIAamp DNA Mini Kit” segítségével nyertük ki. Az U1 sejteket a HIV-2 specifikus detektálásának kontrolljaként alkalmaztuk. A virális DNS-t 200 µl teljes vérből nyertük ki „Qiagen QIAamp Blood DNA Mini Kit” felhasználásával.

qPCR HIV-2 standard

A HIV-2 RNS-t 1.44×10^{11} RNS-kópia/ml elektronmikroszóppal számolt HIV-2 partikulumból extraktáltuk „Qiagen miRNeasy micro Kit” segítségével. Ezt követően a cDNS szintézishez „SuperScript III One-Step RT-PCR System” (Thermo Fisher

Scientific) és Platinum Taq DNA polimerázt (Thermo Fisher Scientific) használtunk. A reakció elegy (25 µl össztérfogatú) a cDNS szintézis során a következő volt: 2x RT puffer, 1 µl az eluált teljes RNS-ből (5,000 kópia/µl), 100 ng forward és reverz primerek, 1 µl SuperScript™ III „One-Step RT-PCR System Platinum™” Taq DNS polimeráz (Thermo Fisher Scientific), és RNáz/DNáz–mentes steril víz.

Az RT-PCR reakció körülményei a következők voltak: iniciációs cDNS szintézis 30 perc 50 °C-on, ezt követte egy iniciációs denaturálás 2 percig 94 °C-on, majd 35 ciklus 15 mp 94 °C, 30 mp 50 °C, 45 mp 68 °C, és egy végső elongációs lépés 5 percig 68 °C-on. A keletkezett terméket 1%-os agaróz gélen detektáltuk, és a PCR terméket QIAquick PCR tisztító Kit (Qiagen) segítségével tisztítottuk meg.

qPCR PBDG standard

A PBDG fragmenteket egy kétlépéses PCR segítségével hoztuk létre. Az első PCR során a reakció elegy a következőket tartalmazta: 10 ng PM1 DNS, 0.125 µl Dream Taq DNS polimeráz (5 U/µl), 5 mM dNTP mix és 100 ng primererk (PBGD-CF1 and PBGD-CR2). A második PCR során a reakció elegy a következő volt: 1 µl PCR termék az első PCR reakcióból, 0.125 µl Dream Taq DNA polimeráz (5 U/µl), 5 mM dNTP mix és 100 ng primerek (PBGD-CF1 and PBGD-CR1). A PCR terméket 1 %-os agaróz gélen detektáltuk. A két PCR körülményei a következők voltak: iniciációs denaturálás 2 percig 94 °C-on, majd 35 ciklus 30 mp 94 °C, 30 mp 55 °C, 45 mp 72 °C, és egy végső elongációs lépés 5 percig 72 °C-on. A keletkezett PCR terméket QIAquick PCR tisztító Kit segítségével tisztítottuk meg.

qPCR a HIV-2 DNS detektálására

A qPCR reakció elegy (30 µl) a következőket tartalmazta: 15 µl Thermo Fisher Maxima probe qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 4 µM próba, 100 ng/µl primer pár (Damond et al., 2002) és 8 µl templát DNS (a koncentrációja az eluált DNS-nek 800-1000 ng között volt). qPCR lépései: iniciációs denaturálási lépés: 95°C 10 percig, majd 40 ciklus 95°C 15 mp, 60°C 30 mp és extenzió 72 °C-on 30 másodpercig. A mennyiségi meghatározáshoz a HIV-2 *gag* standardból tízszeres és kétszeres hígítási sort alkalmaztunk, mely 10⁶ -tól 1 kópia szám DNS-nek felel meg. A HIV-2 DNS mennyiségét PBDG háztartási génhez normlizáltuk. A HIV-2 DNS koncentrációjának meghatározására a következő egyenletet alkalmaztuk: (HIV-2 DNS kópia / µl)/(PBDG kópia / µl / 2 kromoszóma / sejt) x 10⁵ cells = HIV-2 DNA kópia / 10⁵ sejt. A qPCR detekciós limitjének (LOD) megállapítására és a mennyiségi limit (LOQ) megállapítására

a Schwarz és mtsai. (2004) által leírt formulát alkalmaztuk.

CD4⁺ T-sejt szint és a HIV-2 evolúciós ráta kapcsolatának meghatározása

Guinea-Bissau-i kohort

A betegek mintáit a SWEGUB CORE csoport munkatársai gyűjtötték 1990 és 2011 között egy Guinea-Bissau-i HIV fertőzött beteg csoporttól (Mansson et al., 2009) (Norrgren et al., 1995) (Esbjörnsson et al., 2012). A kohort 438 HIV-2 fertőzött betegből állt. A HIV-2 *env* V1-C3 régiójának amplifikálása 16 betegtől származó, összesen 53 mintából történt (Mansson et al., 2009) (Norrgren et al., 1995).

