

HUMÁN HERPESZVÍRUS-8 SZEROLÓGIAI VIZSGÁLATA

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Dr. Juhász Attila

Témavezető: Prof. Dr. Gergely Lajos

Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Mikrobiológiai Intézet
2001

TARTALOMJEGYZÉK	1
RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK.....	2
BEVEZETÉS	3
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
<i>A HHV-8 taxonómiája, morfológiája, genomi szerveződése</i>	<i>4</i>
<i>A HHV-8 szerepe a Kaposi szarkómában.....</i>	<i>6</i>
<i>Orf73/LNA-1.....</i>	<i>7</i>
<i>Orf72/v-ciklin</i>	<i>8</i>
<i>Orf71/v-FLIP.....</i>	<i>8</i>
<i>OrfK12/kaposin</i>	<i>9</i>
<i>A HHV-8 és az angiogenezis</i>	<i>9</i>
<i>Orf74/v-IL-8R.....</i>	<i>10</i>
<i>v-MIP-ek.....</i>	<i>10</i>
<i>Endothelsejtek transzformációja HHV-8-cal.....</i>	<i>11</i>
<i>A HHV-8 és egyéb kórképek</i>	<i>12</i>
<i>A HHV-8 epidemiológiája.....</i>	<i>13</i>
<i>Módszertani megközelítések</i>	<i>13</i>
<i>LANA</i>	<i>14</i>
<i>sVCA.....</i>	<i>15</i>
<i>gp35-37.....</i>	<i>15</i>
<i>Transzmissziós utak.....</i>	<i>16</i>
CÉLKITŰZÉSEK	18
ANYAGOK és MÓDSZEREK.....	19
<i>Vizsgálatok alanyai.....</i>	<i>19</i>
<i>Sejtkultúrák</i>	<i>19</i>
<i>DNS, RNS preparálás</i>	<i>19</i>
<i>DNS amplifikációs reakciók.....</i>	<i>20</i>
<i>DNS szekvenálás</i>	<i>20</i>
<i>SSCP analízis.....</i>	<i>21</i>
<i>Indirekt immunfluoreszcencia.....</i>	<i>21</i>
<i>Rekombináns antigének</i>	<i>22</i>
<i>Szintetikus orf65 antigén.....</i>	<i>22</i>
<i>Orf65 Peptid ELISA</i>	<i>23</i>
<i>Rekombináns antigén ELISA.....</i>	<i>23</i>
<i>Western-blot.....</i>	<i>25</i>
<i>Statisztikai módszerek</i>	<i>26</i>
EREDMÉNYEK és MEGBESZÉLÉS.....	27
<i>HHV-8 jelenléte klasszikus Kaposi szarkómában</i>	<i>27</i>
<i>Szerológiai eredmények.....</i>	<i>30</i>
ÖSSZEFOGLALÁS	36
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	37
IRODALOMJEGYZÉK	38
KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	49

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

AIDS	acquired immunodeficiency syndrome / szerzett immunhiányos szindróma
bFGF	bázikus fibroblaszt növekedési faktor
BSA	marha szérum albumin
C	citozin
cdk	ciklin dependens kináz
DED	death effector domain
DMSO	dimetil-szulfoxid
EBV	Epstein-Bar vírus
ECGF	endothelial cell growth factor / endothelsejt növekedési faktor
EDTA	ethylenediaminetetraacetate
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FITC	fluorescein isothiocyanate
FLICE	Fas associated death domain like IL1- β converting enzyme / caspase-8
FLIP	FLICE inhibitory protein
G	guanin
gp	glykoprotein
HCMV	humán cytomegalovírus
HHV-8	humán herpeszvírus-8
HIV	humán immundeficiencia vírus
HPV	humán papillomavírus
IFA	immunofluorescent assay
Il-1 β	interleukin-1 β
Il-6	interleukin-6
IPTG	isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
KS	Kaposi szarkóma
KSHV	Kaposi szarkóma herpeszvírus / Kaposi's sarcoma associated herpesvirus
LANA	latency associated nuclear antigens / látens nukleáris antigének
LNA	látens nukleáris antigén
LNA-1	látens nukleáris antigén-1
LUR	long unique region / egyedi hosszú régió
MIP-1 α	makrofág inflamatorikus protein1 α
OD	optikai denzitás
orf	open reading frame
PAGE	polikrilamid-gél elektroforézis
PBS	phosphate buffered saline / foszfát-pufferes sóoldat
PCR	polymerase chain reaction / polimeráz láncreakció
PEG	polyethylene glycol
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
Rb	retinoblasztóma fehérje
RPM	fordulatszám percenként/ rotation per minute
SDS	sodium dodecil sulphate
SSCP	single strand conformational polymorphysm / egyszálú DNS konformációs polimorfizmus
sVCA	small virus capsid antigen / kis víruskapszid antigén
TBE	TRIS-bórsav-EDTA puffer
TNF- α	tumor nekrozis faktor- α
TR	termnális repetíció
TRIS	trys-hydroxymethyl aminomethane
VEGF	vaszkuláris endotheliális növekedési faktor
VEGFR-2	VEGF receptor-2
v-	virális-
v-FLIP	virális-FLIP
v-IL-8R	virális interleukin-8 receptor
v-IRF	virális interferon regulatórikus faktor
v-MIP	virális-makrofág inflammatórikus protein
WB	Western blot

BEVEZETÉS

A nyolcadik humán herpeszvírus létezésére utaló első 1994-es publikáció óta ugrásszerűen megnőtt a ténylegesen is létező vírus epidemiológiájával és kóroktani szerepével foglalkozó közlemények száma. A felgyülemlett ismeretanyag alapján mára evidencia, hogy a humán herpeszvírus-8 (HHV-8) a Kaposi szarkóma kialakulásában nélkülözhetetlen, de nem elégséges etiológiai faktor.

A vírus egyébként felfedezését is a Kaposi szarkómának köszönheti. Pontosabban ezen betegség 1980-as 90-es években jelentkező járványszerű megjelenésének a homoszexuális közösségekben az AIDS jellegzetes betegségeként. Azóta bebizonyosodott, hogy a vírus a Kaposi szarkóma valamennyi megjelenési formájában kimutatható és az, hogy ténylegesen egy onkogén hatású vírusról van szó.

Munkámban elsősorban szerológiai módszerekkel arra kerestem választ, hogy a HHV-8 milyen arányban van jelen az egészséges magyar lakosságban, illetve hogyan jellemezhető szerológiai szempontból a vírussal összefüggésbe hozott megbetegedések. Továbbá mit tudhatunk meg a vírushatás természetéről szerológiai eredményeinek áttekintésével.

A hazai átfertőzöttségről nyert eredményeink, még annak ismeretében sem csupán elméleti jelentőségűek, hogy jelen tudásunk szerint a HHV-8-at csak opportunistá pathogénként tartjuk számon.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A HHV-8 taxonómiája, morfológiája, genomi szerveződése

Tekintettel arra, hogy a vírus felfedezése a Kaposi szarkómához kötődik a leírók által adott Kaposi szarkómához-asszociált herpeszvírus (KSHV, Kaposi's sarcoma associated herpesvirus) elnevezés is széles körben ismert és használt (Chang és mtsai., 1994). A Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság ajánlása alapján a hivatalos megnevezés a humán herpeszvírus-8 (HHV-8) és rendszertanilag a γ -herpeszvírusok alcsaládjának rhadinovírus genusába soroljuk.

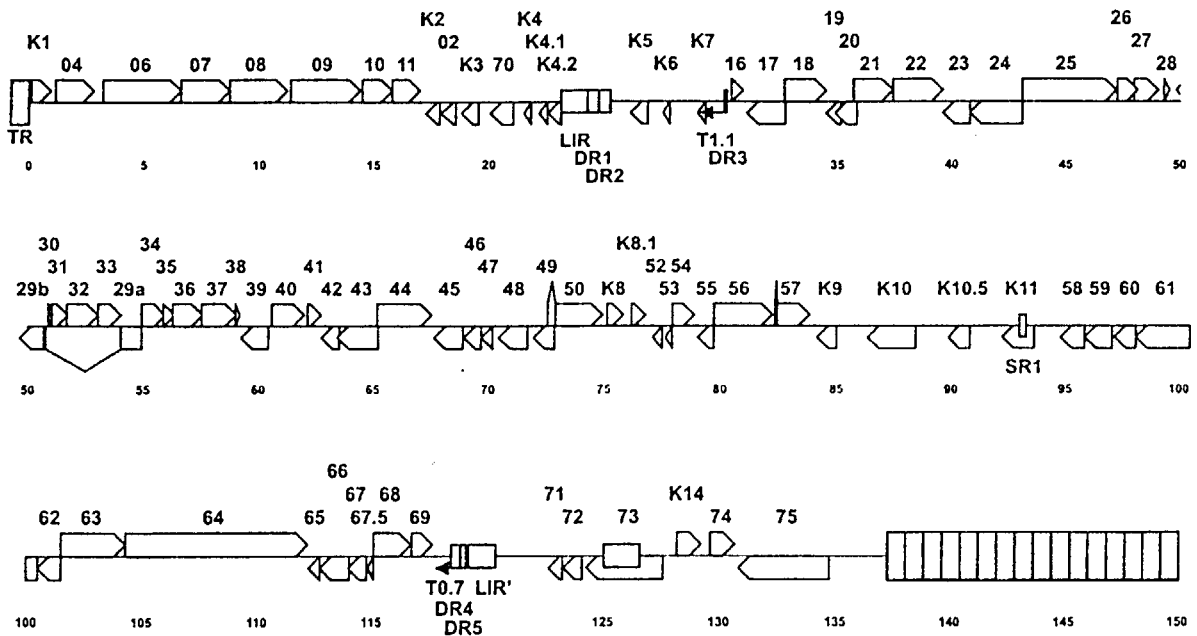
A vírus felépítése a herpeszvíruscsalád jellegzetességeit mutatja. A virion legbelső rétege a "core" dupla szálú lineáris DNS molekulát tartalmaz egyszeres kópiaszámban az ikozahedrális kapszidstruktúrába zárva, melyet az amorf tegumentum állomány vesz körül és legkívül a peplon borít (Renne és mtsai., 1996a). A virion átmérője a peplonnal együtt körülbelül 140nm. Ehhez hasonló herpeszvírusszerű partikulákat Kaposi szarkómából származó biopsziás mintákban már jóval a HHV-8 felfedezése előtti időben leírtak, melyeket akkor HCMV-nek gondoltak (Giraldo és mtsai., 1972, Walter és mtsai., 1984).

A vírusgenom architektúrájának jellegzetességei az alábbiak. A kettőszálú DNS genom egy 140 kilobázisnyi hosszúságú összefüggő egyedi szakasza (LUR, long unique region) tartalmazza az összes kódoló régiót (Russo és mtsai., 1996). A LUR mindkét végén szomszédos egy-egy változó hosszúságú terminális repetícióval (TR), melyben hozzávetőleg egy 800 bázispár hosszúságú nagy G:C tartalmú (84%) szakasz ismétlődik 25-40-szer mindkét végén (Lagunoff és Ganem, 1997). A teljes HHV-8 genom hossza így körülbelül 165 kilobázis (Renne és mtsai., 1996b). A LUR legnagyobb belső része genetikailag nagymértékben konzervált, mindössze 0,1%-os variabilitást írtak le (Russo és mtsai., 1996, Nicholas és mtsai., 1998). Azonban a LUR jobb és bal végén is, a TR-val szomszédos szakaszain, variábilis régiók helyezkednek el. A genom bal végén elhelyezkedő orfK1 variabilitása fehérjeszinten 14-35%. Ezen régió phylogenetikai elemzése alapján mára 5 fő típust (A,B,C,D,E) különböztetnek meg (Zong és mtsai., 1999, Biggar és mtsai., 2000). A genom jobb végén levő orfK15 szekvenciakülönbsége alapján a bal végén található variabilitástól függetlenül két variánsról (P, M) beszélhetünk (Poole, 1999).

A LUR feltehetően 80-nál is több különféle polipeptidet kódol, melyek közül számos a herpeszvírusokra jellegzetes replikációs enzimek, szabályozó- és struktúrfehérjék homológja.

A legközelebbi humán homológ lymphocryptovírus genusba tartozó EBV-vel közös régiók homológiája 50-60%-os DNS szinten. A LUR további jellegzetessége, hogy celluláris génekkel homológ kódoló szakaszokat is tartalmaz srtuktúrálisan blokkoba tömörülve a vírusgenom repetitív elemeket tartalmazó szakaszai közelében. A celluláris homológokal rendelkező virális gének azonban nem tartalmaznak intronokat (Russo és mtsai., 1996).

1. Ábra: A HHV-8 genom sematikus képe. (a nyilak az egyes orf-eket jelölik 04-75 számozással, valamint K előtagot kaptak a HHV-8 ra egyedi orf-ek, a négyzetek a repetitív elemeket jelölik, TR: terminális repetíció, DR1-5: belső direkt repetíciók, LIR: hosszú invert repetíciók, T0.7 és T1.1: 0.7 és 1.1Kb transzkriptek), Niepel és mtsai., 1998 alapján.



A HHV-8 szerepe a Kaposi szarkómában

A Kaposi szarkóma maga egy vasculáris eredetű tumor, melynek sokáig valódi tumor volta is vitatott volt. Klinikailag a Kaposi szarkóma léziók legtöbbször multiplex formában jelentkeznek a bőrön vagy nyálkahártyákon folt, plakk és tumor stádiumot különböztetve meg. A léziók egymástól függetlenül progrediálhatnak, illetve mutathatnak regressziót. A klinikum az egyes epidemiológiai formák között - klasszikus, iatrogén-, afrikai endémiás és AIDS-hez társult Kaposi szarkóma- mutat lényeges klinikai eltéréseket, de az egyes epidemiológiai formákon belül jellegzetességeket is. A betegség szövettanilag is összetett, de a különböző formákat tekintve azonban egységes. Szövettanilag a lézió, a stádiumtól függően különböző arányban, megnyúlt endothelsejtekkel határolt atipikus neoangiogenezissel, mononukleáris infiltrátummal, extravazális vörösvértestekkel, haemosiderin lerakódással és orsó alakú sejtek proliferációjával jellemezhető (Zalla, 1996). A lézióban a legvalószínűbben endothelialis eredetű (Jones és mtsai., 1986, Zhang és mtsai 1993) orsósejteket tartják az elváltozás neoplasztikus komponensének.

A Kaposi szarkóma valamennyi stádiumában és epidemiológiai formájában igen magas arányban (100-95%) lehet a HHV-8 jelenlétét PCR-ral igazolni (Chang és mtsai., 1994, Huang és mtsai., 1995, Rady és mtsai., 1995) míg egyéb vasculáris tumorokból hiányzik (Lebbé és mtsai., 1997). A Kaposi szarkóma (KS) léziókban a HHV-8 DNS és RNS lokalizációjának vizsgálatát in situ technikákkal végezték el. A vírusra specifikus nukleinsavakat detektáltak a tumorra jellemző orsósejtekben, az atipikus endothelialis sejtekben valamint a tumorban szintén előforduló mononukleáris sejt infiltrátumban is (Boshoff és mtsai., 1995, Li és mtsai., 1996, Sturzl és mtsai., 1999a). A tumor stádiumú léziókban dominánsan jelenlévő orsósejtek a HHV-8 genomot cirkuláris episzómális formában hordozzák a sejtmagban (Decker és mtsai., 1996). A Kaposi szarkóma lézióban jelenlévő monocyta eredetű sejtekben és az orsósejtek 2-5%-ában lítikus ciklus fordul elő (Blasig és mtsai., 1997). A Kaposi tumorban azonosított látens transzkriptek közül a látens nukleáris antigén-1-et (LNA-1) kódoló orf73 (Sturzl és mtsai., 1999a), a virális ciklint kódoló orf72 (Davis és mtsai., 1997, Reed és mtsai., 1998), a virális FLIP-et kódoló orf71 (Sturzl és mtsai., 1999b) és a kaposint kódoló orfK12 (Sturzl és mtsai., 1997) jellemző RNS szakaszait mutatták ki eddig. A következőkben a teljesség igénye nélkül ezen látens géntermékek és az angiogenezis gondolatkör mentén kiválasztott néhány lítikus gén lehetséges szerepét tekintem át a Kaposi szarkóma kialakulásában.

Orf73/LNA-1

A HHV-8-at látens hordozó sejtekben az orf73 által kódolt látens nukleáris antigén-1 (LNA-1) expresziója egy tricisztronális RNS molekuláról történik (Kedes és mtsai., 1997, Dittmer és mtsai., 1998). Maga az RNS-transzkript sorrendben a LNA-1, v-ciklin, v-FLIP kódoló szakaszokat tartalmazza.