HIV-2 *env* V1-C3 régiójának amplifikálása

A betegek plazmájából származó HIV-2 RNS izolálása Qiagen miRNeasy micro kit segítségével történt. A cDNS szintézishez “SuperScript III One-Step RT-PCR System” és “Platinum Taq DNA” polymeráz, KH2_OF, és TH2_OR primer párt használtunk. A következő PCR során “Platinum Taq High Fidelity” polimeráz és KH2_OF, és KH2_OR primer párt alkalmaztunk (MacNeil et al., 2007) (Barroso and Taveira, 2005). A PCR lépési a következők voltak: iniciációs cDNS szintézis: 30 perc 50 °C, ezt követte egy iniciációs denaturálási lépés 94°C 2 percig, majd 40 ciklus 94°C 15 mp, 50°C 30 mp, 68°C 60 mp, majd 68 °C-on 5 percig a végső elongációs lépés. Az amplifikált fragmentumok pCR2.1 TOPO rendszerbe lettek beklónozva, majd 12 egyedi klón került kiválasztásra szekvenálás céljából. A HIV-2 *env* V1-C3 régiójának szekvenciáinak analízise CodonCode Aligner v1.5.2 és MEGA5 (Clustal algoritmust alkalmazva) révén történt (Tamura et al., 2011).

Filogenetikai analízis

Kaplan-Meier analízis az AIDS progressziós idejének meghatározására alkalmazzák, a „log rank” tesztet pedig a kapott eredmények statisztikai összehasonlítására. A nem szignifikáns interakciók kovariánsainak detektálására Cox proporcionális hazard regressziós modellt alkalmaztunk. A PHI teszt a betegeken belüli rekombináció meghatározására alkalmas (Bruen et al., 2006), míg Maximum-likelihood (ML, legnagyobb valószínűség) filogenetikai fák a Garli v2.0 (Zwick) rekonstrukciós inferráló model révén lettek létrehozva. A szubtípus analízishez szükséges referencia szekvenciák a Los Alamos adatbázisból lettek letöltve és Clustal algoritmus révén illesztve (Tamura et al., 2011).

HIV-2 burokfehérje evolúciós analízise

Az időfüggés rekonstrukciója és a Bayes rooting filogenetikai fa BEAST v1.7.5

segítségével lett megőrsölva. Minden analízis során a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) 50×10^6 generáció lett alapul véve, mely minden 2500-5000 generációt vesz mintaként, és az effektív minta szám >100 . A szubsztitúciók meghatározására a Hasegawa, Kishino and Yano (HKY) szubsztitúciós modell volt alkalmazva (Hasegawa et al., 1985). A duplikált analízisek egyesítése LogCombiner v1.7.5 programmal történt (Drummond and Rambaut, 2007). A nukleotid (HKY) és kodon (GY94 kodon modell) szubsztitúciók rátájának meghatározása a HIV-2 burokfehérje gén V1-C3 régióján történt (Hasegawa et al., 1985) (Goldman and Yang, 1994). BEAST v1.7.5: hierarchiai filogenetikai modellt (hierarchical phylogenetic model (HPM)) a gyors és lassú progresszorok közötti evolúciós ráta összehasonlítására volt alkalmazva (Drummond and Rambaut, 2007) (Edo-Matas et al., 2011), és abban az esetben, ha a Bayes Faktor (BFs) >3 , akkor szignifikáns asszociációról beszélünk (Kass and Rafter, 1995).

Az abszolút ráták és a divergencia plottok

A szelekciós index és a molekuláris adaptáció a nem szinoním és szinoním ráták arányát jelzi (dN/dS ráta aránya), azonban ez nem alkalmazható a szimultán növekedés és csökkenés detektálására (Seo et al., 2004). Ebből kifolyólag, a szubsztitúciós ráta fájának minden ágát nem szinoním (nonsynonymous (E[N])) és szinoním (synonymous (E[S])) szubsztitúciós rátaaként kell jellemezni (Lemey et al., 2007). A HPM analízis révén, minden egyén esetén, 200 random fa generálás történt, melyek [N] és E[S] rátaaként való definiálására a HyPy 2.2.0 program volt alkalmazva (Pond et al., 2005).

HIV-2 env szelekciós analízise

BEAST v1.8.1 (Drummond and Rambaut, 2007) program segítségével az (E[N]) és (E[S]) szubsztitúciók hozzávetőleges aránya lett meghatározva minden kodonra, majd a pozitív és negatív szelekció közötti különbségek lettek meghatározva (Lemey et al., 2012).

HIV-2 burok fehérje felszín hozzáférhetőségének analízise

A HIV-2 gp125 (PBD ID:5cay) felszín hozzáférhetőségének analízisére DSSP szerver volt alkalmazva (Touw et al., 2015). Az aminosavrészek relatív hozzáférhetőségének meghatározása (Relative solvent accessibility (RSA)) Tien és mtsai által leírtak alapján történt (Tien et al 2013). Abban az esetben, ha az $RSA \geq 5\%$ az aminosavréssz a protein felszínén exponálódik (Miller et al., 1987). A pozitívan szelektálódott aminosavrészek felszínen való exponálásának reprezentálása Chimera program segítségével valósult meg.

Statisztikai analízis

One-way ANOVA analízist alkalmaztunk a vad és Tat mutáns esetén detektált RT aktivitás, transzdukciós hatékonyság és az LTR-indukálta GFP pozitivitás összehasonlítására, a dupla fertőzéses kísérleteink esetén (GraphPad Prism 7.0).

A filogenetikai analízisek során IBM SPSS Statistics 21 volt alkalmazva a Mann-Whitney U teszt, a Fisher's Exact Teszt, és a Friedman teszt, és a Spearman korrelációs analízis esetén.

EREDMÉNYEK

HIV-2 Vpx HIV-1 replikációjára kifejtett gátló hatása

HIV-1 és HIV-2 dupla transzdukciós kísérletek

A szimmultán transzdukciós kísérleteink során a HIV-1-hez kapcsolódó fluoreszcencia több mint 60 %-kal lecsökkent a HIV-1 mono-transzduált sejtekéhez képest (P érték = 0,001), ezzel szemben a HIV-2 transzdukciója nem változott szignifikánsan (P érték = 0.7). Amikor a HEK293T sejteket elő-transzduktáltuk HIV-2 virionokkal, majd ezt HIV-1 transzdukció követte, a HIV-1-hez kapcsolódó fluoreszcens szignál több mint 80%-al lecsökkent (P érték $\leq$ 0,01), ez a HIV-2, HIV-1 szuperinfekciójával szembeni védő hatását jelzi.

HIV-2 Vpx védő hatása a HIV-1-el „szuper-transzduktált” sejtekben

Annak meghatározására, hogy mely HIV-2 fehérje játszik jelentős szerepet a HIV-1 szuperinfekció gátlásában, a HEK293T sejteket defektív HIV-2 géneket kódoló CGP plazmidokkal transzfektáltuk, majd HIV-1 pszeudovironokkal transzduktáltuk. A HIV-1 transzdukciós hatékonysága a mutáns proteáz, Rev, Tat, Vpr és Vif esetén 40 %, 30 %, 51 %, 36 % és 45 %-al csökkent. Ezzel szemben a kontroll kísérletben, amikor a sejteket először HIV-2-CRU5SIN-WPRE vektorral transzfektáltuk, majd HIV-1-el transzduktáltuk a HIV-1 „infektivitás” nem változott. Azonban, amikor a sejteket először a funkcióvesztett *vpx*-et kódoló CGP plazmiddal transzfektáltuk, majd HIV-1-el „szuperinfektáltuk”, a HIV-1 „fertőzőképessége” szignifikánsan változott (P érték $\leq$ 0,05).

Vpx-GFP transzfektált sejtek HIV-1 transzdukciója

Az eredményeink alapján a HEK293T sejteket, olyan pcDNA3.1 vektorral transzfektáltuk, amely HIV-2 Vpx-GFP-t kódol (pcDNA3.1-Vpx-NeGFP), majd ezt követően HIV-1-el transzduktáltunk. A pcDNA3.1-Vpx-NeGFP vektorban kódolt *vpx* gén a vad típusú HIV-2 CGP plazmidban kódolt *vpx* génnel azonos. A mock vektort, a pcDNA3.1 plazmid KpnI és XbaI restrikciós enzimekkel történő hasítása révén hoztuk létre, ezáltal a *vpx*-et kódoló szekvenciát eltávolítottuk a plazmidból. A HIV-2 Vpx jelenlétében a HIV-1 infektivitása (transzdukciós hatékonysága) több mint 80 %-al csökkent a kontroll transzdukcióhoz képest. A Vpx intracelluláris expresszióját a pcDNA3.1-Vpx-NeGFP és HIV-2 CGP vektorokkal transzfektált sejtekből Western Blot segítségével detektáltuk. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a HIV-2 Vpx jelentős szerepet játszik a HIV-1 replikációjának a gátlásában.

A Vpx HIV-1 replikációra kifejtett hatása

Annak jellemzésére, hogy a Vpx milyen gátló hatással van a HIV-1 replikációra, qPCR segítségével detektáltuk a HIV-1 2-LTR junkciókat. Amikor a HEK293T sejtek először Vpx-GFP fúziós proteint kódoló plazmiddal lettek transzfektálva, majd ezt követte a HIV-1 transzdukció, a 2-LTR junkciók száma több mint 40%-al lecsökkent (P-érték < 0,01). Továbbá, a Vpx jelenlétében a p24 kapszid termelés és a HIV-1 RT aktivitás is szignifikánsan csökkent.

Vpx-GFP beépülése a HIV-1 pszeudovirionokba

Annak tanulmányozására, hogy a Vpx-GFP képes-e beépülni a HIV-1 pszeudovirionokba, a HEK293T sejteket először pcDNA3.1-Vpx-NeGFP plazmiddal transzfektáltuk, majd a sejtekben HIV-1 pszeudovirionokat termeltünk. Az így termelt HIV-1 virionokból detektálni tudtuk a 37 kDa méretű Vpx-GFP fúziós fehérjét. Ezen virionokkal történő transzduktálás után a Vpx-GFP jelenlétét fluoreszcens mikroszkóp segítségével tudtuk igazolni a sejtekben.