A LNA-1 222-234 kDa molekulásúlyú fehérje, mely aminosavösszetétele alapján három fő részre tagolható. Immunfluoreszcens és immunhisztokémiai vizsgálatok szerint a LNA-1 speciális nukleáris testekbe koncentrálódik és jellegzetesen pöttyös mintázatot mutat a sejtmagon belül (Kedes és mtsai., 1996, Gao és mtsai., 1996b, Dupin és mtsai., 1999). A vírusgenom elhelyezkedése a látens fertőzött sejtek magjában a LNA-1 által is elfoglalt nukleári testekre korlátozódik (co-localisatio) (Ballestas és mtsai., 1999). Ennek alapján vált világossá, hogy a LNA-1 egyik doménje a vírusgenomot köti, mégpedig a vírusgenom terminális repetíciójának területén (Ballestas és Kaye, 2001). Míg a fehérje egy másik doménje a hiszton H1-hez képes kapcsolódni (Cotter és mtsai., 1999). A sejtsztódáskor a LNA-1 biztosítja a vírusgenom epizómális fennmaradását a leánysejtekben (Ballestas és mtsai., 1999). Minden valószínűség szerint a LNA-1-nek egyéb szerepe is van a látens vírusreplikáció iniciálásában és folyamatában.

Ahogy a DNS tumorvírusoknál, úgy a HHV-8-nál is megtalálható a tumorszupresszor fehérjék inaktiválásának mechanizmusa. A HHV-8 esetében a p53 potens transzkripció aktivitását éppen a LNA-1 képes gátolni. A LNA-1 p53 interakció eredményeképpen a p53 indukálta apoptózis is gátlódik experimentális rendszerekben (Friborg és mtsai., 1999).

Továbbá a LNA-1 a retinoblasztóma proteinnel (Rb) is interakcióba lép és neutralizálja annak tumorszupresszor hatását. Az interakciónak valószínűleg az Rb-E2F komplexre is hatása van, hiszen a LNA-1 transzaktiválja a sejtciklus progressziójában fontos szereppel bíró E2F transzkripció faktor kötőhelyet tartalmazó promótereket (Radkov és mtsai., 2000).

A LNA-1 valószínűleg egy a fertőzött sejt és a vírus ciklusát alapvetően meghatározó transzkripció regulátor (Schwam és mtsai., 2000, Renne és mtsai., 2001), melyre további nukleáris fehérjékkel és transzkripció faktorokkal való interakciója is utal (Platt és mtsai., 1999, Lim és mtsai., 2000, Krithivas és mtsai., 2000).

Ahogy az említett példákban kitűnik a LNA-1-nek alapvető szerepe van a vírus látens perzisztenciájának fenntartásában, a sejtciklus transzkripcionális szintű szabályozásában és ezzel összefüggésben az onkogenezisben is.

Orf72/v-ciklin

A LNA-1-el azonos promóterről átíródó virális ciklin a D típusú celluláris ciklinekkel mutat homológiát (Russo és mtsai., 1996, Dittmer és mtsai., 1998). A hasonlatosság funkcionális értelemben is fennáll. A normálisan celluláris D-ciklinek által aktivált ciklin dependens kinázokat (cdk6/cdk4) a v-ciklin is képes aktiválni (Li és mtsai., 1997). Azonban a v-ciklin/cdk6 komplex rezisztens a cdk inhibitor proteinek gátló hatására (Swanton és mtsai., 1997). A v-ciklin/cdk6 komplex képes az Rb fehérje inaktiválására annak foszforilálásával (Godden-Kent és mtsai., 1997). A foszforilált Rb fehérje már nem képes az E2F transzkripció faktorok kötésére, amelyek az S-fázisba történő átmenethez szükséges gének transzaktiválásáért felelősek. Experimentális rendszerben a v-ciklin képes az Rb fehérje sejtproliferációt gátló hatását felfüggeszteni (Chang és mtsai., 1996). Minden bizonnyal a v-ciklin a normális sejtciklus szabályozásának megzavarásával hozzájárulhat a G₁-S fázisátmenet felgyorsításához, valamint fokozott sejtproliferációhoz és a Kaposi tumor kialakulásához.

Orf71/v-FLIP

Az orf71 által kódolt virális FLIP (FLICE/caspase-8 inhibitor protein) a celluláris FLIP-hez hasonlóan két DED domént tartalmaz (Irmler és mtsai., 1997, Russo és mtsai., 1996). A HHV-8 v-FLIP képes a CD95/Fas receptor útvonalon bekövetkező apoptotikus szignál gátlására. A HHV-8 v-FLIP gátló hatása mind a szolúbilis, mind a membránhoz kötött Fas ligand által bekövetkező sejthalálra is kiterjed. Továbbá a v-FLIP transzdukált sejtvonalak tumorigenitása fokozott a v-FLIP negatív kontrolléhoz képest immunkompetens egérmodellben. Az experimentális tumormodellben a v-FLIP expresszió csökkentette az intratumorális apoptotikus sejtek arányát. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a v-FLIP a Kaposi szarkóma esetében a tumorsejtek védelmét szolgálhatja a sejtes immunitás effektor sejteivel szemben és végső soron a daganatnövekedés progressiójához járulhat hozzá (Djerbi és mtsai., 1999). Mindazonáltal tisztázásra vár, hogy más sejthalál receptorokon

meginduló szignál gátlására is képes-e a HHV-8 v-FLIP más virális és a celluláris FLIP-ekhez hasonlóan (Thome és mtsai., 1997, Wang és mtsai., 1997, Hu és mtsai., 1997, Bertin és mtsai., 1997).

OrfK12/kaposin

Az orfK12-ről átíródó RNS nagy mennyiségben van jelen a KS orsósejtjeiben (Sturzl és mtsai., 1997). Az általa kódolt feltételezhetően mindössze 60 aminosavnyi hidrofób fehérje a kaposin (Russo és mtsai., 1996). A kaposin gén önmagában elegendő patkány fibroblaszok tumorigenikus transzformációjához. A kaposint expresszáló sejtek alacsonyán differenciált, vaszkuláris típusú tumort hoznak létre tímuszmentes egér subcután injektálásával. A kísérletes körülmények között bizonyított kaposin-t jellemző onkogén potenciál, minden bizonnyal szerepet játszik a Kaposi szarkóma kialakulásában és fenntartásában is (Muralidhar és mtsai., 1998).

A HHV-8 és az angiogenezis

Növekedési faktorok, citokinek konstitutív expressziója vagy azok receptorainak fokozott megjelenése eredményezhet olyan autokrin, parakrin növekedési hurkot, mely a sejtosztódás számára nélkülözhetetlen stimulust vagy végeredményben akár fokozott proliferációs rátát jelent. A Kaposi szarkóma kialakulásában a vírus felfedezése előtti időben lényeges szerepet tulajdonítottak különböző növekedési faktoroknak és inflammatórikus citokineknek. Számos kísérletes adat szól ebből az időből különböző faktorok és citokinek pozitív autokrin és parakrin hatásáról a lézió kialakulásában. Az IL-1 β , a TNF- α (Corbeil és mtsai., 1991), a bFGF, az ECGF (Ensoli és mtsai., 1989), az IL-6 (Miles és mtsai., 1990), az oncostatin-M (Nair és mtsai., 1992), és a HIV-1 Tat mindegyikéről (Gallo, 1998) bebizonyosodott, hogy képesek Kaposi szarkóma eredetű sejt kultúrák proliferációját fokozni. Ugyanezen molekuláknak szintén ismert az endothelsejtek aktivációjában és az angiogenezisben betöltött szerepe is. Érdekes módon a HHV-8 felfedezése óta a vírus és az említett faktorok közötti kapcsolat eddig nem nyert megerősítést, bár azok lehetősége és jelentősége továbbra is fennáll.

A herpeszvírusokra jellemző produktív vírustermeléssel járó ciklus leggyakrabban a sejt lízisével jár (lítikus ciklus elnevezés). A KS lézióban a sejtek kb 5%-ában detektálhatók

lítikus transzkriptek (Sturzl és mtsai., 1998, Blasig és mtsai., 1997). Ezek a sejtek a mai tudásunk szerint pusztulásra vannak ítélve, így nem szerepelnek a lézió proliferáló sejthányadában. A lítikus ciklusban aktív gének azonban meglepő módon, de mégis hozzájárulhatnak a Kaposi szarkóma lézió kialakulásához. Pontosabban azok a lítikus géntermékek, amelyek valamilyen módon parakrin hatással bírnak a környezetükben levő többi sejtre. Az alábbiakban ismertetem azokat a lítikus géntermékeket, melyek minden bizonnyal ezen a módon szerepet játszanak a KS kialakulásában.

Orf74/v-IL-8R

A HHV-8 orf74 szekvenciája alapján a celluláris IL-8 receptor (IL-8R) homológia és expressziója kimutatható a KS lézióban is (Cesarman és mtsai., 1996b, Guo és mtsai., 1997). Az eddig ismert celluláris és virális kemokin receptoroktól eltérően a v-IL8R agonistától függetlenül konstitutív módon aktív. Ennek eredményeként a v-IL8R kemokin stimuláció nélküli jelátviteli folyamatot tart fenn, melynek eredménye fokozott sejtproliferáció (Arvanitakis és mtsai., 1997). A v-IL-8 receptort stabilan kifejező sejtvonalak tumorigenikusak nude egérben, jellegzetesen vasculáris tumor fenotípussal (Bais és mtsai., 1998). A v-IL-8R transzgén egérben a Kaposi szarkómához nagymértékben hasonló vasculáris szarkóma fejlődik ki (Yang és mtsai., 2000). Ezek a hatások fenotípusosan ugyan nagymértékben a KS-ra emlékeztetnek, mégsem valószínű, hogy a v-IL-8R közvetlenül játszana szerepet a tumorsejtek proliferációjában, hiszen az azt expresszáló sejtek a lítikus dogma szerint halálra vannak ítélve, hacsak nem valamiféle abortív vagy sejtlízissel nem járó vírusszaporodást tételezünk fel. Sokkal inkább az említett parakrin hatás jelentősége érhető tetten, hiszen a virális kemokin receptor homológot kifejező sejtek emelkedett VEGF szekréciót mutatnak (Bais és mtsai., 1998).

v-MIP-ek

A HHV-8 genom három szakasza is (orfK6, orfK4, orfK4.1) a celluláris makrofág inflammatórikus protein (MIP) 1 α -val homológ virális fehérjéket (v-MIP-I-II-III) kódol. A v-MIP-I mRNS a KS sejtek kis százalékában detektálható (Sturzl és mtsai., 1998). A v-MIP-I és -II embrionált tojás chorioallantoismembránján erőteljes érújdonképződést indukál (Boshoff és mtsai., 1997). Újabb adatok szerint a v-MIP-III is rendelkezik neoangiogenetikus és T-helper-

2 (Th-2) kemoattraktáns hatással (Stine és mtsai., 2000). A v-MIP-II szelektív Th-2 kemoattraktáns hatásról is beszámoltak (Sozzani és mtsai., 1998). Valószínűleg a tumorra jellemző mononukleáris infiltráció is a v-MIP-ek leukocyta migrációt befolyásoló hatására vezethető vissza. Elképzelhető, hogy a Th-2 sejtekre gyakorolt hatás a vírussal fertőzött tumorsejtek esetében az antivirális immunválaszt elkerülő stratégiának is része. Nagy valószínűséggel a v-MIP-ek parakrin hatása hozzájárul a Kaposi-lézióra szövettanilag jellegzetes érújdonszövetképződéshez.

Endothelsejtek transzformációja HHV-8-cal

Az izolált génstúdiumok által szolgáltatott eredmények, ugyan nagymértékben hozzájárulnak a betegség pathomechanizmusának részletes megismeréséhez, azonban egy infekciós etiológiájú betegségben nélkülözhetetlen a teljes infektiiv ágenssel létrehozott fertőzés és a hozzá tartozó kórkép egyértelmű kapcsolatának igazolása. Tekintettel arra, hogy a KS neoplasztikus komponensének tartott orsósejt legvalószínűbben endotheliális eredtű az endothelkultúrák fertőzése HHV-8-cal triviális megközelítésnek adódik.

Humán köldökvénából származó endothelkultúrák HHV-8 fertőzést követően nem mutatják a nem fertőzött kultúrákra jellemző szenescenciát, hanem immortalizálódnak. A fertőzött kultúra sejtei az aktivált endothel sejtfelszíni markereit mutatják, az orsósejtekhez hasonló morfológiát vesznek, transzformálódnak. A sejteknek fokozott a telomeráz aktivitása és lágy agarban kolóniaképző képességük. A fertőzés után bekövetkező transzformáció folyamata részleteiben még nem ismert, de a VEGFR-2 szintjének csökkenése a nem fertőzött kultúrákkal összehasonlítva elmarad. A transzformált umbilikális endothelkultúra érdekessége, hogy a kultúrában a sejtek 100%-a mutatja a megváltozott morfológiai jegyeket, míg kimutathatóan csak a sejtek néhány százaléka tartalmazza a vírus genomját és vírusantigéneket. Ez a jelenség ismét felveti a parakrin mechanizmusok fontosságát (Flore és mtsai., 1999).

Amennyiben HPV16 E6-E7 géekkel transzdukált humán dermális microvasculáris endotheliális sejt-kultúrát fertőznek HHV-8-cal, az *in vitro* megfigyelt transzformáció szintén lezajlik, azzal a különbséggel, hogy a sejtek morfológiájának orsósejtszerű megváltozása a sejteknek csak a HHV-8 vírusgenomot tartalmazó és látens vírusantigéneket expresszáló sejteire korlátozódik. A HHV-8-cal nem fertőződött sejtek megtartják utcakövezetszerű morfológiájukat. A dermális microvasculáris endothelkultúrában azonban a KS tumorhoz

hasonlóan a sejtek alacsony százalékában spontán produktív ciklus figyelhető meg, melynek eredménye a HHV-8 fertőzés fokozatos kiterjedése a kultúra minden sejtjére (Moses és mtsai., 1999). A fentebb ismertetett kísérletes eredmények alapvető bizonyítékul szolgálnak a HHV-8 transzformáló képességéről, valamint a HHV-8-cal transzformált endothelkultúrák modellként szolgálhatnak a vírus onkogenitásának experimentális bizonyítására állatmodellben.

A HHV-8 és egyéb kórképek

A HHV-8 genomját és különböző antigénjeit a nagyon ritka testüregi lymphomában (body cavity based lymphoma/ primary effusion lymphoma) és a multicentrikus Castleman-syndroma plasmasejtes típusában is ki lehet mutatni (Cesarman és mtsai., 1995, 1996a, Soulier és mtsai., 1995). Ezen betegségek kialakulásában is egyértelmű szerepet tulajdonítunk a HHV-8-nak, amely néhány részletében megegyezik a Kaposi szarkómánál leírtakkal, de ugyanakkor alapvető különbségek vannak (pl. v-IL-6 Parravicini és mtsai., 1997b, 2000, Staskus és mtsai., 1999, v-IRF Gao és mtsai., 1997, LANA-2 Rivas és mtsai., 2001). A HHV-8 kutatás a testüregi lymphomának azonban óriásit köszönhet, hiszen a testüregi lymphomából származó, in vitro kultúrában könnyen fenntartható, sejtvonalak látens episzómális formában hordozzák a HHV-8-at.

A HHV-8 epidemiológiája

Módszertani megközelítések

A vírus epidemiológiájának megközelítésében alapvetően két nagy módszertani csoportra oszthatók a kutatások. Az egyik a vírus DNS detektálása szövetmintákban polimeráz láncrekcióval vagy a vírusantigénekre specifikus ellenanyagok kimutatása szerológia teszttel. A vírus izolálására biológiai mintából ugyan elvben és gyakorlatban is van lehetőség, ez a módszer azonban nem alkalmas az epidemiológiai kutatásokhoz többek között nehézsége miatt sem (Foreman és mtsai., 1997, Vieira és mtsai., 1997).

A PCR alapú epidemiológiai vizsgálatok eredményei a vírus epidemiológiájának megismerésében alapvető, bár igen gyakran megtévesztő információkat is szolgáltatottak. Helyes interpretálásukhoz, sokszor csak utólag, a vírus szerológiai vizsgálatával kapott eredmények megszületése után kerülhetett sor. A PCR alapú vizsgálatok targetje volt már a különböző testnedveket illetően ondó, nyál, köpet és orrváladék is, a szöveteket illetően PBMC, nyirokcsomó, prosztatata, és cervikális hám is (Monini és mtsai., 1996, Marcioli és mtsai., 1996, Smith és mtsai., 1997, LaDuca és mtsai., 1998, Blackbourn és mtsai., 1998, Lampinen és mtsai., 2000., stb.). Az intenzív kutatások ellenére még a mai napig sem ismert teljes bizonyossággal az egészséges vírushordozókban a vírus perzisztenciájának pontos helye.

A HHV-8 epidemiológiájának megismerésében a vírusellenes ellenanyagok kimutatása hozta meg koherens eredményeivel a valós epidemiológiai helyzetet leginkább tükröző képet. A szerológiai megközelítés megkívánta a HHV-8 antigénjeinek karakterizálását és egyre érzékenyebb és specifikusabb mérőmódszerek kidolgozását. A pontos szerológiai státusz, különösen az egyén szintjén megkívánja a több antigénnel és/vagy módszerrel történő vizsgálatok elvégzését (Rabkin és mtsai., 1998, Zhu és mtsai., 1999a). Az alábbiakban röviden összefoglalom azokat a fontos HHV-8 antigéneket, amelyekre mai tudásunk szerint a vírus szerológiai vizsgálatát alapozzuk.