Kísérletek THP-1 sejteken

Amikor a THP-1 sejteket egyszerre transzduktáltuk mind két pszeudovirionnal, illetve amikor a HIV-1 vírussal „szuperinfektáltuk” a HIV-2 transzduktált sejteket a HIV-1 transzdukciós hatékonysága nem változott. Azonban amikor a THP-1 sejteket aktiváltuk és differenciáltuk PMA-val makrofágokká, majd pcDNA3.1-Vpx-NeGFP vektorral transzfektáltuk és ezt követően HIV-1-el transzduktáltuk, a HIV-1 „infektivitása” szignifikánsan lecsökkent, hasonlóan a HEK293T sejteknél tapasztaltakhoz (P érték ≤ 0,05).

A HIV-2 Tat Y44A mutáció hatása az RT expressziójára és aktivitásra és a provirális genom transzaktiválására

HIV-2 Tat mutációk *in silico* jellemzése

A „rendezetlenségi” predikációink azt mutatták, hogy a protein centrális régiója (39-78 aminosavak) globuláris természetű, ezzel szemben mind az N-, mind a C-terminális rész rendezetlen. SWISS-MODEL volt alkalmazva a potenciális destabilizáló mutációk meghatározására, mivel jelenleg nem áll rendelkezésre sem kristály-, sem NMR szerkezet a HIV-2 Tat proteinről. Az inaktiváló mutációk meghatározására szerkezet-alapú predikciókat végeztünk. Az ún. Alanin-szubsztitúció hatásának vizsgálatára FoldX algoritmust és SDM szerveret használtunk. Eredményeink azt mutatták, hogy alanin

szubsztitúció hatására a G36, L40, Y44, L47, L72, és a G80 aminosavak destabilizálást okozhatnak a proteinben. Ezen aminosav részek a fehérje centrális régiójában helyezkednek el és a szekvencia alapú predikációk alapján - melyek az I-Mutant szerver segítségével történtek - a fehérje szerkezetében és a stabilitásában indukálhatnak változásokat. Annak meghatározására, hogy a Y44A mutáció milyen hatással van a HIV-2 Tat másodlagos szerkezetére IUPred2A és Jpred4 szervereket alkalmaztunk. A Y44A mutáció a HIV-2 Tat N-terminális globuláris régiójában lévő α -helix lánc megszakadását képes előidézni.

Y44A mutáns HIV-2 Tat *in vitro* jellemzése

Kísérletek GHOST(3) sejteken

GHOST(3) sejtek *tat*-függő HIV-2 LTR-GFP konstruktot kódolnak, és a detektálható GFP fluoreszcencia összekapcsolódik a funkcionálisan megfelelően működő Tat fehérjének a jelenlétével és a transzdukció hatékonyságával. A Tirozin mutációk Tat-indukálta HIV LTR transzaktivitásra kifejtett hatásának vizsgálata érdekében a HIV indikátor sejteket 5 ng (p24 kapszidraz normalizált) virionnal transzduktáltuk. A GFP fluoreszcens jel szignifikánsan lecsökkent több, mint 93 %-kal és 91 %-kal a HIV-2 Tat Y44A és Y55A mutációk jelenlétében (P érték < 0.0001), a vad típusú Tat estén észleltékhez képest. Továbbá dot blottal detektálni tudtuk a HIV-2 Tat jelenlétét, mind a transzduktált sejtek lizátumából, mind a pszeudovirionokból.

Tat mutációk hatása a reverz transzkriptázra

RT aktivitást ELISA alapú kolorimetriás esszé segítségével detektáltuk a pszeudovirionokból. Az RT aktivitás 97%-kal csökkent le a Y44A és 96%-kal a Y55A *tat* mutációk esetén, a vad típusú HIV-2-höz viszonyítva (P érték $< 0,0001$). Ez arra enged következtetni, hogy a mutációk gátló hatással bírnak az RT aktivitásra.

Western blot analízist végeztünk annak érdekében, hogy meghatározzuk, hogy a Y44A Tat mutációnak van-e hatása az RT pszeudovirionba való becsomagolására. Az RT nem volt detektálható a Tat Y44A mutáns pszeudovirionokban. Ez megmagyarázhatja, miért nem volt detektálható semmilyen RT aktivitás, azonban a mutáció a kapszid szintet nem befolyásolta. Annak kiderítése érdekében, hogy a mutáció milyen változást indukál a RT expressziójában, HEK293T sejteket transzfektáltunk vad és Y44A mutáns Tat-ot kódoló HIV-2 CGP plazmidokkal, és az RT mennyiségében történő változásokat Western blot segítségével detektáltuk a transzfektált sejtek lizátumából egy 3 napos perióduson

keresztül. Már a transzfekciót követő 24 óra elteltével csökkent az RT mennyisége a mutáns esetén a vad típuséhoz képest, majd a 3. napon az RT nem volt detektálható.