LANA

A HHV-8 szerológiájának kezdetén az elsőgenerációs szerológiai próbákban a HHV-8-at látens episzómális formában hordozó testüregi lymphomasejtek (mint pl. BC-1, BCBL-1) szolgálták antigénül indirekt immunfluoreszcens és Western-blot vizsgálatokban. Ezen vizsgálatok során a biztosan HHV-8 fertőzött Kaposi szarkómás betegek 80-90%-ának savói jellegzetesen egy nukleáris pöttyözöttséget adó fluoreszcenciát produkálnak (Gao és mtsai., 1996b, Kedes és mtsai., 1996). A LANA rövidítés ezt a specifikus morfológiájú immunreakciót adó látens vírusfertőzésre jellemző feltételezetten nem egységes nukleáris antigéncsoportot jelölte (latency associated nuclear antigens). Mások leírták a testüregi lymphomasejtek nukleáris extraktjában Western-blot technikával szintén a Kaposi savók 80-90%-a által felismert 226-234 kDa antigéncsoportot (Gao és mtsai., 1996a). A 226-234kDa nukleáris antigén elleni antitestek megjelenése megelőzte a későbbi Kaposi szarkóma kialakulását HIV fertőzött személyekben. Később igazolódott, hogy a 226-234kDa antigéncsoportot az orf73 kódolja és az újonnan LNA-1-nek (latent nuclear antigen-1) keresztelt antigén immunfluoreszcens morfológiája megegyezik a LANA-éval (Rainbow és mtsai., 1997). A LANA/LNA/LNA-1 elnevezéseket mára a tudományos közlemények többsége egymás szinonimájaként használja a több munkacsoport által is igazoltan orf73 által kódolt antigénre (Kedes és mtsai., 1997, Rainbow és mtsai., 1997, Kellam és mtsai., 1997). Mivel az orf73-nak más humán herpeszvírusokban nincsen homológia ezért az anti-LANA ellenanyag a HHV-8 fertőzés specifikus szerológiai markere. A Kaposi szarkómás egyének anti-LANA pozitív savói leggyakrabban az antigén karboxyterminális végével reagálnak (Kellam és mtsai., 1997). Lineáris epitóptérképezéssel a fehérje más részén is találtak lineáris epitópokat. Valószínű, hogy konformációs epitópok is jellemzik a LANA-t, amelyek fontosak a HHV-8 szerológiájában (Olsen és mtsai., 2000). Éppen ezért az egész LANA-t használó anti-LANA immunfluoreszcencia egyszerűsége, a módszer mindössze 70-80%-osra becsült szenzitivitása ellenére, a mai napig a HHV-8 szerológia alapjaként szolgál. Főként a különböző munkacsoportok eltérő etnikai, földrajzi csoportokban végzett eredményeinek összevetéséhez nyújt elengedhetetlen támpontot az anti-LANA szerológia.

sVCA

A legközelebbi humán herpeszvírus EBV szerológiájában is fontos szerepet kapnak a virális strukturális antigének. Az EBV azonban nem csak támpontot, hanem problémát is jelentett a HHV-8 szerológiai vizsgálatához, hiszen az EBV-vel való nagyfokú homológia a szerológiai keresztreakciók lehetőségét veti fel. Egyes strukturális antigének, mint például az EBV BcLF1 által kódolt nagy kapszid fehérjéje a HHV-8 homológjával az orf25 által kódolt hasonló antigénnel 68%-ban azonos és a kettő között dokumentált szerológiai keresztreakcióra van példa (Andre és mtsai, 1997). Olyan anti-lítikus immunfluoreszcens próbákban, ahol a savót alacsony hígításban vizsgálják forbol észterrel indukált, lítikus antigéneket expresszáló testüregi lymphómasejteken az alacsony szérumhígítás nagyban megnöveli a szerológiai keresztreakció lehetőségét és ellentmondásos adatokat eredményez (Lennette és mtsai., 1996, Smith és mtsai., 1997). Az EBV BFRF3 által kódolt kis víruskapszid antigén (sVCA, *s*mall *v*irus *c*apsid *a*ntigen) ellen megjelenő ellenanyagok diagnosztikus értékűek az EBV fertőzés bizonyításában (van Grunsven és mtsai., 1993). A HHV-8 sVCA-t kódoló orf65 az EBV BFRF3-al mutatott azonossága aminosav sorrend szintjén alacsony fokú (26%), különösen a BFRF3 sVCA fontos szerológiai epitópokat hordozó karboxyterminális végén (21%, van Grunsven és mtsai., 1994, Simpson és mtsai., 1996). A HHV-8 sVCA 22kDa moltömegű strukturális fehérje és az EBV BFRF3 sVCA-hoz hasonlóan szintén jó immunogén (Lin és mtsai., 1997). A szerológialilag fontos epitópok a HHV-8 sVCA esetében in a polipeptidlánc karboxyterminális végén helyezkednek (Pau és mtsai., 1998, Tedeschi és mtsai., 1999). A HHV-8 orf65 karboxyterminális antigénnel nyert szerológiai eredmények kiegészítik az anti-LANA IFA-val nyert adatokat és a két antigén együttes használatával pontosabban jellemezhető a vírus szeroepidemiológiája (Simpson és mtsai., 1996). Az HHV-8 orf65 karboxyterminális antigénjét mind rekombináns, mind peptid antigén formátumban az anti-LANA IFA-hoz hasonlóan igen széles körben használják szeroepidemiológiai vizsgálatok céljából.

gp35-37

A forbol-észterrel indukált testüregi lymphoma sejtek cDNS könyvtárainak immunológiai tesztelése Kaposi szarkómás betegek savóival az orfK8.1-et azonosította egy domináns lítikus antigént kódoló szakaszként (Chandran és mtsai., 1998). Az orfK8.1-ről átírt

RNS érése során három mRNS képződik (K8.1 α , K8.1 β , K8.1 γ). A lítikusan indukált BCBL-1 sejtekben a K8.1 β -ről transzlálódó antigén a 35-37kDa tömegű, glykoprotein természetű antigénkettős a gp35-37 (Raab és mtsai., 1998). A 228 aminosavból álló polipeptidlánc az aminoterminális részén egy rövid szignálpeptid szekvenciát, négy N-glykozilációs hellyel bíró középső extracelluláris domént, egy transzmembrán domént és a karboxyterminális végén egy rövid citoplazmikus szakaszt tartalmaz (Li és mtsai., 1999). A K8.1 antigén a lítikusan indukált testüregi lymphomasejtek citoplazmamembránján és a virion membránjának külső felszínén megjelenik (Li és mtsai., 1999). Az antigén viruspartikulába épült formája azonban 68-72 kDa tömegű (Zhu és mtsai., 1999). A K8.1 antigén deléciós analízise alapján a humán savók pozitív reakciója az orfK8.1 első exonjához kötött (Lang és mtsai., 1999). Azon belül is a szignálpeptid szaksztól mentes polipeptidlánc N-terminális 31 aminosavja alkotja a K8.1 antigén szerológialag fontos epitópjait (Spira és mtsai., 2000). Az HHV-8 orfK8.1 DNS szekvenciája homológiát nem, csak pozicionális analógiát mutat más gammaherpeszvírusok genomjában található transzmembrán glycoprotein (gp) antigéneket kódoló szakaszokkal. Az EBV envelop gp350/220 antigénje fontos a vírus gazdasejthez történő kötődésében és a virion internalizációjában (Tanner és mtsai., 1987). Valószínűleg a K8.1 virion glykoprotein is hasonló funkcióval rendelkezik. Valamint a K8.1 envelop antigén specifikus ellenanyagok is feltehetően neutralizáló hatásúak az EBV gp350/220 specifikus ellenanyagokhoz hasonlóan (Thorley-Lawson és Geilinger, 1980). Minden bizonnyal a rekombináns orfK8.1 antigéneken alapuló szerológiai próbák még az orf65 antigéneken alapuló szerológiai próbák specificitását is meghaladják.

Transzmissziós utak

A transzmissziós utak tekintetében a Kaposi szarkóma rizikócsoportjának tekintett HIV pozitív homoszexuális férfiak csoportjának a normál populációnál magasabb szeroprevalenciája a vírus szexuális úton való terjedésére irányította a figyelmet (Kedes és mtsai., 1996, Regamey és mtsai., 1998a). A HHV-8 szeroprevalenciája, esetleges szerokonverzió a férfi homoszexuális csoportokban a promiszkuitás mértékének, a homoszexuális aktivitás időtartamának és egyes homoszexuális praktikáknak a függvénye (Melbye és mtsai., 1998, Martin és mtsai., 1998). Az STD klinikák beteganyagainak emelkedett szeroprevalenciája szintén a szexuális átvitel fontosságára hívja fel a figyelmet (Kedes és mtsai., 1996). A heteroszexuális kontaktus esetében kimutatható összefüggés az

emelkedett HHV-8 szeroprevalencia és az üzletszerű szexuális életvitel között (Sosa és mtsai., 1998, Cannon és mtsai., 2001).

Az Kaposi szarkóma endémiás közép-afrikai országokban és a szintén emelkedett szeroprevalenciájú Olaszországban azonban már a pubertáskor előtt jelentős mértékű a szeropozitivitás (Lennette és mtsai., 1996, Gao és mtsai., 1996b, Gessain és mtsai., 1999), ami ráirányítja a figyelmet a horizontális terjedés lehetőségére és fontosságára a HHV-8 fertőzés szempontjából endémiás területeken (Mayama és mtsai., 1998, Whitby és mtsai., 2000). Ugyanakkor az anyáról gyermekre történő HHV-8 transzmisszióval is számolni kell (Bourbouli és mtsai., 1998). Minden bizonnyal más herpeszvírusokhoz hasonlóan a nem genitális mucosális útvonal és a nyál is szerepet játszik a HHV-8 terjedésében, hiszen a vírus kimutatható oropharingeális szövetekben és HIV pozitív páciensek nyálában is (Pauk és mtsai., 2000, Boldogh és mtsai., 1998, Koelle és mtsai., 1997).

Vérrel, vérkészítményel történt átvitelre elvi lehetőség van, hiszen HHV-8-at lehet detektálni szeropozitív véradók mononucleáris sejtfrakciójában is (Blackbourn és mtsai., 1997). Az átvitel legvalószínűbben a magvas sejtfrakcióhoz kötött. Ennek megfelelően a napi szinten intravénás kábítószerhasználók csoportjának kimutatható a magasabb HHV-8 szeroprevalenciája. Mindazonáltal a feltehetően közös tű használatával történt átvitel valószínűleg a HIV átvitelénél sokkal alacsonyabb frekvenciájú (Cannon és mtsai., 2001). Ezt támasztja alá a HIV pozitív intravénás kábítószerhasználók csak alacsony mértékben emelkedett Kaposi szarkóma incidenciája (Beral és mtsai., 1990).

A Kaposi szarkóma transzplantáció utáni formájában a vírus grafftal történt átvitelére vannak dokumentált esetek (Regamey és mtsai., 1998b, Luppi és mtsai., 2000). Azonban a transzplantáció utáni forma gyakrabban következménye a transzplantációt megelőző HHV-8 fertőzés reaktiválódásának az immunszuppresszív terápia szövődményeként (Parravicini és mtsai., 1997a, Cattani és mtsai., 2001).

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink kezdetekor nem rendelkezünk adatokkal a HHV-8 jelenlétéről a magyar lakosság körében. Munkámnak elsősorban a magyarországi HHV-8-cal való fertőzöttségi helyzet megismerése a célja, melyet az alábbi állomásokon keresztül közelítettünk meg:

Az irodalmi adatok alapján várhatóan HHV-8 fertőzött klasszikus Kaposi szarkómás betegek HHV-8 fertőzésének bizonyítása. A Kaposi szarkómás mintákban a HHV-8 detektálása.

A Kaposi szarkómás páciensek HHV-8 ellenes humorális immunválszának karakterizálása a LANA, sVCA, gp35-37 antigénekre alapozott szerológiai módszerekkel.

A magyarországi epidemiológiai helyzet megközelítése érdekében az egészséges véradók lezajlott HHV-8 fertőzésének szerológiai vizsgálata.

ANYAGOK és MÓDSZEREK

Vizsgálatok alanyai

A klasszikus Kaposi szarkómás betegek (n=16, 38-86 év, átlag 68,9 év, 13 férfi, 3 nő) különböző mintái a Debreceni Egyetem, Bőrgyógyászati Klinikájának beteganyagából származott. A betegektől terápiás vagy szövettani feldolgozás céljából eltávolított tumorokból kapott szövetmintát vírusvizsgálat céljából a Mikrobiológiai Intézet. A szövettani feldolgozás céljából archivált minták esetében a formalin-fixált paraffinba ágyazott blokkokból végeztük el a víruskimutatást. A betegek szerológiai vizsgálatához natív vér szolgált.

Az Országos Vérellátó Szolgálat, Debreceni Regionális Állomása 1089 véradónak (19-59 év, átlag 38,2 év, 62% férfi, 38% nő) szerológiai szűrővizsgálatra levett szérummintáit anonim módon bocsátotta rendelkezésünkre HHV-8 szerológiai vizsgálat céljából.

Sejtkultúrák

Vizsgálatainkban a HHV-8-at látenszen hordozó BCBL-1 (NIH, AIDS Reagent Program) testüregi lymphoma sejtvonalat használtuk antigén- és nukleinsavforrásként. Negatív kontrollként a Ramos (ATCC CRL 1596) herpeszvírus negatív Burkitt lymphoma sejtvonalat használtuk. Mindkét sejtvonalat RPMI 1640, 10% magzati borjúsérum, 2mM glutamin, 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin tápfolyadékban tenyésztettük. A HHV-8 lítikus ciklusát a BCBL-1 sejtek forbol észterrel (12-O tetradecanoyl phorbol 13-acetate/TPA, 20 ng/ml) 48 óráig történő inkubálásával indukáltuk (Renne és mtsai., 1996).

DNS, RNS preparálás

A biopsziákból homogenizálás, proteináz-K emésztés után történő phenol-chloroform extractióval tisztítottunk DNS-t standard metodika szerint (Sambrook és mtsai., 1989). Az archivált paraffinos mintákból xilollal történt deparaffinálás után preparáltunk amplifikációra alkalmas DNS-t egy általunk módosított alkáli-lízis módszerrel. Röviden: a deparaffinált metszetek rövid proteinase-K emésztésének (250 µg/ml proteinase-K, 1xPCR pufferben, 60C, 10perc) üledékét 0,1N NaOH oldatban hidrolizáltuk 95C-n 10 percig, azután az elegyet

azonos térfogatú 1M Tris-HCl pH=7 pufferral neutralizáltuk. A neutralizált termék felülúszójának a DNS kicsapása alkohollal történt. Centrifugálás után a DNS üledék visszaoldása 10 mM Tris-HCl pH=8, 0,1 mM EDTA oldatban. Az RNS preparáláshoz guanidium isothiocianátos extrakciót használtuk (Chomczynski és Sacchi, 1987).

DNS amplifikációs reakciók

A különböző eredetű DNS mintákból a HHV-8-at kimutatás céljából egyszerű és nested-PCR technikákkal mutattuk ki. A friss biopsziás mintákból az orf26 egy 233 bázispár hosszú DNS szakaszát amplifikáltuk (Chang és mtsai., 1994). Az archivált mintákból ugyanezen szakasz belső részét amplifikáló 172 bp végterméket eredményező nested-PCR-t alkalmaztuk (Whitby és mtsai., 1995). A DNS minták amplifikációs inhibitor tartalmának kizárására β -globin PCR-t alkalmaztunk. A keletkezett amplimereket minden esetben agaróz-ethidium bromide gélelektroforézissel szeparáltuk és UV-fénnyel történő átvilágítással elemeztük. A rekombináns szerológiai módszerekhez a rekombináns antigént kódoló vektorokat PCR klónozással állítottuk elő. A rekombináns K8.1 antigén esetében RT-PCR-t, az sVCA esetében DNS PCR-t alkalmaztunk. Az alábbi listában a klónozáshoz használt primerek szekvenciáit tüntettem fel (a restriktions endonukleáz enzim felismerési szekvenciája aláhúzva).

Orf65ct- <i>Hind</i> III	AGA <u>GAA GCT TCA</u> GCT GAC CGA GTT TCC GCG GCG
Orf65ct- <i>Bam</i> HI	TCT <u>GGA TCC</u> CGG TTG TCC AAT CGT TGC CTA
OrfK8.1- <i>Hind</i> III	GTG <u>CAA GCT TAA</u> TTG TCC CAC GTA TCG TTC
OrfK8.1- <i>Bam</i> HI	GAT <u>CGG ATC CTG</u> GCA CAC GGT TAC TAG CAC

DNS szekvenálás

A klinikai mintákból származó HHV-8 amplimereket *fmol* DNA Cycle Sequencing System (Promega Q4100) segítségével szekvenáltuk meg. A rekombináns plazmidok szekvenciáit T7 sequencing kit (Pharmacia Biotech) használatával végeztük el. A dideoxy szekvenálási reakciók eredményét urea-poliakrilamid gélelektroforézist követő autoradiográfias képek manuális módon történő leolvasásával nyertük.

SSCP analízis

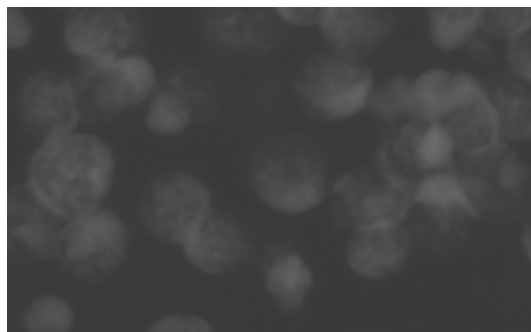
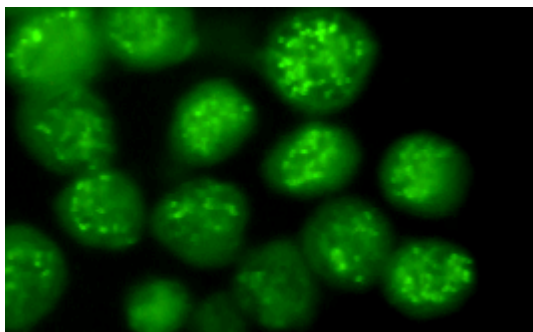
A nested PCR reakciókból származó DNS amplimereket formamiddal denaturáltuk (3µl PCR termék, 100 µl formamidban 0,05% brómfenolkékkel és xyléncianollal) majd 10% poliakrilamid-TBE elektroforézissel (200V, 7C) választottuk szét. Az egyszálú DNS molekulákat ezüstfestéssel tettük láthatóvá.

Indirekt immunfluoreszcencia

A BCBL-1 vagy Ramos 10^7 /ml sejt tartalmazó szuszpenzióból 3-3 µl-t cseppentettünk ki tárgylemezre. A lemezek levegőn történt szárítása után a keneteket acetonnal fixáltuk 10 percig. Az így készített keneteken a vizsgált savómintákat különböző hígításban (PBS-ben) inkubáltuk 1h-ig 37C-on párakamrában. Mosási (PBS, 3x) lépések után anti-humán IgG-FITC konjugátummal (1:50 PBS-ben, Sigma F9512) inkubáltuk a keneteket (30 perc, 37C) Újabb mosási lépések és PBS-glicerines fedés után a keneteket UV epifluoreszcenciás-mikroszkóppal vizsgáltuk. A BCBL-1 sejteken nukleáris pöttyözöttséggel járó jellegzetes fluoreszcenciát a Ramos sejtek kenetén egyidejű negativitás esetén tekintettük anti-LANA pozitívnak (2. Ábra). Az ellenanyag szint meghatározásához a pozitív savók felező hígítási sorát (1:10240-ig) vizsgáltuk az előbbieket szerint. A még reakciót adó legnagyobb hígítást tekintettük az ellenanyagok titerének.

2. Ábra: anti-LANA pozitív savó immunfluoreszcenciás képe BCBL-1 (bal) és Ramos sejten (jobb).

Jól megfigyelhető a BCBL-1 sejteken a nukleáris pöttyözött immunfluoreszcencia.



Rekombináns antigének

A rekombináns orf65/sVCA esetében az antigén karboxyterminális 86-170 aminosavjából álló antigénfragmentumot klónoztunk DNS-PCR-ral. A rekombináns K8.1 antigén esetében a gp35-37 envelop glikoprotein antigén extracelluláris doménjét klónoztuk az antigént kódoló K8.1 β transzkriptorról RT-PCR alkalmazásával. Mindkét esetben az aminoterminális klónozó primerek *Hind*III a karboxyterminális klónozó primerek *Bam*HI restriktions hasítási helyeket tartalmaztak. A primerek szekvenciáit lásd a DNS amplifikációs módszereknél. Mindkét esetben a bi-direkcionális klónozás során a *Hind*III és *Bam*HI hasított PinPoint bakteriális expressziós vektorokat (PinPoint Xa-1 és PinPoint Xa-3, Promega) használtuk. Ligáció után JM109 *E. coli* törzset transzformáltunk PEG-DMSO módszerrel (Chung és mtsai., 1988). A rekombináns klónokat kolónia PCR-ral és restriktions endonukleáz hasítással azonosítottuk, majd szekvenálással ellenőriztük a szekvenciákat. A létrehozott rekombináns plazmidokat p65ct és pK8.1 β nevet kapták. A rekombináns antigének expresszióját - szintén a JM109 sejtekben- a gyári ajánlásoknak megfelelően isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosiddal (IPTG) indukáltuk. A létrejövő fúziós antigének N-terminális része bakteriális eredetű és *E. coli* által endogén módon biotinálódik egy lizin reziduumon. A biotinált rekombináns antigén streptavidin oszlopon vagy ágyon affinitás kromatográfiával tisztítható. A rekombináns orf65 karboxyterminális antigén esetében rekombináns Western-blot módszerhez antigént tisztítottunk streptavidin oszlopon a gyári ajánlásoknak megfelelően (Pomega V2020, PinPoint Purification System). A rekombináns K8.1 ELISA esetében a rekombináns antigén affinitás tisztítási lépése streptavidinnel bevont ELISA mikrotiter lemezekon történt közvetlenül a reakció előtt, egy általunk módosított protokoll alapján (Winkler és mtsai., 1997). Lásd később.

Szintetikus orf65 antigén.

Az orf65 sVCA antigén karboxyterminális 14 aminosavjából (aa 157-170: AVADARKPPSGKKK) álló szintetikus antigént készítettünk ABI431A Peptide Synthesiser készüléken Fmoc kémiával, a szintéziságyról lehasított oligopeptidet (85% homogenitás) használtunk peptid ELISA mérésekhez. Az oligopeptid szintéziságyról történő hasítását Patthy András, Gödöllő végezte.

Orf65 Peptid ELISA

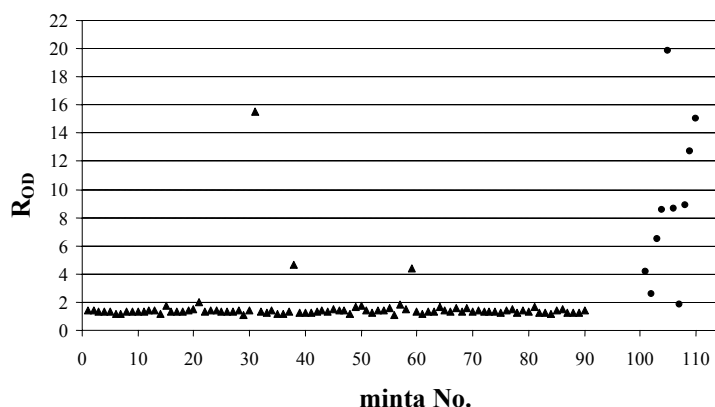
ELISA platek bevonása antigénnel: High Binding Capacity (CorningCostar 3369) ELISA lemezek lyukaiban 100 μ l 10 μ g/ml oligopeptid, 100mM Tris-HCl pH=8.8 oldatban, éjszakán át szobahőn. Mosás 3-szor PBS 0,05% Tween 20 (PBS-T.05). Szabad kötőhelyek blokkolása: 200 μ l/lyuk 1% BSA, 500mM NaCl, 0,1% Tween-20 (PBS-STB), 1h, 37C. Blokkoló oldat kiöntése. PBS-STB-ben hígított (1:80) szérum minták felvitele 100 μ l/lyuk, 1h, 37C. Mosás 5-ször PBS-T.05. 100 μ l/lyuk anti-humán IgG peroxidáz konjugátum (Sigma A-0170, 1:10,000 in PBS-STB), 1h, 37C. Mosás 3-szor PBS-T.05. 100 μ l/lyuk *o*-phenylenediamine szubsztrát phosphate-citrát pH=5.6 pufferben. Színreakció leállítása 30 perc után 100 μ l/lyuk 0,5 N kénsavval. Optikai denzitás mérése 492 és 620 nm-en. Minden mintát párhuzamosan antigénnel nem bevont kontroll lemezeken is meghatároztuk. Az antigén specifikus OD értéket az antigénnel bevont és a kontroll lemezek háttér korrigált optikai denzitásainak ($OD^{492nm}-OD^{620nm}$) különbsége alapján számoltuk. Minden lemez tartalmazta ugyanazt a negatív véradó és pozitív Kaposi szarkómás betegtől származó mintát.

Rekombináns antigén ELISA

A rekombináns K8.1 és rekombináns karboxyterminális sVCA antigének esetében a keletkező fúziós antigén biotináltságát felhasználva a kérdéses antigén tisztítása nélküli ún. streptavidin capture ELISA módszert használtunk kisebb módosításokkal (Winkler és mtsai., 1997). Az eljárás során az antigént expresszáló baktériumkultúra ultrahangos feltárásából származó lizátumot a streptavidinnel előzetesen bevont ELISA lemezek felszínére visszük fel. Az antigén affinitás kromatográfiája így tulajdonképpen az ELISA lemez felszínén történik meg. Innentől kezdve egy hagyományos ELISA reakció menetének megfelelő az eljárás. Az eljárás menete röviden: A rekombináns antigént kódoló plazmidot (pK8.1b, p65ct) hordozó E. coli klónból és az üres vektort (PinPoint Xa-3, vírális antigénfragmentumot nem, csak a bakteriális fúziós részt kódoló) hordozó klónokból előkultúra készítése (37C, 250 RPM, éjszakán át, Luria broth, 100 μ g/ml ampicillin, 0,2 μ M D-biotin Sigma). Az előkultúrák hígítását (1:50 az előbbivel megegyező médiumban) egy órai tenyésztés után 0,1 mM IPTG vel indukáljuk (5h, 37C, 250 RPM). Az antigén expressziójának indukálása majd a kultúrák centrifugálása után az üledéket a kultúrával azonos térfogatú bakteriális lízis pufferben vesszük fel (50 mM Tris-HCl pH=7.4, 50 mM NaCl, 5 % glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM

phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF). A szuszpenzió jégen történő ultrahangos feltárása, a szuszpenzió feltisztulásáig. A lizátumok centrifugálása 13,000 g, 15 perc, 0°C. A fehérjekoncentráció meghatározása Bradford szerint és beállítása bakteriális lízis pufferrel 300 µg/ml-re. Felhasználásig tárolás -72C-on. Az ELISA platek (Corning-Costar 3369) streptavidinnel történő bevonása 100 µl/lyuk 5 µg/ml streptavidin (Promega, Z7041) dH₂O-ban, 16h, szobahőn. Mosás 3-szor PBS-T.05. Szabad kötőhelyek blokkolása: 200µl/lyuk 1% BSA, 500mM NaCl, 0,1% Tween-20 (PBS-STB), 1h, 37C. Blokkoló oldat kiöntése. Antigen felvitele: 100µl/lyuk PBS-BST-ben 20-szorosra hígított bakteriális lizátum, 1h, 37C. A vírusantigén specifikus lemezeket rekombináns vírusantigént expresszáló baktériumklón lizátumával, a kontroll lemezeket az üres vektort tartalmazó baktériumklón lizátumával inkubáljuk. Mosás 5-ször PBS-T.05. Minta hígító: 10% üres vektorral transzformált baktérium lizátuma PBS-STB-ben. Hígított (1:80), 30 percig szobahőn előinkubált szérum minták felvitele 100 µl/lyuk, 1h, 37C. Mosás 3-szor PBS-T.05. 100 µl/lyuk anti-humán IgG peroxidáz konjugátum (Sigma A-0170, 1:10,000 PBS-STB-ben), 1h, 37C. Mosás 3-szor PBS-T.05. 100 µl/lyuk *o*-phenylenediamine szubsztrát phosphate-citrát pH=5.6 pufferben. Színreakció leállítása 30 perc után 100 µl/lyuk 0,5 N kénsavval. Optikai denzitás (OD) mérése 492 és 620 nm-en. A további számításokhoz a korrigált optikai denzitás értéket használtuk (OD^{492nm}-OD^{620nm}). Minden mintát párhuzamosan vírus antigén specifikus és kontroll lemezeken is meghatározzuk. Az antigén specifikus jel (R_{OD}) a vírus antigénnel bevont és a kontroll lemezek korrigált optikai denzitásának hányadosa alapján R_{OD}=OD_{antigen}/OD_{kontroll}. A rekombináns orfK8.1 antigén esetében a határértéket R_{OD}=4-nek a rekombináns orf65 antigén esetében R_{OD}=1,5-nek állapítottuk meg Kaposi szarkómás savóminták párhuzamos ELISA és Western-blot eredményeinek figyelembe vételével.

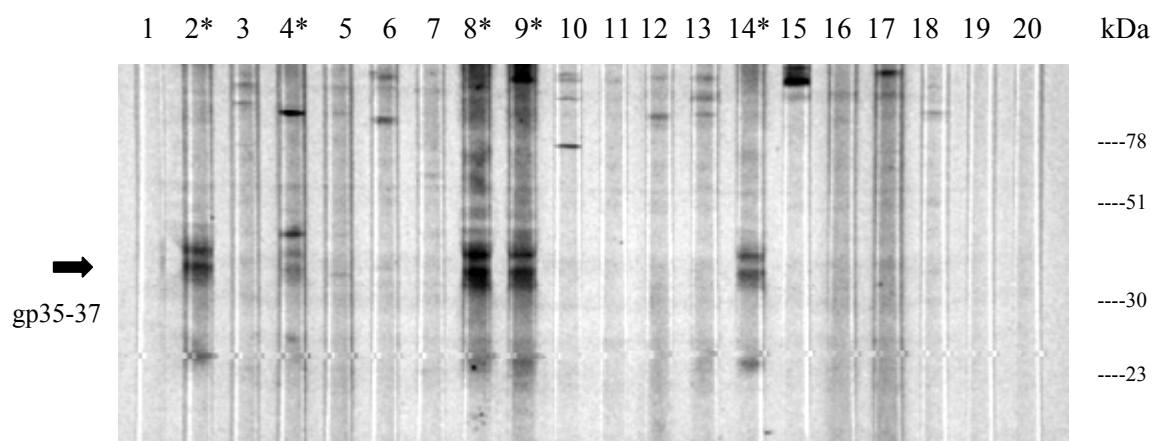
3. Ábra: Rekombináns K8.1 capture ELISA. R_{OD}=[OD^{492nm}-OD^{620nm} K8.1 antigénnel]/ [OD^{492nm}-OD^{620nm} kontroll antigénnel]. Kilencven véradó és 10 Kaposi szarkómás beteg eredménye, ▲:véradó (minta No.:1-90), ●: KS páciens (minta No.: 101-110).



Western-blot

Az ELISA-ával pozitív minták eredményét Western blot módszerrel erősítettük meg. A rekombináns és peptid sVCA ELISA esetében streptavidin oszlopon tisztított rekombináns (p65ct) karboxyterminális sVCA antigént használtunk a Western blot során. A rekombináns K8.1 ELISA pozitív minták esetében a BCBL-1 sejt kultúra forbol észteres indukciója után a sejtekből készített citoplazmikus extraktot használtuk a Western blot reakcióban (3×10^6 sejt 300 μ l, 10 mM Tris-HCl pH=8, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,1% Nonidet-P40, 10 perc, 4C, 250 RPM). A lítikus indukció következtében a K8.1 β mRNS-ről nagy mennyiségben expresszálódik a természetes gp35-37 antigén a BCBL-1 sejtek membránján. A Western blot reakció röviden. Fehérjék denaturálása (95C, 4 perc, Laemmli pufferben, 5xLaemmli: 62.5 mM Tris-HCl pH=6.8, 20 % glycerol, 2 % sodium dodecyl sulphate, 5 % β -mercaptoethanol) után az antigének elválasztása 12%-os gélben SDS-PAGE-val. Elektroblottolás nitrocellulóz membránra (Amersham, Hybond-C). Membrán blokkolása 5% sovány tejpor PBS-sel. Membrán csíkokra vágása vagy elhelyezése Bio-Rad Multiscreen készülékben. Szérumminták hígítása (1:10) PBS 1% sovány tejpor, 0,1% Tween20-ban. Membráncsíkok/membrán inkubálása hígított mintákkal 2h, 37C. Mosás 3-szor PBS 0,1% Tween20 (PBST.1). Inkubálás 1h, 37C anti-humán IgG-alkalikus foszfátáz konjugátum (Sigma A-9544, 1:5000, 1% sovány tejpor, PBST0.1). Mosás 3-szor PBST.1-el. Membrán öblítése dH₂O-val. Immunreakció vizualizálásáa 5-bromo-1-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrasolium szubsztráttal alkalikus pufferben (100mM Tris-HCl pH=9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂). Arhiválás BioRad GelDoc 2000.

4. Ábra: gp35-37 Western-blot. A csillaggal jelölt minták pozitívak a gp35-37 WB reakcióval (minták: 2, 4, 8, 9, 14). Ugyanezeknek a mintáknak $R_{OD} > 4$ az eredménye K8.1 ELISA-ában. Az K8.1 ELISA negatívak $R_{OD} < 4$ minták, nem mutatnak reaktivitást a gp35-37 Western blottal sem.



Statisztikai módszerek

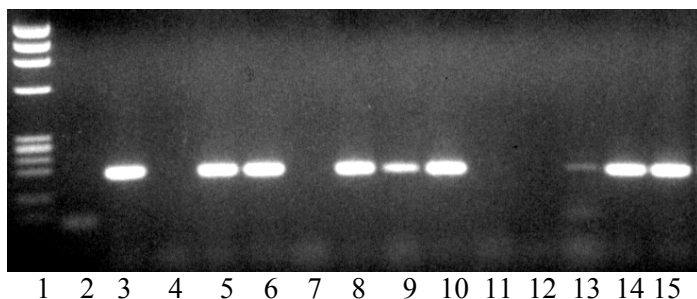
Az adatok statisztikai elemzéséhez az Excel és az SPSS programokat használtuk. Az alkalmazott próbák a Fischer-egzakt, T-, Mann-Whitney, és regressziós analízis voltak.