HIV-2 DNS mennyiségi meghatározása

A specificitás meghatározására a qPCR-t több kontroll felhasználásával is vizsgáltuk: U1 sejtekből nyert DNS, HIV-1 fertőzött betegekből származó DNS és negatív egyénekből származó DNS. A felsorolt minták közül egyik sem adott pozitív eredményt, így a specificitás 100%-nak adódott. Az esszé szenzitivitása 100% volt 5 kópia/reakció esetén (14/14, 0.69 $\log_{10}$ és SD 0.44), míg 78%-nak adódott 1 kópia/reakció esetén (11/14). A detektálás limitje (LOD) 1 kópia/reakció volt (11/14), és a medián korrelációs koefficiens 0,999 (0,998-1,000), a kvantifikálási limit (LOQ) 5 kópia/reakció volt. Összesítve a provirális DNS detektálási limitje 0.5 kópia/ 10^5 leukocita volt. Annak meghatározására, hogy az esetleges humán DNS szennyezés hatással van-e a qPCR szenzitivitására, a reakciókat 1 μ g PM-1 DNS jelenlétében is elvégeztük. A „háttér” DNS-nek semmilyen hatással nem volt.

Alacsony posztzerokonverziós CD4⁺ T-sejt szint kapcsolata a gyors és lassú betegség progresszióval és a gyors virális evolúciós rátával HIV-2 fertőzés során

V1-V3 *env* régiók filogenetikai analízise

A „maximum likelihood” analízis 16 betegből származó, 409 *env* szekvencián lett elvégezve. Minden beteg esetén, minden minta gyűjtési időpontban kb 7 klón került megszekvenáltatásra, így összesen 528 szekvenciát kaptunk, azonban a 119 rekombináns szekvenciát eliminálva végül 409 szekvencián történt az evolúciós analízis. A filogenetikai analízis azt mutatta, hogy az összes szekvencia az A szubtípusba tartozik.

HIV-2 fertőzött betegek csoportosítása a betegség progressziójának függvényében

A tanulmány résztvevői a longitudinális CD4⁺ T sejtek dinamikája alapján lettek csoportosítva gyors és lassú progresszor csoportokba. A csoportosítás 3 különböző elven történt: CD4 % szint csökkenésének rátája, a CD4 % szint első és utolsó mintavétel közötti szintjének meghatározása alapján, és ezen kettő kombinációja révén. A CD4 % csökkenésének szintje alapján: 111 beteg lassú, míg 81 páciens gyors progresszorként lett csoportosítva. Ekkor a CD4 % csökkenés mértéke 2,7% /év (SD: 2,6), és a medián AIDS-ig eltelt idő 11,7 évnek adódott (95% CI 7,3-16,1) a gyors progresszorok esetén. A lassú progresszoroknál a CD4% csökkenése átlagosan 0,5% / év (SD: 1,6) és a medián AIDS-ig eltelt idő 16,8 évnek adódott (CI 12,3-21,3). A CD4 % szintje alapján: 87 beteg gyors

progresszorként lett csoportosítva, átlagos CD4% szint: 21.0% (SD 4.3), medián AIDS-ig eltelt idő 9.4 év (CI 6.7-12.1). Ezzel szemben 105 beteg lassú progresszor lett, átlagos CD4% szint: 35,0% (SD 5,7), medián AIDS-ig eltelt idő 15,5 év (CI 14,3-16,6) ($p<0,001$). A csökkenés mértékének és a CD4+ % szintnek együttes figyelembevétele esetén 85 beteg gyors progresszor volt: medián AIDS megjelenéséig eltelt idő 8,6 év (95% CI 6,5-10,8) és 107 beteg lassú progresszor let: medián AIDS megjelenéséig eltelt idő 18,7 év (CI 13,6-23,8) ($p<0,001$).

HIV-2 evolúciós ráta és a CD4 % kapcsolata

A HIV-2 evolúciós rátájának meghatározása hierarchiai evolúciós modellezéssel történt (HPM). A V1-C3 régiók evolúciója $23,5 \times 10^{-3}$ kodon szubsztitúció/pozíció/év-nek adódott. A CD4% szint és a kombinációs meghatározás alapján (CD4 % csökkenés mértéke és a szintje) a gyors progresszorok evolúciója sokkal gyorsabban játszódott le, $28,6 \times 10^{-3}$ kodon szubsztitúció/pozíció/év; mint a lassú progresszoroké: $14,9 \times 10^{-3}$ kodon szubsztitúció/pozíció/év. Továbbá a betegség progressziója és vírus evolúció között erős kapcsolat figyelhető meg, mely az Env első variábilis régióit (V1V2) (BF=11,8), és a konzervált régiókat (C2 (BF=28,4); C3 (BF=6,1)) érinti. Annak kiderítésére, hogy milyen különbségek vannak a két csoport között a nem szinoním és szinoním szubsztitúciók arányát (dN/dS) határoztuk meg. A dN/dS arányt a két csoport között összehasonlítva azt figyeltük meg, hogy csak a C2 régió volt az, ami erősen negatívan szelektálódott a gyors progresszorok esetén (BF=3,7).