EREDMÉNYEK és MEGBESZÉLÉS

HHV-8 jelenléte klasszikus Kaposi szarkómában

Tekintettel arra, hogy az általunk elérhető klasszikus Kaposi szarkóma gyakorisága hazánkban is igen alacsony, a Bőrgyógyászati Klinikán 1991 és 1996 között kezelt szövettanilag is megerősített 13 Kaposi szarkómás beteg 28 archivált mintáját dolgoztuk fel. Minden esetben a léziók lokalizációja, a kórlefordulás, a betegek életkora és a HIV szeronegativitás alapján a betegség a Kaposi szarkóma klasszikus típusának bizonyult. A formalinban fixált, paraffinba ágyazott blokkok metszetiből preparált DNS nagymértékben fragmentálódott. A HHV-8 kimutatására ezen archivált mintákból csak a nested-PCR módszer volt sikeres (5. ábra). A 28 mintából 25 esetben (89%) tudtuk a HHV-8-ra specifikus PCR terméket (171 bp) kimutatni. A kontrollként alkalmazott más betegektől származó ugyancsak archivált benignus haemangiómából (2), pyogén granulómából (2), melanómából (2) és bazaliómából (2) a vírust nem tudtuk kimutatni.

5. Ábra: HHV-8 PCR elektroforetikus képe



Számozott oszlopok mintái:
1. ϕ x174 *Hae*III, DNS marker
2., 4.: DNS mentes kontroll
3.: KS biopszia
5.-15.: archivált minták
5.-10., 13.-15.: klasszikus KS
11.: pyogén granulóma
12.: haemangióma

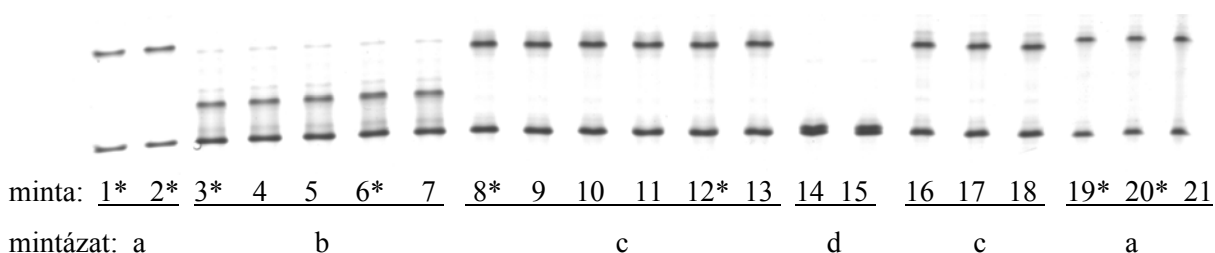
A HHV-8-at a Kaposi léziók minden stádiumában tudtuk kimutatni, bár az archivált minták esetében a folt stádiumú korai Kaposi léziókban a víruskimutatás eredménye gyakrabban volt negatív (1. táblázat). Minden bizonnyal, a korai folt típusú Kaposi léziókban a vírussal fertőzött atipikus endothelsejtek egyébként is alacsony száma és a mintákból származó fragmentálódott DNS tette sikertelenné a HHV-8 detektálását.

1. Táblázat: HHV-8 detektálása a KS különböző stádiumában

KS lézió stádiuma	HHV-8 +	HHV-8 -
Folt (archív)	1/3	2/3
Plakk (archív)	5/6	1/6
Tumor (archív)	19/19	0/19
Összes	25/28 (89%)	3/28 (11%)

Hat beteg esetében, betegenként több mint egy, összesen 21 minta állt rendelkezésünkre. Négy beteg esetében a Kaposi szarkóma multiplex lokalizációjából származó egyidejűleg jelenlevő és sebészileg azonos időben eltávolított minták, két beteg esetében pedig különböző időpontokban, különböző lokalizációban kifejlődött léziók terápia célú kimetszéséből származó minták álltak a rendelkezésünkre. Ezen 21 minta esetében a PCR-rel nyert termékek további összehasonlító szekvenciavizsgálatát végeztük el az egyszálú DNS konformációs polimorfizmus (SSCP) vizsgálat alkalmazásával. Az SSCP analízis négy megkülönböztethető mintázatot (a, b, c, d) eredményezett (6. ábra). Az ugyanazon beteghez tartozó különböző minták ugyanazt az SSCP mintázatot adták. A négy különböző SSCP mintázatból három típust (a, b, c), amely négy betegtől 2-2 tehát összesen 8 mintát tartalmazott, szekvenálással is megvizsgáltunk. A három különböző SSCP mintázat különböző pontmutációkkal négy szekvenciavariánst takart. Az SSCP 'a'-típusú mintázat két variánst is reprezentált (2. táblázat). A szekvenálással jellemzett minták esetében is azt az eredményt kaptuk, hogy az egy beteghez tartozó minták következetesen ugyanabba a szekvenciavariánsba tartozó HHV-8-at tartalmaztak.

6. Ábra: 6 páciens mintáiból származó PCR-SSCP eredmények. Az ugyanazon beteghez tartozó minták aláhúzással összekapcsolva (mintavétel ideje). Páciens #1: 1-2. minta ('91, '94), Páciens #2: 3-7. minta ('92, '93, '94, '94, '95), Páciens #3: 8-13. minta ('92, '94, '94, '95, '95, '96), Páciens #4: 14-15. minta ('94 mindkettő), Páciens #5: 16-18. minta ('94 mind), Páciens #6: 20-21. minta ('94 mindkettő), *: szekvenálással ellenőrzött minták.



2. Táblázat: Szekvenálással is ellenőrzött SSCP mintázatok. A szekvenciák Chang és mtsai., (1994) által publikált szekvenciához hasonlítva.

SSCP mintázat	pontmutáció	minta száma a 6. Ábrán
a.	1033. C>T 1146. G>A	1, 2
b.	1032. C>A 1033. C>T 1132. A>G 1139. A>C	3, 6
c.	1033. C>T	8, 12
a.	1033. C>T 1145. G>A	19, 20

Az a tény, hogy a hazai klasszikus Kaposi szarkóma mintákban is sikeresen kimutatható a HHV-8 a klinikailag különböző stádiumú léziókban, egy további adat a vírus és a betegség közötti szoros kapcsolatot illetően.

Annak ellenére, hogy a kimutattott orf26 a genomon belül a konzervatív régiók közé tartozik, más szerzők is mutattak ki ezen szakaszon belül szekvenciavariabilitást (Rady és mtsai., 1995, Huang és mtsai., 1995). Mivel a KS tumor legtöbb sejtjében a HHV-8 látens epizomális formában van jelen, a vírus DNS replikációja minimális szintű és egyébként is eltérő mechanizmusú, mint a produktív ciklust jellemző lineáris vírusgenom replikációja. Ugyanazon beteg KS tumorából és a lítikus vírusciklussal jellemzett PBMC frakciójából a vírusgenom ezen szakaszában pontmutációnyi különbségre van publikált adat (Decker és mtsai., 1996). Amennyiben a különböző lézók kialakulása egyenként bekövetkező, egymástól független vírusfertőzések eredménye, akkor várható volna a különböző léziókat jellemző vírusszekvenciák között variabilitás. Az ugyanazon beteghez tartozó különböző tumormintákban talált orf26 szekvenciák következetes identikussága felvetette bennünk a klasszikus Kaposi-tumor klonális eredetét. A víusról rendelkezésre álló mai ismereteink birtokában az általunk talált következetes identikusság, csupán annyit jelent, hogy egy páciensen belül ugyanaz a variánsa fordul elő a vírusnak, amit mások a hipervariábilis orfK1 analízisével meg is erősítettek (Zong és mtsai., 1999).

A Kaposi szarkóma mono- vagy poliklonalitásának a megítélése a celluláris DNS vizsgálatának a szintjén, az X kromoszóma inaktivációjának vizsgálatával ellentmondásos adatokat eredményezett a tumorban jelenlévő többféle sejttypusnak köszönhetően (Rabkin és mtsai., 1997, Delabesse és mtsai., 1997). A klonalitás kérdésének végleges eldöntéséhez döntően hozzájárulhat a vírus és a virális pathomechanizmus egyre pontosabb megismerése is. A klonalitás kérdésének eldöntéséhez egy az általunk választottnál erősebb klonalitási

markernek, nevezetesen a cirkularizált vírusgenom TR hosszának analízise szolgált adatokkal. A mai elgondolás szerint a Kaposi léző kialakulásának korai szakaszát a HHV-8 fertőzés következtében kialakuló atípusos érűjdonképződéssel járó poliklonális endothelproliferáció eredményének tartják, mely alapjául szolgál egy vagy több valódi transzformált klón kiszelektálódásához és végső soron tumor kialakulásához az incipiens Kaposi lézióból. A Kaposi szarkóma tumor mono- és oligoklonális eredetének lehetőségét támasztják alá a látens cirkuláris vírusgenom TR hosszának analízisével nyert adatok (Judde és mtsai., 2000).

Szerológiai eredmények

A szerológiai vizsgálatok céljából a kontrollvizsgálatra visszahívott és az 1996 után Kaposi szarkóma diagnózisú új betegektől szérummintákat gyűjtöttünk. A szerológiai vizsgálatok megkezdése előtt a látókörunkbe újonnan került KS betegek HHV-8 fertőzöttségének igazolására és egy esetleges téves diagnózis kizárásának érdekében a diagnosztikus vagy terápiás célból eltávolított friss szövetmintákból is elvégeztük a HHV-8 előzetes kimutatását. A formalinos fixálás előtti szövetmintákból így minden esetben ki tudtuk mutatni a HHV-8-at egyszerű, nem nested PCR-ral.

A Kaposi szarkómás betegek (n=16) szérummintáit ezután a metodikai részben leírtak szerint megvizsgáltuk LANA, sVCA és gp35-37 antigének elleni IgG típusú ellenanyagok jelenlétére. Az egészséges véradók körében az anti-LANA IgG ellenanyagok kimutatását összesen 1089 véradó szérum mintáiból határoztuk meg. A struktúrantigének elleni IgG ellenanyagokat ugyanezen 1089 véradó egy kisebb véletlenszerűen kiválasztott 482-fős csoportjában határoztuk meg. Továbbá 29 gyermek (1-14 év) savómintáit is megvizsgáltuk HHV-8 specifikus IgG típusú antitestek jelenlétére. A könnyebb áttekinthetőség kedvéért a különböző csoportokban kapott szerológiai eredmények egy közös (3. táblázat) táblázatban is szerepelnek.

Az általunk vizsgált Kaposi szarkómás betegek mindegyike szeropozitív volt legalább egy HHV-8 antigénre. A Kaposi szarkómás betegcsoportban az ellenanyagok előfordulása az alábbiakban alakult: 93.7% (15/16) az anti-LANA, 87.5% (14/16) a K8.1 antigén elleni és 68.7% (11/16) az orf65 karboxyterminális antigénre specifikus ellenanyagok esetében. A két különböző orf65 antigén ELISA a Kaposi szarkómás betegcsoportban azonos eredményt

adott. Az anti-LANA ellenanyagok titere a Kaposi szarkómás páciensek esetében 640 és 10240 között, átlagosan 2560 volt.

Az anti-LANA specifikus IgG ellenanyag prevalenciája az egészséges véradó csoportban 1,56%-nak (17/1089) adódott. Az anti-LANA ellenanyagok titere a véradók esetében 40-1280 közötti tartományban fordult elő, átlagosan 120 volt. A rekombináns K8.1 antigén ellen 1,24%-ban (6/482) detektáltunk IgG ellenanyagot a véradók szérummintáiban. A rekombináns orf65 kapszid antigén esetében 1,45%-ban (7/482) kaptunk pozitívítást. Az orf65 peptid ELISA-ával csak 0,83%-ban (4/482) kaptunk Western-blottal is megerősíthető pozitívítást. A két orf65 antigén ELISA eredményei jól fedték egymást, ugyanis az orf65 peptid antigén ELISA-ával detektált 4 pozitív esetből 3 a rekombináns orf65 antigénnel is pozitív volt. Összesen 1,65%-ban (8/482) tudtunk valamelyik orf65 antigén ELISA-ával sVCA ellenes IgG ellenanyagot detektálni. Ugyanannak a 482 véradónak az esetében, akik mintáiból az ELISA méréseket is elvégeztük az anti-LANA szeroprevalencia 1,87%-nak adódott (9/482). A véradók csoportjában a négy módszerrel összességében 3,52% (17/482) volt a HHV-8 specifikus IgG ellenanyagok prevalenciája. A 17/482 HHV-8 szeropozitív egyénből 14 férfi és 3 nő, átlagos életkoruk 39,58 év. A szintén 17 anti-LANA pozitív egyénből 13 férfi és 4 nő, átlagos életkoruk 42,7 év. Ha az eredeti nemi arányokat figyelembe vesszük, akkor a szeroprevalencia a férfiakban több mint duplája a nőkének (1,9% vs. 0,9%) az anti-LANA és majdnem háromszorosa (4,7% vs. 1,6%) az összesített szeroprevalencia tekintetében. A szeropozitív véradók között tapasztalt nemi megoszlás hasonló volt a vizsgált klasszikus KS betegcsoportéval, ahol 16-ból 13 férfi, de a KS csoport kora szignifikánsan magasabb volt a szeropozitív véradókénál (T-próba, $p < 0,05$).

Az 1-14 éves kor közötti gyermekek esetében egyik módszerrel sem tudtunk HHV-8 specifikus IgG ellenanyagot detektálni.

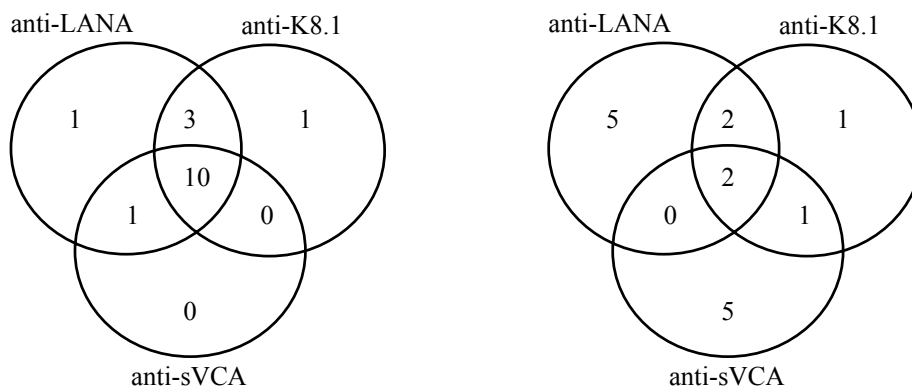
3. Táblázat: HHV-8 szeroprevalencia értékei különböző vizsgálati csoportokban

Csoport	Összesített HHV-8 szeroprevalencia	anti-sVCA		anti-K8.1	anti-LANA	
		Peptid	Rekomb.		prevalencia	Titer (átlag)
KS	100% (16/16)	11/16	11/16	14/16	15/16	640-10240 (2650)
véradók	3,52% (17/482)	4/482	7/482	6/482	9/482 17/1089	40-1280 (120)
gyermekek	0% (0/29)	0/29	0/29	0/29	0/29	-

A KS csoportban és a szeropozitív véradókban a különböző antigének elleni ellenanyagválasz megoszlását a 7. ábra mutatja. A 16 KS beteg közül 10 szérumban mindhárom vizsgált antigén ellen és 14 esetében legalább két antigén ellen tudunk antitestet kimutatni. Két beteg esetében csak egy-egy antigén ellen tudunk ellenanyagot detektálni.

A 17 szeropozitív véradó esetében, amelyeknél elvégeztük a vizsgálatot mindhárom antigénnel, a különböző antigénekre adott specifikus ellenanyagválaszokat kisebb összhang jellemzte a Kaposi szarkómás csoportéhoz képest. Két esetben tudunk csak kimutatni mindhárom antigén ellen egyidejűleg IgG ellenanyagot. A kettős pozitivitás is csak 3 esetben fordult elő, jellegzetesen a K8.1 specifikus ellenanyagok meglétével. Az anti-LANA ellenanyag és az anti-sVCA ellenanyag 5-5 esetben, csak önmagában volt detektálható (7. ábra).

7. Ábra: Kaposi szarkómás betegek és a szeropozitív véradók ellenanyagválaszának megoszlása antigéneenként. A számok a körökben ill. a körök metszeteiben megadják a szeropozitív esetek számát az adott antigénre/antigénekre.

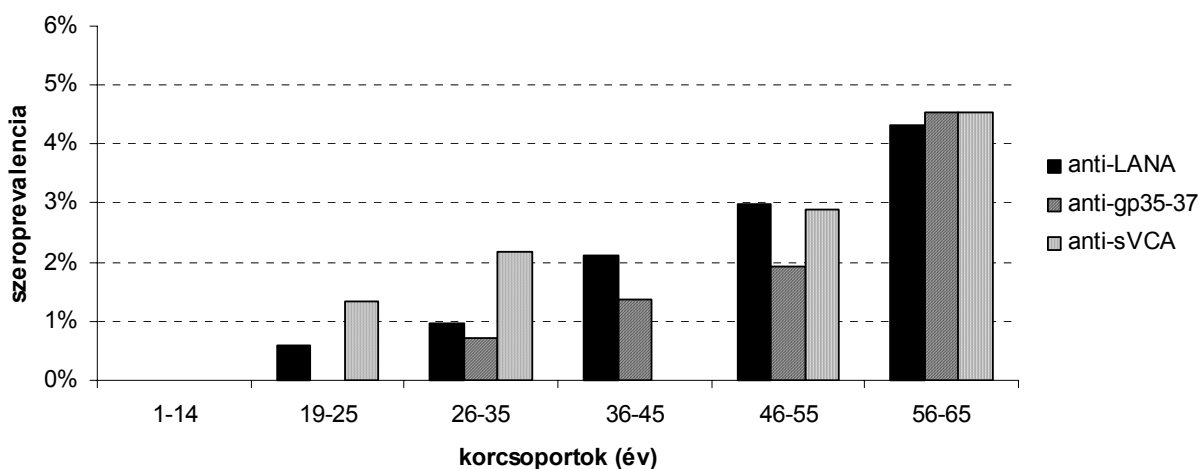


Kaposi szarkómás páciensek (n=16)

Egészséges véradók (n=17)

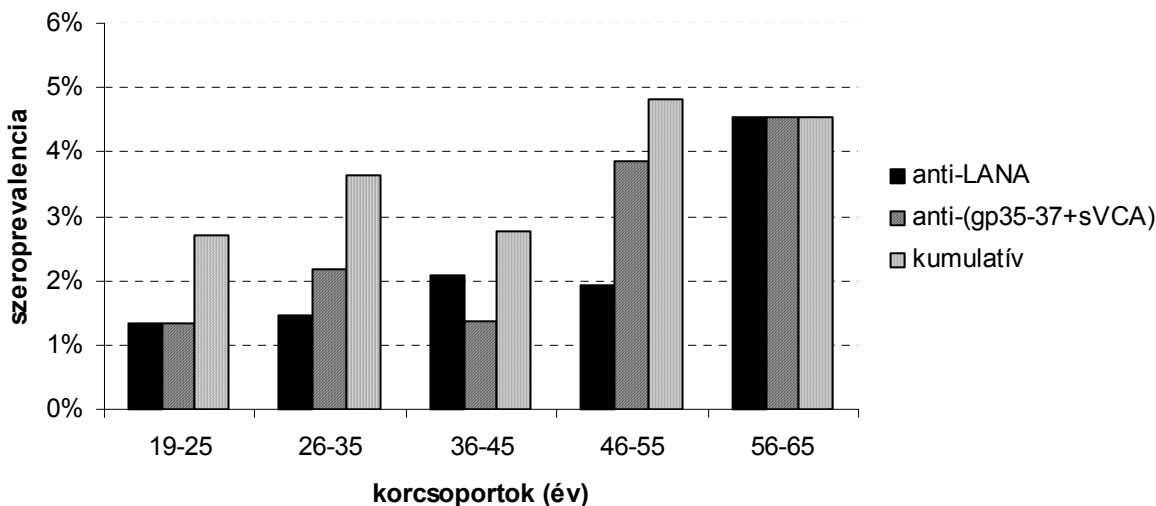
Az egészséges véradók és gyermekek ellenanyagainak koreloszlása az összes adat figyelembevételével a 8. ábrán látható. Általánosságban elmondható, hogy a HHV-8 specifikus ellenanyagok prevalenciája a növekvő életkorral fokozatosan emelkedő tendenciát mutat függetlenül a vizsgálatban használt antigéntől.

8. Ábra: HHV-8 antigénekre specifikus IgG ellenanyagok koreloszlása (14 gyermek, 482 véradó, anti-LANA esetén 1089 véradó eredménye alapján.)



Amikor az ellenanyagok koreloszlását csak annak a 482 véradó adatainak felhasználásával ábrázoljuk, amelyeknél mindhárom antigénnel elvégeztük a szerológiai vizsgálatot, hasonló jelenséget figyelhetünk meg a kumulatív HHV-8 szeroprevalenciára is (9. ábra). Érdekesség, hogy a legidősebb korcsoportban a különböző antigének ellen kialakult ellenanyagválasz teljes összhangban van. A korcsoportokban levő pozitív esetek alacsony száma és a primer infekció ismeretlen ideje azonban nem teszi lehetővé, hogy ebből komolyabb következtetést vonjunk le. Talán egy hipotézis szintjén érdemes megfogalmazni, hogy elképzelhető az egyes antigénekre adott ellenanyagválaszok alakulása között időbeli különbség, mint ahogyan arra az EBV-nél is van példa. Itt jegyzem meg, hogy a HHV-8 fertőzés szerológiai nyomonkövetése egészséges immunkompetens egyének esetén még nem történt meg. Ennek egyik nyilvánvaló oka, hogy a primer HHV-8 fertőzéshez nem társul klinikai tünet egészséges emberekben, így a természetes fertőzés idejének meghatározása nehézkes.

9. Ábra: HHV-8 antigénekre specifikus IgG ellenanyagok koreloszlása (482 véradó eredménye).



Az anti-LANA szerológia eredménye elegendő elemszámúnak bizonyult regressziós analízis elvégzésére. Az 1089 véradó anti-LANA szeroprevalenciájának regressziós analízise szerint a növekvő életkor alacsony mértékben, de statisztikailag szignifikánsan pozitív hatással van a szeroprevalenciára (OR=1.05/év, CI:1.0005-1.1069, p=0.048). Az idősebb korcsoportokban megfigyelt egyre magasabb HHV-8 szeroprevalenciát más tanulmányok szintén leírták, pl. a magasabb HHV-8 szeroprevalenciájú itáliai lakosság esetében is (Calabro és mtsai., 1998). Nehéz elképzelni, hogy az 50 év feletti korosztályok magasabb szexuális aktivitása volna ennek a szeroprevalencia emelkedésnek az oka. Ez a jelenség ráirányítja a figyelmet, hogy a HHV-8 terjedése az alacsony prevalenciájú területeken sem kizárólag a szexuális útra korlátozódik. Ennek nem mond ellent az, hogy a szintén alacsony HHV-8 prevalenciájú Egyesült Államokhoz hasonlóan (Blauvelt és mtsai., 1997), nálunk is csak a pubertáskor utánra tehető az esetleges vírusfertőzés bekövetkezése. Ez csak rávilágít a nem genitális mucosális útvonalnak a szexuális transzmissziónál alacsonyabb átviteli frekvenciájára.

Azt a jelenséget, hogy a férfiak és a nők között a HHV-8 szeropozitivitás a férfiak javára magasabb, más népeségek körében végzett tanulmányok is leírják (Whitby és mtsai., 1998, Manns és mtsai., 1998). A prosztatata, mint lehetséges rezervoár (Monini és mtsai., 1996), a nemek közötti eltérő fogékonyság a vírusfertőzésre és ezzel összefüggésben a fertőzés eltérő lefolyása (perzisztencia, lítikus reaktiválódási epizódok) szintén szerepet játszhatnak ennek kialakulásában, és korántsem biztos, hogy ez a jelenség valós prevalencia viszonyokat tükröz.

A szeropozitív véradók átlagos életkora, a szeropozitivitás idősebb korcsoportokra jellemző moderált emelkedése ellenére is, statisztikailag jelentősen alacsonyabb a klasszikus KS csoport átlagos életkoránál (t-próba, p<0,05). A véradók és a KS csoport szeroprevalenciája közötti szignifikáns különbség (Fischer egzakt próba, p<0,01) azonban nem a két csoport különböző kormegoszlásában keresendő, ugyanis a regressziós modell szerint a klasszikus KS tipikus korának megfelelő 60-80 éves korosztály becsült anti-LANA szeropozitivitása 4,8-13% közé tehető, a KS csoport 94%-os anti-LANA szeropozitivitásával szemben.

Az egészséges véradók és a Kaposi szarkómás betegek anti-LANA titereinek szignifikáns különbsége (Mann-Whitney, p<0,001) a Kaposi tumorra jellemző intenzív LANA expresszióra vezethető vissza (Katano és mtsai., 1999, Dupin és mtsai., 1999, Rainbow és mtsai., 1997). Az anti-LANA titer szignifikánsan alacsonyabb volta az egyéb rákos betegségekben szenvedő HHV-8 szeropozitív, de nem Kaposi szarkómás betegekben is

kimutatható a KS betegek magas anti-LANA titeréhez képest (Sitas és mtsai., 1999). Az anti-LANA titer nem egyszerűen a vírusexpozíció, hanem sokkal inkább a LANA-t expresszáló sejtek számának lehet a függvénye. Valószínűleg az anti-LANA ellenanyag titerének prognosztikai jelentősége is van a klasszikus KS esetében.

A klasszikus KS-nak az 50 évnél idősebb kor, egyidejű HHV-8 szeropozitivitással jelentős rizikótényezője (OR=56,7, CI: 4,67-687,7, $p<0,0016$). Az eredményeink, hovatovább úgy is értelmezhetők, hogy a klasszikus KS kialakulása a HHV-8 fertőzés hosszú inkubációs idejű, ritka időskori következménye. Ez utóbbi ráadásul teljesen egybevág a klasszikus Kaposi szarkómáról ismert képünkkel. Hasonló megállapításra jutottak más tanulmányok is (Kowalczyk és mtsai., 1998, Simonart és mtsai., 1999, Cerimele és mtsai., 2000). Ez alapján is és a KS többi epidemiológiai formája alapján is nyugodtan levonhatjuk azt a következtetést, hogy a HHV-8 opportunista pathogén.

A véradók csoportjában dokumentált 3,5%-os magyarországi HHV-8 szeroprevalencia érték jól beleillik abba a geográfiai gradiensbe, ami a Közép-Afrika 30-70% (Gao és mtsai., 1996b, Gessain és mtsai., 1999)- mediterrán országok 10-30% (Calabro és mtsai., 1998, Whitby és mtsai., 1998)- Nyugat -Európa 1-5% (Marcelin és mtsai., 1998, Tedeschi és mtsai., 1999, Simpson és mtsai., 1996)- vonalon tapasztalható a HHV-8 szeroprevalenciáját illetően. Mindazonáltal ez a jelenlegi adat is valószínűleg alacsonyabb a teljes lakosságot jellemző átfertőzöttségi szinttől, ha figyelembe vesszük azt, hogy a véradók koreloszlása a fiatal-középkorú csoportok tekintetében kissé túlreprezentált az idősebb korosztály rovására. Mindent összevetve a valós átfertőzöttséget az egész lakosságra vonatkoztatva legalább 5%-ra becsülhetjük.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az általunk végzett munka további adatokat szolgáltatott a HHV-8 és Kaposi szarkóma ismert szoros kapcsolatához. A vírust sikerrel mutattuk ki a hazai klasszikus Kaposi szarkómás betegek archivált biopsziás mintáiban. Az egy beteghez tartozó különböző mintákban a vírusnak ugyanazon variánsát mutattuk ki. Szerológiával is igazoltuk a Kaposi szarkómás betegek HHV-8 fertőzését.

A véradók körében végzett szerológiai vizsgálataink alapján a HHV-8 Magyarországon csak alacsony mértékben, de legalább 3,5 %-ban előfordul a populációban. A vírusellenes ellenanyagokat a pubertáskor után tudtuk a szérummintákban kimutatni. Az idősödő korról párhuzamosan a HHV-8 szeroprevalencia moderáltan emelkedik. A HHV-8 transzmissziós útjai közül a genitális és nem genitális mucosális útvonal szerepét tartjuk fontosnak a magyarországi epidemiológiai helyzet kialakításában. A férfínépesség közel háromszoros szeroprevalenciája a nőkéhez képest felveti a vírusfertőzés lefolyásának különbségét is a két nem között. Nem ismertek azonban egyelőre azok a faktorok, amelyek alapján egyértelműen prognosztizálni lehetne az egészséges vírushordozókban a betegség kialakulását. Feltehetően az anti-LANA ellenanyagok titerének prognosztikai jelentősége van a klasszikus Kaposi szarkóma kialakulásában és lefolyásában.

Még ha a klasszikus Kaposi szarkóma nem is gyakori és legtöbbször nem is az életet veszélyeztető lefolyású megbetegedés, az immunszuppresszióhoz társult iatrogén Kaposi szarkóma lehetősége miatt, az alacsony HHV-8 szeroprevalencia jelentősége nem lebecsülendő.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Prof. Gergely Lajos témavezetőmnek, hogy irányításával és irántam tanusított türelmével ez a munka megszületett.

Kiváló kollégáimnak is, akik a kezdeti lépéseknél a segítségemre voltak, mint Veress György, Kónya József és Czeglédy Judit, hálával tartozom. A kísérletek technikai kivitelezésében elévülhetetlen érdemeket szerzett Kissné Deák Andreának, Kissné Geréby Viktóriának, Rác Péternének és Márton Józsefnek is köszönettel tartozom. A peptidszintézisben nyújtott segítségéért Andirkó Istvánnak és Patthy Andrásnak tartozom köszönettel.

Kedves kollégáimra, akik munkámat tanácsaikkal, társaságukkal vagy barátságukkal segítették, mint Beck Zoltán, Bácsi Attila, Szarka Krisztina, Szabó Judit, Szládek Györgyi, Prof. D. Tóth Ferenc és Szabó Béla, szintén hálával gondolok.

A munka nem jöhetett volna létre a Bőrgyógyászati Klinika lelkes hozzájárulása nélkül sem, amiért elsősorban Remenyik Évának és Prof. Hunyadi Jánosnak tartozom köszönettel és valamennyi klinikai dolgozónak, akik részvételükkel segítették a munka megszületését.

Az Országos Transzfúziós Szolgálat, Debreceni Regionális Állomása vezetőjének Medgyessy Ildikónak és munkatársának Jakabné Kovács Erzsébetnek tartozom köszönettel, amiért a szerológiai vizsgálatok alapanyagát önzetlenül biztosították.

Hálával tartozom családtagjaimnak, hogy munkám során mellettem álltak és biztattak.

IRODALOMJEGYZÉK

Andre S, Schatz O, Bogner JR, Zeichhardt H, Stoffler-Meilicke M, Jahn HU, Ullrich R, Sonntag AK, Kehm R, Haas J. Detection of antibodies against viral capsid proteins of human herpesvirus 8 in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *J Mol Med.* 1997 Feb;75(2):145-52.

Arvanitakis L, Geras-Raaka E, Varma A, Gershengorn MC, Cesarman E. Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature.* 1997 Jan 23;385(6614):347-50.

Bais C, Santomasso B, Coso O, Arvanitakis L, Raaka EG, Gutkind JS, Asch AS, Cesarman E, Gershengorn MC, Mesri EA, Gerhengorn MC. G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature.* 1998 Jan 1;391(6662):86-9.

Ballestas ME, Chatis PA, Kaye KM. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science.* 1999 Apr 23;284(5414):641-4.

Ballestas ME, Kaye KM. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency-Associated Nuclear Antigen 1 Mediates Episome Persistence through cis-Acting Terminal Repeat (TR) Sequence and Specifically Binds TR DNA. *J Virol.* 2001 Apr 1;75(7):3250-3258.

Beral V, Peterman TA, Berkelman RL, Jaffe HW. Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection? *Lancet.* 1990 Jan 20;335(8682):123-8.

Bertin J, Armstrong RC, Otilie S, Martin DA, Wang Y, Banks S, Wang GH, Senkevich TG, Alnemri ES, Moss B, Lenardo MJ, Tomaselli KJ, Cohen JI. Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Feb 18;94(4):1172-6.

Biggar RJ, Whitby D, Marshall V, Linhares AC, Black F. Human herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype. *J Infect Dis.* 2000 May;181(5):1562-8.

Blackbourn DJ, Ambroziak J, Lennette E, Adams M, Ramachandran B, Levy JA. Infectious human herpesvirus 8 in a healthy North American blood donor. *Lancet.* 1997 Mar 1;349(9052):609-11.

Blackbourn DJ, Lennette ET, Ambroziak J, Mourich DV, Levy JA. Human herpesvirus 8 detection in nasal secretions and saliva. *J Infect Dis.* 1998 Jan;177(1):213-6.

Blasig C, Zietz C, Haar B, Neipel F, Esser S, Brockmeyer NH, Tschachler E, Colombini S, Ensoli B, Sturzl M. Monocytes in Kaposi's sarcoma lesions are productively infected by human herpesvirus 8. *J Virol.* 1997 Oct;71(10):7963-8.

Blauvelt A, Sei S, Cook PM, Schulz TF, Jeang KT. Human herpesvirus 8 infection occurs following adolescence in the United States. *J Infect Dis.* 1997 Sep;176(3):771-4.

Boldogh I, Szaniszló P, Bresnahan WA, Flaitz CM, Nichols MC, Albrecht T. Kaposi's sarcoma herpesvirus-like DNA sequences in the saliva of individuals infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis.* 1996 Aug;23(2):406-7. No abstract available.