Pozitív szelekció a HIV-2 Env konzervált régiójában a lassú progresszorok esetén

A két csoport összehasonlítása során megállapítottuk, hogy a pozitív szelekció mértéke hasonló volt a V1/V2, V3 és C3 régiókban. Azonban a C2 régió Env a lassú progresszoroknál több pozitívan szelektálódott aminosavrésszel rendelkezik, mint a gyors progresszorok (35 vs 20; $P=0,026$, Fisher Exact Teszt [FET]). Vannak olyan konzervált aminosavrészek az Env esetén is, melyek kritikusak a vírus fitnesszét tekintve. A 246 aminosavból, 84 konzervált a V1-C3 régióban, és 20 konzervált aminosav pozitívan szelektálódott a lassú progresszoroknál, míg a gyors esetén csak 5 aminosav ($P=0,002$, FET). Megfigyeltük azt is, hogy a legtöbb ilyen aminosav a C2 régióban a burokfehérje felszínén helyezkedik el.

DISZKUSSZIÓ

Míg a HIV-1 és HIV-2 hasonlóságot mutat a replikációs ciklusukban és az eredetükben, a HIV-2 több szempontból is eltér a HIV-1 vírustól. A HIV-2 infekció általában gyengébb tünetekkel és csökkent transzmissziós képességgel rendelkezik. Amíg a legtöbb HIV-2 fertőzöttet Nyugat Afrikában regisztrálták (Sousa et al., 2016), egyre több európai országban regisztrálnak HIV-2 fertőzöttet (Soriano et al., 2000) (Barin et al., 2007) (Dougan et al., 2005) (de Mendoza et al., 2014) (Ruelle et al., 2008). Azokban az országokban, ahol mind a két HIV vírus előfordul a fertőzöttek dupla fertőzöttek is lehetnek. Annak ellenére, hogy a HIV dupla fertőzés már régóta leírt folyamat, a patomechanizmusáról hiányosak az információink. Amíg Travers és mtsai. a HIV-2 HIV-1-el szembeni védő hatását írták le (Travers et al., 1995), más tanulmányok nem jutottak ilyen következtetésre (Norrgren et al., 1999) (Greenberg, 2001).

Célunk egy olyan *in vitro* modell létrehozása volt, mellyel sejtkultúrában tudjuk modellezni a HIV dupla fertőzést (HIV-D), továbbá célul tűztük ki, hogy meghatározzuk, hogy a HIV-2 szabályozó és kiegészítő fehérjék milyen szerepet játszanak a HIV-D-ben. A dupla transzdukciós kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a HEK293T szimultán „infekció” esetén a HIV-1 transzdukció mértéke 60 %-kal csökkent, míg a HIV-2-é nem változott.

A HIV-1 „szuperinfekció” esetén a HIV-1 transzdukció több mint 90 %-kal csökkent le. Annak kiderítése érdekében, hogy a szabályozó és kiegészítő fehérjék milyen szerepet játszanak ebben a gátlásban: a HEK293T sejteket először defektív HIV-2 proteáz, szabályozó és kiegészítő géneket kódoló vektorral transzfektáltuk, majd HIV-1 pszeudovirionnal „szuperinfektáltuk”. Eredményeink azt mutatták, hogy a defektív Vpx esetén a HIV-1 „infektivitás” nem változott, tehát feltehetőleg a Vpx jelentős szereppel bír a HIV-1 fertőzőképesség gátlásában. Amikor a sejteket csak Vpx-GFP fúziós proteint kódoló vektorral transzfektáltuk, majd HIV-1-el transzduktáltuk a HIV-1 transzdukció 80 %-kal lecsökkent. Továbbá a Vpx jelenlétében a 2-LTR junkciók száma is szignifikánsan lecsökkent, több mint > 40 %-kal. A Vpx expresszió hatására lecsökkent a HIV-1 kapszid mennyisége és az RT aktivitása. Amikor differenciált THP-1 sejteket transzfektáltunk Vpx-el, majd HIV-1 pszeudovirionnal transzduktáltunk, a HIV-1 fluoreszcencia több mint 80 %-al csökkent le.

További célunk a HIV-2 Tat savas doménjében lévő mutációk hatásának tanulmányozása volt *in silico* és *in vitro*. Szekvencia alapú predikációink és a stabilitási analízisek alapján azt találtuk, hogy a Y44A szubsztitúció a Tat protein inaktiválását

okozza. *In silico* analíziseink alapján több *in vitro* kísérletet végeztünk a Y44A mutáció karakterizálására. Annak megállapítására, hogy a Y44A mutáció milyen hatással van a provirális genom transzaktiválására, GHOST(3), HIV indikátor sejteket transzduktáltunk mutáns és vad típusú HIV-2 virionokkal. A Y44A Tat mutáció esetén az LTR-indukálta GFP szignál 90 %-kal lecsökkent. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a Pro-gazdag régió jelentős szerepet játszik az LTR transzaktiválásában. A HIV-1 Tat képes kapcsolódni a HIV-1 RT-vel és ez a kölcsönhatás interakció stimulálja az RT aktivitását (Apolloni et al., 2007). Eredményeink azt mutatták, hogy a Y44A mutáció jelenlétében a virális RT mennyisége szignifikánsan lecsökkent, és az RT nem volt detektálható a pszeudovirionokból Western blottal. Szintén Western Blot segítségével vizsgáltuk meg a Y44A Tat mutáció RT expresszióra kifejtett hatását transzfektált sejt lizátumból. Az RT nem volt detektálható a transzfekciót követő 3. napon. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a Tat jelentős szerepet játszik az RT stabilizálásában, és feltehetőleg a Y44A mutáció a HIV-2 RT degradációját okozhatja ubikvitin-függő vagy -független módon.