Boshoff C, Endo Y, Collins PD, Takeuchi Y, Reeves JD, Schweickart VL, Siani MA, Sasaki T, Williams TJ, Gray PW, Moore PS, Chang Y, Weiss RA. Angiogenic and HIV-inhibitory functions of KSHV-encoded chemokines. *Science.* 1997 Oct 10;278(5336):290-4.

- Boshoff C, Schulz TF, Kennedy MM, Graham AK, Fisher C, Thomas A, McGee JO, Weiss RA, O'Leary JJ. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. *Nat Med*. 1995 Dec;1(12):1274-8.
- Bourboulia D, Whitby D, Boshoff C, Newton R, Beral V, Carrara H, Lane A, Sitas F. Serologic evidence for mother-to-child transmission of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection. *JAMA*. 1998 Jul 1;280(1):31-2.
- Calabro ML, Sheldon J, Favero A, Simpson GR, Fiore JR, Gomes E, Angarano G, Chieco-Bianchi L, Schulz TF. Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 in several regions of Italy. *J Hum Virol*. 1998 Mar-Apr;1(3):207-13.
- Cannon MJ, Dollard SC, Smith DK, Klein RS, Schuman P, Rich JD, Vlahov D, Pellett PE. Blood-borne and sexual transmission of human herpesvirus 8 in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 2001 Mar 1;344(9):637-43.
- Cattani P, Capuano M, Graffeo R, Ricci R, Cerimele F, Cerimele D, Nanni G, Fadda G. Kaposi's Sarcoma Associated with Previous Human Herpesvirus 8 Infection in Kidney Transplant Recipients. *J Clin Microbiol*. 2001 Feb;39(2):506-508.
- Cerimele D, Cottoni F, Masala MV. Long latency of human herpesvirus type 8 infection and the appearance of classic Kaposi's sarcoma. *J Am Acad Dermatol*. 2000 Oct;43(4):731-2.
- Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med*. 1995 May 4;332(18):1186-91.
- Cesarman E, Nador RG, Aozasa K, Delsol G, Said JW, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in non-AIDS related lymphomas occurring in body cavities. *Am J Pathol*. 1996 Jul;149(1):53-7.
- Cesarman E, Nador RG, Bai F, Bohenzky RA, Russo JJ, Moore PS, Chang Y, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus contains G protein-coupled receptor and cyclin D homologs which are expressed in Kaposi's sarcoma and malignant lymphoma. *J Virol*. 1996 Nov;70(11):8218-23.
- Chandran B, Bloomer C, Chan SR, Zhu L, Goldstein E, Horvat R. Human herpesvirus-8 ORF K8.1 gene encodes immunogenic glycoproteins generated by spliced transcripts. *Virology*. 1998 Sep 15;249(1):140-9.
- Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*. 1994 Dec 16;266(5192):1865-9.
- Chang Y, Moore PS, Talbot SJ, Boshoff CH, Zarkowska T, Godden-Kent , Paterson H, Weiss RA, Mittnacht S. Cyclin encoded by KS herpesvirus. *Nature*. 1996 Aug 1;382(6590):410. No abstract available.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. 1987, 162:156-159.
- Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989, 86:2172-2175

- Corbeil J, Evans LA, Vasak E, Cooper DA, Penny R. Culture and properties of cells derived from Kaposi sarcoma. *J Immunol.* 1991 May 1;146(9):2972-6.
- Cotter MA, Robertson ES. The latency-associated nuclear antigen tethers the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome to host chromosomes in body cavity-based lymphoma cells. *Virology.* 1999 Nov 25;264(2):254-64.
- Davis MA, Sturzl MA, Blasig C, Schreier A, Guo HG, Reitz M, Opalenik SR, Browning PJ. Expression of human herpesvirus 8-encoded cyclin D in Kaposi's sarcoma spindle cells. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Dec 17;89(24):1868-74.
- Decker LL, Shankar P, Khan G, Freeman RB, Dezube BJ, Lieberman J, Thorley-Lawson DA. The Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) is present as an intact latent genome in KS tissue but replicates in the peripheral blood mononuclear cells of KS patients. *J Exp Med.* 1996 Jul 1;184(1):283-8.
- Delabesse E, Oksenhendler E, Lebbe C, Verola O, Varet B, Turhan AG. Molecular analysis of clonality in Kaposi's sarcoma. *J Clin Pathol.* 1997 Aug;50(8):664-8.
- Dittmer D, Lagunoff M, Renne R, Staskus K, Haase A, Ganem D. A cluster of latently expressed genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol.* 1998 Oct;72(10):8309-15.
- Djerbi M, Screpanti V, Catrina AI, Bogen B, Biberfeld P, Grandien A. The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J Exp Med.* 1999 Oct 4;190(7):1025-32.
- Dupin N, Fisher C, Kellam P, Ariad S, Tulliez M, Franck N, van Marck E, Salmon D, Gorin I, Escande JP, Weiss RA, Alitalo K, Boshoff C. Distribution of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castlemann's disease, and primary effusion lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Apr 13;96(8):4546-51.
- Ensoli B, Nakamura S, Salahuddin SZ, Biberfeld P, Larsson L, Beaver B, Wong-Staal F, Gallo RC. AIDS-Kaposi's sarcoma-derived cells express cytokines with autocrine and paracrine growth effects. *Science.* 1989 Jan 13;243(4888):223-6.
- Flore O, Rafii S, Ely S, O'Leary JJ, Hyjek EM, Cesarman E. Transformation of primary human endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nature.* 1998 Aug 6;394(6693):588-92.
- Foreman KE, Friborg J, Kong WP, Woffendin C, Polverini PJ, Nickoloff BJ, Nabel GJ. Propagation of a human herpesvirus from AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med.* 1997 Jan 16;336(3):163-71.
- Friborg J, Kong W, Hottiger MO, Nabel GJ. p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature.* 1999 Dec 23-30;402(6764):889-94.
- Gallo RC. Some aspects of the pathogenesis of HIV-1-associated Kaposi's sarcoma. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1998;(23):55-7. Review.
- Gao SJ, Boshoff C, Jayachandra S, Weiss RA, Chang Y, Moore PS. KSHV ORF K9 (vIRF) is an oncogene which inhibits the interferon signaling pathway. *Oncogene.* 1997 Oct 16;15(16):1979-85.
- Gao SJ, Kingsley L, Hoover DR, Spira TJ, Rinaldo CR, Saah A, Phair J, Detels R, Parry P, Chang Y, Moore PS. Seroconversion to antibodies against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-related latent nuclear antigens before the development of Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med.* 1996 Jul 25;335(4):233-41.

Gao SJ, Kingsley L, Li M, Zheng W, Parravicini C, Ziegler J, Newton R, Rinaldo CR, Saah A, Phair J, Detels R, Chang Y, Moore PS. KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. *Nat Med*. 1996 Aug;2(8):925-8.

Gessain A, Maucelere P, van Beveren M, Plancoulaine S, Ayouba A, Essame-Oyono JL, Martin PM, de The G. Human herpesvirus 8 primary infection occurs during childhood in Cameroon, Central Africa. *Int J Cancer*. 1999 Apr 12;81(2):189-92.

Giraldo G, Beth E, Haguenu F. Herpes-type virus particles in tissue culture of Kaposi's sarcoma from different geographic regions. *J Natl Cancer Inst*. 1972 Dec;49(6):1509-26.

Godden-Kent D, Talbot SJ, Boshoff C, Chang Y, Moore P, Weiss RA, Mittnacht S. The cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus stimulates cdk6 to phosphorylate the retinoblastoma protein and histone H1. *J Virol*. 1997 Jun;71(6):4193-8.

Guo HG, Browning P, Nicholas J, Hayward GS, Tschachler E, Jiang YW, Sadowska M, Raffeld M, Colombini S, Gallo RC, Reitz MS. Characterization of a chemokine receptor-related gene in human herpesvirus 8 and its expression in Kaposi's sarcoma. *Virology*. 1997 Feb 17;228(2):371-8.

Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, Dixit VM. I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1997 Jul 11;272(28):17255-7.

Huang YQ, Li JJ, Kaplan MH, Poiesz B, Katabira E, Zhang WC, Feiner D, Friedman-Kien AE. Human herpesvirus-like nucleic acid in various forms of Kaposi's sarcoma. *Lancet*. 1995 Mar 25;345(8952):759-61.

Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 1997 Jul 10;388(6638):190-5.

Jones RR, Spaul J, Spry C, Jones EW. Histogenesis of Kaposi's sarcoma in patients with and without acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *J Clin Pathol*. 1986 Jul;39(7):742-9.

Judde JG, Lacoste V, Briere J, Kassa-Kelembho E, Clyti E, Couppie P, Buchrieser C, Tulliez M, Morvan J, Gessain A. Monoclonality or oligoclonality of human herpesvirus 8 terminal repeat sequences in Kaposi's sarcoma and other diseases. *J Natl Cancer Inst*. 2000 May 3;92(9):729-36.

Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T. High expression of HHV-8-encoded ORF73 protein in spindle-shaped cells of Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol*. 1999 Jul;155(1):47-52.

Kedes DH, Lagunoff M, Renne R, Ganem D. Identification of the gene encoding the major latency-associated nuclear antigen of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Clin Invest*. 1997 Nov 15;100(10):2606-10.

Kedes DH, Operskalski E, Busch M, Kohn R, Flood J, Ganem D. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nat Med*. 1996 Aug;2(8):918-24.

Kellam P, Boshoff C, Whitby D, Matthews S, Weiss RA, Talbot SJ. Identification of a major latent nuclear antigen, LNA-1, in the human herpesvirus 8 genome. *J Hum Virol*. 1997 Nov-Dec;1(1):19-29.

Koelle DM, Huang ML, Chandran B, Vieira J, Piepkorn M, Corey L. Frequent detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in saliva of human immunodeficiency virus-infected men: clinical and immunologic correlates. *J Infect Dis*. 1997 Jul;176(1):94-102.

Kowalzyk L, Hoffmann I, Neipel F, Walter H, Schlehaider UK, Ponnighaus JM. Detection of HHV-8 DNA in a German patient with classical Kaposi's sarcoma may allow an estimation of the incubation period. *Eur J Dermatol.* 1998 Sep;8(6):432-4.

Krithivas A, Young DB, Liao G, Greene D, Hayward SD. Human herpesvirus 8 LANA interacts with proteins of the mSin3 corepressor complex and negatively regulates Epstein-Barr virus gene expression in dually infected PEL cells. *J Virol.* 2000 Oct;74(20):9637-45.

LaDuca JR, Love JL, Abbott LZ, Dube S, Freidman-Kien AE, Poiesz BJ. Detection of human herpesvirus 8 DNA sequences in tissues and bodily fluids. *J Infect Dis.* 1998 Dec;178(6):1610-5.

Lagunoff M, Ganem D. The structure and coding organization of the genomic termini of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Virology.* 1997 Sep 15;236(1):147-54.

Lampinen TM, Kulasingam S, Min J, Borok M, Gwanzura L, Lamb J, Mahomed K, Woelk GB, Strand KB, Bosch ML, Edelman DC, Constantine NT, Katzenstein D, Williams MA. Detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in oral and genital secretions of Zimbabwean women. *J Infect Dis.* 2000 May;181(5):1785-90.

Lang D, Hinderer W, Rothe M, Sonneborn HH, Neipel F, Raab M, Rabenau H, Masquelier B, Fleury H. Comparison of the immunoglobulin-G-specific seroreactivity of different recombinant antigens of the human herpesvirus 8. *Virology.* 1999 Jul 20;260(1):47-54.

Lebbe C, Pellet C, Flageul B, Sastre X, Avril MF, Bonvalet D, Morel P, Calvo F. Sequences of human herpesvirus 8 are not detected in various non-Kaposi sarcoma vascular lesions. *Arch Dermatol.* 1997 Jul;133(7):919-20.

Lennette ET, Blackbourn DJ, Levy JA. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet.* 1996 Sep 28;348(9031):858-61.

Li JJ, Huang YQ, Cockerell CJ, Friedman-Kien AE. Localization of human herpes-like virus type 8 in vascular endothelial cells and perivascular spindle-shaped cells of Kaposi's sarcoma lesions by in situ hybridization. *Am J Pathol.* 1996 Jun;148(6):1741-8.

Li M, Lee H, Yoon DW, Albrecht JC, Fleckenstein B, Neipel F, Jung JU. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin. *J Virol.* 1997 Mar;71(3):1984-91.

Li M, MacKey J, Czajak SC, Desrosiers RC, Lackner AA, Jung JU. Identification and characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K8.1 virion glycoprotein. *J Virol.* 1999 Feb;73(2):1341-9.

Lim C, Sohn H, Gwack Y, Choe J. Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) binds ATF4/CREB2 and inhibits its transcriptional activation activity. *J Gen Virol.* 2000 Nov;81 Pt 11:2645-52.

Lin SF, Sun R, Heston L, Gradoville L, Shedd D, Haglund K, Rigsby M, Miller G. Identification, expression, and immunogenicity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded small viral capsid antigen. *J Virol.* 1997 Apr;71(4):3069-76.

Luppi M, Barozzi P, Santagostino G, Trovato R, Schulz TF, Marasca R, Bottalico D, Bignardi L, Torelli G. Molecular evidence of organ-related transmission of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus or human herpesvirus-8 in transplant patients. *Blood.* 2000 Nov 1;96(9):3279-81.

- Manns A, Strickler HD, Hanchard B, Manassaram DM, Waters D, Ablashi DV. Age- and sex-specific seroprevalence of human herpesvirus 8 in Jamaica. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Jul 15;90(14):1102-4. No abstract available.
- Marcelin AG, Dupin N, Bossi P, Calvez V. Seroprevalence of human herpesvirus-8 in healthy subjects and patients with AIDS-associated and classical Kaposi's sarcoma in France. *AIDS.* 1998 Mar 26;12(5):539-40. No abstract available.
- Marchioli CC, Love JL, Abbott LZ, Huang YQ, Remick SC, Surtento-Reodica N, Hutchison RE, Mildvan D, Friedman-Kien AE, Poiesz BJ. Prevalence of human herpesvirus 8 DNA sequences in several patient populations. *J Clin Microbiol.* 1996 Oct;34(10):2635-8.
- Martin JN, Ganem DE, Osmond DH, Page-Shafer KA, Macrae D, Kedes DH. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *N Engl J Med.* 1998 Apr 2;338(14):948-54.
- Mayama S, Cuevas LE, Sheldon J, Omar OH, Smith DH, Okong P, Silvel B, Hart CA, Schulz TF. Prevalence and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in Ugandan children and adolescents. *Int J Cancer.* 1998 Sep 11;77(6):817-20.
- Melbye M, Cook PM, Hjalgrim H, Begtrup K, Simpson GR, Biggar RJ, Ebbesen P, Schulz TF. Risk factors for Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) seropositivity in a cohort of homosexual men, 1981-1996. *Int J Cancer.* 1998 Aug 12;77(4):543-8.
- Miles SA, Rezai AR, Salazar-Gonzalez JF, Vander Meyden M, Stevens RH, Logan DM, Mitsuyasu RT, Taga T, Hirano T, Kishimoto T, et al. AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jun;87(11):4068-72.
- Monini P, de Lellis L, Fabris M, Rigolin F, Cassai E. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA sequences in prostate tissue and human semen. *N Engl J Med.* 1996 May 2;334(18):1168-72.
- Moses AV, Fish KN, Ruhl R, Smith PP, Strussenberg JG, Zhu L, Chandran B, Nelson JA. Long-term infection and transformation of dermal microvascular endothelial cells by human herpesvirus 8. *J Virol.* 1999 Aug;73(8):6892-902.
- Muralidhar S, Pumfery AM, Hassani M, Sadaie MR, Kishishita M, Brady JN, Doniger J, Medveczky P, Rosenthal LJ. Identification of kaposin (open reading frame K12) as a human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) transforming gene. *J Virol.* 1998 Jun;72(6):4980-8.
- Nair BC, DeVico AL, Nakamura S, Copeland TD, Chen Y, Patel A, O'Neil T, Oroszlan S, Gallo RC, Sarngadharan MG. Identification of a major growth factor for AIDS-Kaposi's sarcoma cells as oncostatin M. *Science.* 1992 Mar 13;255(5050):1430-2.
- Nicholas J, Zong JC, Alcendor DJ, Ciufo DM, Poole LJ, Sarisky RT, Chiou CJ, Zhang X, Wan X, Guo HG, Reitz MS, Hayward GS. Novel organizational features, captured cellular genes, and strain variability within the genome of KSHV/HHV8. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1998;(23):79-88.
- Niepel F, Albrecht JC, Fleckenstein B. Human herpesvirus 8-the first human rhadinovirus. *Monogr Natl Cancaer Inst.* 1998; 23:73-77.
- Olsen SJ, Sarid R, Chang Y, Moore PS. Evaluation of the latency-associated nuclear antigen (ORF73) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by peptide mapping and bacterially expressed recombinant western blot assay. *J Infect Dis.* 2000 Jul;182(1):306-10.
- Parravicini C, Chandran B, Corbellino M, Berti E, Paulli M, Moore PS, Chang Y. Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases: Kaposi's sarcoma,

primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease. *Am J Pathol.* 2000 Mar;156(3):743-9.