Habár a plazma vírus szint a két vírus infekció esetén eltér, a provirális DNS szint mind a két vírus esetén hasonló (Popper et al., 1999) (Popper et al., 2000). Célunk egy celluláris HIV-2 DNS kvantifikációs módszer optimalizása volt. A HIV-2 DNS qPCR specificitása közel 100%-nak adódott, és mely lehetővé teszi a HIV-2 infekció detektálását/monitorozását abban az esetben is, amikor a plazma vírus szint nem detektálható.

Habár a HIV-2 általában hosszú aszimptomatikus fázissal jellemezhető, a HIV-2 betegek egy alacsony százalékánál a fertőzés a HIV-1-hez hasonlóan gyorsan játszódik le (Van der Loeff et al., 2010). Annak detektálására, hogy a milyen összefüggés figyelhető meg a HIV-2 vírus evolúciója és a betegség progressziója között, a tanulmányban részt vevő betegeket lassú és gyors progressziós csoportokra osztottuk a longitudinális CD4⁺ T-sejt adatok alapján. Ennek alapján a CD4% szint és ennek CD4%szint csökkenésének a kombinációjával asszociálódik a HIV-2 evolúciós rátával, és a vírus evolúciója sokkal gyorsabb a gyors progressziót mutató betegek esetén. Azt is megállapítottuk, hogy a lassú progresszorok esetén az Env C2 régiójában több aminosavrésszel pozitívan szelektálódott és ezen aminosavrések a burok fehérje felszínén expozálódnak.

Eredményeink lehetőséget nyújtanak a HIV dupla fertőzés megértésére; a HIV-2 evolúciós ráta és a betegség progresszió kapcsolatára és a Tat vírus replikációban betöltött szerepére.

ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálataink célja az volt, hogy jobban megértsük a HIV-2 vírus replikációjának dinamikáját, a vírus fertőzőképességét és a dupla fertőzésben betöltött szerepét.

A HIV-1 és HIV-2 dupla fertőzés modellezésére és tanulmányozására sejtkultúrák modellrendszerét alkalmaztunk. A HIV-2 jelenlétében a HIV-1 infektivitása szignifikánsan lecsökkent. Miután kísérleteinket „funkció-vesztett” HIV-2 regulatorikus és / tartozék géneket hordozó plazmidokkal elvégeztük, megállapítottuk, hogy a virális protein X képes a HIV-1 transzdukció gátlására. Ez a gátló hatás megmutatkozott a 2-LTR junkciók számának csökkenésében, feltehetőleg a kapszid fehérje (p24) termelésben és a HIV-1 reverse transzkriptáz aktivitás csökkenésében egyaránt. A HEK293T sejtekhez hasonlóan, az aktivált és differenciált THP1 monocita sejteken is a Vpx HIV-1 „infektivitással” szembeni gátló hatását észleltük. Fontos kiemelni, hogy ezen gátlás csak abban az esetben volt tapasztalható, amikor a PMA-val történt aktiválás révén valószínűleg le tudtuk csökkenteni a sejten belül SAMHD1 szintet. A sejtkultúrák és *in vitro* kísérleteink alapján feltételezhető, hogy celluláris szinten a HIV-2 Vpx felelős a HIV-1 transzdukciós képességének gátlásáért.

Továbbá, eredményeink azt mutatják, hogy habár a HIV-2 Tat hasonló szerkezettel és funkcióval rendelkezik, mint a HIV-1 Tat; az N-terminális régió – mely a leginkább eltérő szerkezettel rendelkezik a két HIV vírus Tat fehérjéje esetén - jelentős szerepet tölt be a vírus replikációban, ellentétben a HIV-1 Tat proteinjének azonos doménjével. *In silico* és *in vitro* kísérleteink révén a Y44A mutáció hatását tanulmányoztuk. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az Y44A mutáció negatív hatással van a fertőzőképességre, a HIV-2 RT expressziójára és stabilitására. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az N-terminális, Prolin-gazdag domén szerepet játszik a HIV-2 RT regulációjában és aktivitásában, ellentétben a HIV-1 Tat Pro-gazdag doménjével.