Parravicini C, Olsen SJ, Capra M, Poli F, Sirchia G, Gao SJ, Berti E, Nocera A, Rossi E, Bestetti G, Pizzuto M, Galli M, Moroni M, Moore PS, Corbellino M. Risk of Kaposi's sarcoma-associated herpes virus transmission from donor allografts among Italian posttransplant Kaposi's sarcoma patients. *Blood.* 1997 Oct 1;90(7):2826-9.

Parravinci C, Corbellino M, Paulli M, Magrini U, Lazzarino M, Moore PS, Chang Y. Expression of a virus-derived cytokine, KSHV vIL-6, in HIV-seronegative Castleman's disease. *Am J Pathol.* 1997 Dec;151(6):1517-22.

Pau CP, Lam LL, Spira TJ, Black JB, Stewart JA, Pellett PE, Respass RA. Mapping and serodiagnostic application of a dominant epitope within the human herpesvirus 8 ORF 65-encoded protein. *J Clin Microbiol.* 1998 Jun;36(6):1574-7.

Pauk J, Huang ML, Brodie SJ, Wald A, Koelle DM, Schacker T, Celum C, Selke S, Corey L. Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men. *N Engl J Med.* 2000 Nov 9;343(19):1369-77.

Platt GM, Simpson GR, Mitnacht S, Schulz TF. Latent nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with RING3, a homolog of the *Drosophila* female sterile homeotic (fsh) gene. *J Virol.* 1999 Dec;73(12):9789-95.

Poole LJ, Zong JC, Ciufo DM, Alcendor DJ, Cannon JS, Ambinder R, Orenstein JM, Reitz MS, Hayward GS. Comparison of genetic variability at multiple loci across the genomes of the major subtypes of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reveals evidence for recombination and for two distinct types of open reading frame K15 alleles at the right-hand end. *J Virol.* 1999 Aug;73(8):6646-60.

Raab MS, Albrecht JC, Birkmann A, Yaguboglu S, Lang D, Fleckenstein B, Neipel F. The immunogenic glycoprotein gp35-37 of human herpesvirus 8 is encoded by open reading frame K8.1. *J Virol.* 1998 Aug;72(8):6725-31.

Rabkin CS, Janz S, Lash A, Coleman AE, Musaba E, Liotta L, Biggar RJ, Zhuang Z. Monoclonal origin of multicentric Kaposi's sarcoma lesions. *N Engl J Med.* 1997 Apr 3;336(14):988-93

Rabkin CS, Schulz TF, Whitby D, Lennette ET, Magpantay LI, Chatlynne L, Biggar RJ. Interassay correlation of human herpesvirus 8 serologic tests. HHV-8 Interlaboratory Collaborative Group. *J Infect Dis.* 1998 Aug;178(2):304-9.

Radkov SA, Kellam P, Boshoff C. The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. *Nat Med.* 2000 Oct;6(10):1121-7.

Rady PL, Yen A, Martin RW, Nedelcu I, Hughes TK, Tyring SK. Herpesvirus-like DNA sequences in classic Kaposi's sarcomas. *J Med Virol.* 1995 Oct;47(2):179-83.

Rainbow L, Platt GM, Simpson GR, Sarid R, Gao SJ, Stoiber H, Herrington CS, Moore PS, Schulz TF. The 222- to 234-kilodalton latent nuclear protein (LNA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) is encoded by orf73 and is a component of the latency-associated nuclear antigen. *J Virol.* 1997 Aug;71(8):5915-21.

- Reed JA, Nador RG, Spaulding D, Tani Y, Cesarman E, Knowles DM. Demonstration of Kaposi's sarcoma-associated herpes virus cyclin D homolog in cutaneous Kaposi's sarcoma by colorimetric in situ hybridization using a catalyzed signal amplification system. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3825-32.
- Regamey N, Cathomas G, Schwager M, Wernli M, Harr T, Erb P. High human herpesvirus 8 seroprevalence in the homosexual population in Switzerland. *J Clin Microbiol*. 1998 Jun;36(6):1784-6.
- Regamey N, Tamm M, Wernli M, Witschi A, Thiel G, Cathomas G, Erb P. Transmission of human herpesvirus 8 infection from renal-transplant donors to recipients. *N Engl J Med*. 1998 Nov 5;339(19):1358-63.
- Renne R, Barry C, Dittmer D, Compitello N, Brown PO, Ganem D. Modulation of cellular and viral gene expression by the latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol*. 2001 Jan;75(1):458-68.
- Renne R, Lagunoff M, Zhong W, Ganem D. The size and conformation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in infected cells and virions. *J Virol*. 1996 Nov;70(11):8151-4.
- Renne R, Zhong W, Herndier B, McGrath M, Abbey N, Kedes D, Ganem D. Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. *Nat Med*. 1996 Mar;2(3):342-6.
- Rivas C, Thlick AE, Parravicini C, Moore PS, Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA2 is a B-cell-specific latent viral protein that inhibits p53. *J Virol*. 2001 Jan;75(1):429-38.
- Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, Parry JP, Peruzzi D, Edelman IS, Chang Y, Moore PS. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 10;93(25):14862-7.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989.
- Schwam DR, Luciano RL, Mahajan SS, Wong L, Wilson AC. Carboxy terminus of human herpesvirus 8 latency-associated nuclear antigen mediates dimerization, transcriptional repression, and targeting to nuclear bodies. *J Virol*. 2000 Sep;74(18):8532-40.
- Simonart T, Noel JC, Van Vooren JP, De Dobbeleer G. Classic Kaposi's sarcoma after multiple-partner heterosexual behavior in Central Africa. *J Am Acad Dermatol*. 1999 Oct;41(4):648-9.
- Simpson GR, Schulz TF, Whitby D, Cook PM, Boshoff C, Rainbow L, Howard MR, Gao SJ, Bohenzky RA, Simmonds P, Lee C, de Ruiter A, Hatzakis A, Tedder RS, Weller IV, Weiss RA, Moore PS. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet*. 1996 Oct 26;348(9035):1133-8.
- Sitas F, Carrara H, Beral V, Newton R, Reeves G, Bull D, Jentsch U, Pacella-Norman R, Bourboullia D, Whitby D, Boshoff C, Weiss R. Antibodies against human herpesvirus 8 in black South African patients with cancer. *N Engl J Med*. 1999 Jun 17;340(24):1863-71.
- Smith MS, Bloomer C, Horvat R, Goldstein E, Casparian JM, Chandran B. Detection of human herpesvirus 8 DNA in Kaposi's sarcoma lesions and peripheral blood of human immunodeficiency virus-positive patients and correlation with serologic measurements. *J Infect Dis*. 1997 Jul;176(1):84-93.

Sosa C, Klaskala W, Chandran B, Soto R, Sieczkowski L, Wu MH, Baum M, Wood C. Human herpesvirus 8 as a potential sexually transmitted agent in Honduras. *J Infect Dis.* 1998 Aug;178(2):547-51.

Soulier J, Grollet L, Oksenhendler E, Cacoub P, Cazals-Hatem D, Babinet P, d'Agay MF, Clauvel JP, Raphael M, Degos L, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castlemans disease. *Blood.* 1995 Aug 15;86(4):1276-80.

Sozzani S, Luini W, Bianchi G, Allavena P, Wells TN, Napolitano M, Bernardini G, Vecchi A, D'Ambrosio D, Mazzeo D, Sinigaglia F, Santoni A, Maggi E, Romagnani S, Mantovani A. The viral chemokine macrophage inflammatory protein-II is a selective Th2 chemoattractant. *Blood.* 1998 Dec 1;92(11):4036-9.

Spira TJ, Lam L, Dollard SC, Meng YX, Pau CP, Black JB, Burns D, Cooper B, Hamid M, Huong J, Kite-Powell K, Pellett PE. Comparison of serologic assays and PCR for diagnosis of human herpesvirus 8 infection. *J Clin Microbiol.* 2000 Jun;38(6):2174-80.

Staskus KA, Sun R, Miller G, Racz P, Jaslowski A, Metroka C, Brett-Smith H, Haase AT. Cellular tropism and viral interleukin-6 expression distinguish human herpesvirus 8 involvement in Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castlemans disease. *J Virol.* 1999 May;73(5):4181-7.

Stine JT, Wood C, Hill M, Epp A, Raport CJ, Schweickart VL, Endo Y, Sasaki T, Simmons G, Boshoff C, Clapham P, Chang Y, Moore P, Gray PW, Chantry D. KSHV-encoded CC chemokine vMIP-III is a CCR4 agonist, stimulates angiogenesis, and selectively chemoattracts TH2 cells. *Blood.* 2000 Feb 15;95(4):1151-7.

Sturzl M, Ascherl G, Blasig C, Opalenik SR, Ensoli B, Browning PJ. Expression of the human herpesvirus 8-encoded viral macrophage inflammatory protein-1 gene in Kaposi's sarcoma lesions. *AIDS.* 1998 Jun 18;12(9):1105-6.

Sturzl M, Blasig C, Schreier A, Neipel F, Hohenadl C, Cornali E, Ascherl G, Esser S, Brockmeyer NH, Ekman M, Kaaya EE, Tschachler E, Biberfeld P. Expression of HHV-8 latency-associated T0.7 RNA in spindle cells and endothelial cells of AIDS-associated, classical and African Kaposi's sarcoma. *Int J Cancer.* 1997 Jul 3;72(1):68-71.

Sturzl M, Hohenadl C, Zietz C, Castanos-Velez E, Wunderlich A, Ascherl G, Biberfeld P, Monini P, Browning PJ, Ensoli B. Expression of K13/v-FLIP gene of human herpesvirus 8 and apoptosis in Kaposi's sarcoma spindle cells. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Oct 20;91(20):1725-33.

Sturzl M, Wunderlich A, Ascherl G, Hohenadl C, Monini P, Zietz C, Browning PJ, Neipel F, Biberfeld P, Ensoli B. Human herpesvirus-8 (HHV-8) gene expression in Kaposi's sarcoma (KS) primary lesions: an in situ hybridization study. *Leukemia.* 1999 Apr;13 Suppl 1:S110-2.

Swanton C, Mann DJ, Fleckenstein B, Neipel F, Peters G, Jones N. Herpes viral cyclin/Cdk6 complexes evade inhibition by CDK inhibitor proteins. *Nature.* 1997 Nov 13;390(6656):184-7.

Tanner J, Weis J, Fearon D, Whang Y, Kieff E. Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell.* 1987 Jul 17;50(2):203-13.

Tedeschi R, De Paoli P, Schulz TF, Dillner J. Human serum antibodies to a major defined epitope of human herpesvirus 8 small viral capsid antigen. *J Infect Dis.* 1999 Apr;179(4):1016-20.

- Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*. 1997 Apr 3;386(6624):517-21.
- Thorley-Lawson DA, Geilinger K. Monoclonal antibodies against the major glycoprotein (gp350/220) of Epstein-Barr virus neutralize infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Sep;77(9):5307-11.
- van Grunsven WM, Spaan WJ, Middeldorp JM. Localization and diagnostic application of immunodominant domains of the BFRF3-encoded Epstein-Barr virus capsid protein. *J Infect Dis*. 1994 Jul;170(1):13-9.
- van Grunsven WM, van Heerde EC, de Haard HJ, Spaan WJ, Middeldorp JM. Gene mapping and expression of two immunodominant Epstein-Barr virus capsid proteins. *J Virol*. 1993 Jul;67(7):3908-16.
- Vieira J, Huang ML, Koelle DM, Corey L. Transmissible Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in saliva of men with a history of Kaposi's sarcoma. *J Virol*. 1997 Sep;71(9):7083-7.
- Walter PR, Philippe E, Nguemby-Mbina C, Chamlian A. Kaposi's sarcoma: presence of herpes-type virus particles in a tumor specimen. *Hum Pathol*. 1984 Dec;15(12):1145-6.
- Wang GH, Bertin J, Wang Y, Martin DA, Wang J, Tomaselli KJ, Armstrong RC, Cohen JI. Bovine herpesvirus 4 BORFE2 protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor receptor 1-induced apoptosis and contains death effector domains shared with other gamma-2 herpesviruses. *J Virol*. 1997 Nov;71(11):8928-32.
- Whitby D, Howard MR, Tenant-Flowers M, Brink NS, Copas A, Boshoff C, Hatzioannou T, Suggett FE, Aldam DM, Denton AS, et al. Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet*. 1995 Sep 23;346(8978):799-802.
- Whitby D, Luppi M, Barozzi P, Boshoff C, Weiss RA, Torelli G. Human herpesvirus 8 seroprevalence in blood donors and lymphoma patients from different regions of Italy. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Mar 4;90(5):395-7. No abstract available.
- Whitby D, Luppi M, Sabin C, Barozzi P, Di Biase AR, Balli F, Cucci F, Weiss RA, Boshoff C, Torelli G. Detection of antibodies to human herpesvirus 8 in Italian children: evidence for horizontal transmission. *Br J Cancer*. 2000 Feb;82(3):702-4.
- Winkler IG., Lochelt M, Levesque JP, Bodem J, Flugel RM, Flower RL. A rapid streptavidin-capture ELISA specific for the detection of antibodies to feline foamy virus. *J. Immunol. Methods*. 1997, 207:69-77.
- Yang TY, Chen SC, Leach MW, Manfra D, Homey B, Wiekowski M, Sullivan L, Jenh CH, Narula SK, Chensue SW, Lira SA. Transgenic expression of the chemokine receptor encoded by human herpesvirus 8 induces an angioproliferative disease resembling Kaposi's sarcoma. *J Exp Med*. 2000 Feb 7;191(3):445-54.
- Zalla MJ. Kaposi's sarcoma. An Update. *Dermatol Surg*. 1996 Mar;22(3):274-87. Review.
- Zhang YM, Bachmann S, Hemmer C, van Lunzen J, von Stemm A, Kern P, Dietrich M, Ziegler R, Waldherr R, Nawroth PP. Vascular origin of Kaposi's sarcoma. Expression of leukocyte adhesion molecule-1, thrombomodulin, and tissue factor. *Am J Pathol*. 1994 Jan;144(1):51-9

Zhu L, Puri V, Chandran B. Characterization of human herpesvirus-8 K8.1A/B glycoproteins by monoclonal antibodies. *Virology*. 1999 Sep 15;262(1):237-49.

Zhu L, Wang R, Sweat A, Goldstein E, Horvat R, Chandran B. Comparison of human sera reactivities in immunoblots with recombinant human herpesvirus (HHV)-8 proteins associated with the latent (ORF73) and lytic (ORFs 65, K8.1A, and K8.1B) replicative cycles and in immunofluorescence assays with HHV-8-infected BCBL-1 cells. *Virology*. 1999 Apr 10;256(2):381-92.

Zong JC, Ciufo DM, Alcendor DJ, Wan X, Nicholas J, Browning PJ, Rady PL, Tying SK, Orenstein JM, Rabkin CS, Su IJ, Powell KF, Crosson M, Foreman KE, Nickoloff BJ, Alkan S, Hayward GS. High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations. *J Virol*. 1999 May;73(5):4156-70.

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezésben felhasznált közlemények:

1.

A Juhász, É Remenyik, K Szarka, G Veress, J Hunyadi, L Gergely.: *Consistent PCR-SSCP pattern of HHV-8 in the course of classical Kaposi's sarcoma assumes its clonal origin*, Journal of Medical Virology, 1998/54:300-304, **IF: 2,867**

2.

A Juhász, É Remenyik, J Hunyadi, L Gergely.: *Humán herpeszvírus-8 specifikus antitestek előfordulása magyar véradókban és Kaposi-sarcomás betegekben*, Orvosi Hetilap, 1998/139:3001-3004,

3.

A Juhász, É Remenyik, J Kónya, G veress, Á Bégány, I Andirkó, I Medgyessy, J Hunyadi, L Gergely: *Prevalence and age distribution of human herpesvirus-8 specific antibodies in Hungarian blood donors*, Journal of Medical Virology, 2001/64:526-30, **IF: 2,867**

4.

A Juhász, J Kónya, Z Beck, É Remenyik, G Veress, Á Bégány, I Medgyessy, J Hunyadi, L Gergely.: *HHV-8 ELISA based on one step affinity capture of biotinylated K8.1 antigen*, Journal of Virological Methods, 2001/94:163-72, **IF: 1,417**

Egyéb közlemények:

1.

L Szekely, Cs Kiss, K Mattsson, E Kashuba, K Pokrovskaja, **A Juhász,** P Holmvall and G Klein: *Human herpesvirus-8-encoded LNA-1 accumulates in heterochromatin-associated nuclear bodies*, Journal of General Virology, 1999/80:2889-2900

2.

J Kónya, G Veress, **A Juhász,** K Szarka, T Sápy, Z Hernádi and L Gergely: *Additional human papillomavirus types detected by the hybrid capture tube test among samples from women with cytological and colposcopic atypia*, Journal of Clinical Microbiology, 2000/38:408-411

3.

K Szarka, G Veress, **A Juhász,** J Kónya, T Sápy, G Soós, Z Hernádi and L Gergely: *Integration status of virus DNA and p53 codon 72 polymorphism in human papillomavirus type 16 positive cervical cancers*, Anticancer Research, 2000/20:2161-2168

4.

Czeglédy, J., Major, T., **Juhász, A.,** Gergely, L.: *Humán papillomavírus génszakaszok kimutatása laryngealis daganatokban és praemalignus elváltozásokban polimeráz láncreakcióval*. Orvosi Hetilap, 1997/138:1891-1895