Registry number: DEENK/263/2020.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Zsófia Szojka

Doctoral School: Doctoral School of Molecular Cellular and Immune Biology

MTMT ID: 10056719

List of publications related to the dissertation

1. **Szojka, Z.**, Mótyán, J. A., Miczi, M., Mahdi, M., Tőzsér, J.: Y44A Mutation in the Acidic Domain of HIV-2 Tat Impairs Viral Reverse Transcription and LTR-Transactivation.
Int. J. Mol. Sci. 21 (16), 1-17, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21165907>
IF: 4.556 (2019)
2. Palm, A. A., Lemey, P., Jansson, M., Månsson, F., Kvist, A., **Szojka, Z.**, Biague, A., da Silva, Z., Rowland-Jones, S. L., Norrgren, H., Esbjörnsson, J., Medstrand, P., SWEGUB CORE Group: Low Postseroconversion CD4+ T-cell Level Is Associated with Faster Disease Progression and Higher Viral Evolutionary Rate in HIV-2 Infection.
mBio. 10 (1), e01245-18, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01245-18>
IF: 6.784
3. **Szojka, Z.**, Karlson, S., Jansson, M., Medstrand, P.: Quantification of HIV-2 DNA in Whole Blood.
BIO-PROTOCOL. 9 (20), 1-20, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.21769/BioProtoc.3404>
4. Mahdi, M., **Szojka, Z.**, Mótyán, J. A., Tőzsér, J.: Inhibitory effects of HIV-2 Vpx on replication of HIV-1.
J. Virol. 92 (14), 1-46, 2018.
IF: 4.324





List of other publications

5. Karlsson, I., Tingstedt, J. L., Şahin, G. Ö., Hansen, M., **Szojka, Z.**, Buggert, M., Biague, A., da Silva, Z., Månsson, F., Esbjörnsson, J., Norrgren, H., Medstrand, P., Fomsgaard, A., Jansson, M., Sweden-Guinea-Bissau Cohort Research Group: Cross-Reactive Antibodies With the Capacity to Mediate HIV-1 Envelope Glycoprotein-Targeted Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Identified in HIV-2-Infected Individuals.
J. Infect. Dis. 219 (11), 1749-1754, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiz001>
IF: 5.022
6. Mahdi, M., **Szojka, Z.**, Mótyán, J. A., Tózsér, J.: Inhibition Profiling of Retroviral Protease Inhibitors Using an HIV-2 Modular System.
Viruses. 7 (12), 6152-6162, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/v7122931>
IF: 3.042

Total IF of journals (all publications): 23,728

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 15,664

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

10 September, 2020



KONFERENCIA POSZTEREK

2020: V. Varga, Zs. Szojka, T. R. Linkner, M. Mahdi and J. Tőzsér. The role of HIV-2 Vpx in dual HIV infection and analysis of its function in the viral life cycle, 13th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, Hungary

2020: Zs. Szojka, T. R. Linkner, V. Varga, M. Mahdi and J. Tőzsér. Elucidating the role of HIV-2 viral protein X. Viruses conference. Barcelona, Spain

2019: M. Mahdi, Zs. Szojka, J. A. Mótyán and J. Tőzsér. HIV-2 Vpx mediates inhibition of HIV-1 through interaction with the reverse transcriptase. GINOP, Debrecen, Hungary

2015: M. Mahdi, Zs. Szojka, and J. Tőzsér. Evaluating the efficacy of protease inhibitors against HIV-2, and the effect of the I54M-L90M double mutation. 27th International Workshop on Retroviral Pathogenesis. Mülheim an der Ruhr, Germany.

2015: M. Mahdi, Zs. Szojka, and J. Tőzsér. Inhibition profiling of currently used protease inhibitors using an HIV-2 modular system, and the effect of the I54M-L90M double mutation. 40th annual meeting on Retroviruses. Cold Spring Harbor, NY, USA.

2014: M. Mahdi, Zs. Szojka, K. Matuz, F. Tóth and J. Tőzsér. A modular system to study the effect of protease inhibitors on the action of Human Immunodeficiency Virus type 2 (HIV-2). Hungarian Molecular Life Sciences. Debrecen, Hungary.

2013: M. Mahdi, Zs. Szojka, K. Matuz and J. Tőzsér. HIV-2 protease as a chemotherapeutic target. Hungarian Molecular Life Sciences. Siófok, Hungary

2013. Zs. Szojka, M. Mahdi, J. Tőzsér. Biochemical and Kinetic characterization of HIV-2 Protease. 6th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Galyatető, Hungary

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Prof. Dr. Tőzsér Józsefnek, a PhD tanulmányaim alatti támogatást és szakmai tanácsokat. Köszönettel tartozom a Bsc/Msc témavezetőmnek és a PhD tanulmányaim alatti mentoromnak, Dr. Mohamed Mahdinak a folyamatos támogatásért, a motivációért, a végeláthatatlan türelméért és rengeteg tanácsért. Köszönöm svéd mentoraimnak, Prof. Dr. Marianne Janssonnak és Prof. Dr. Patrik Medstrandnak a lehetőséget, hogy csatlakozhattam a munkacsoportjukhoz és a rengeteg új módszer elsajátításáért.

Köszönöm a retrovirális biokémia laboratórium minden munkatársának, barátaimnak a sok tanácsot, segítséget és hogy végig támogattak.

Legnagyobb hálával szüleimnek és családomnak tartozom, akik végig támogattak és segítettek utamon.

A disszertációhoz kapcsolódó kutatások és a disszertáció az OTKA-NFKI-6 (125238), a GINOP-2.3.2-15-2016-00044 “PHARMPROT teaming” projekt, GINOP-2.3.3-15-2016-00020 és az Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (NKFIH-1150-6/2019) Biotechnológia fókuszterület és az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009. támogatásával készültek.