

**A PLACENTA MACROPHAGOK SZEREPÉNEK *IN VITRO*
VIZSGÁLATA A HUMÁN CYTOMEGALOVÍRUS ÉS A
HUMÁN IMMUNDEFICIENCIA VÍRUS 1. TÍPUSA
VERTIKÁLIS ÁTVITELÉBEN**

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Bácsi Attila

Témavezető: Prof. Dr. D. Tóth Ferenc

DEBRECENI EGYETEM
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Orvosi Mikrobiológiai Intézet
2001.

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	4.
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7.
A HCMV virion szerkezete	7.
A HCMV szaporodási ciklusa	7.
<i>A citokinek hatása a HCMV replikációjára</i>	8.
A HCMV vertikális átvitele	9.
<i>Kongenitális HCMV fertőzések</i>	9.
<i>A kongenitális fertőzéseket befolyásoló tényezők</i>	10.
A HIV-1 virion felépítése	10.
A HIV-1 replikációs ciklusa	11.
<i>A citokinek hatása a HIV-1 szaporodására</i>	12.
A HIV vertikális terjedése	13.
<i>A magzat méhen belüli fertőződése</i>	14.
<i>A vertikális átvitelt befolyásoló tényezők</i>	15.
A placenta macrophagok (Hofbauer sejtek)	16.
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	17.
Vírusok	17.
HCMV titrálása	17.
HIV titrálása	18.
<i>A virionok reverz transzkriptáz aktivitásának mérése</i>	18.
<i>Vírusspecifikus p24 antigén mennyiségi meghatározása ELISA módszerrel</i>	19.
<i>Az infektív HIV titerének meghatározása syncytiumképzés alapján</i>	19.
Cytotrophoblastok és macrophagok (Hofbauer sejtek) szeparálása, tenyésztése	20.
<i>A cytotrophoblast sejtek szeparálása</i>	20.
<i>A macrophagok kinyerése</i>	21.
A monocyta eredetű macrophagok szeparálása és tenyésztése	22.
Sejtvonalak	22.
Syncytiotrophoblastok fertőzése HCMV-vel	22.
A pszeidotípus vírusok előállítása	23.
A pszeidotípus vírusok titrálása	23.
A syncytiotrophoblastok fertőzése VSV-vel és VSV(HIV-1) pszeidotípusokkal	24.
Syncytiotrophoblastok fertőzése HIV-1_{Ba-L}-lal	24.
Kokultiváció	24.
Immunszérumok és konjugátumok	25.
Immunfluoreszcens technikák (IFA)	25.
Citokintermelés vizsgálata	26.

EREDMÉNYEK	27.
A HCMV szaporodásának vizsgálata fertőzött syncytiotrophoblastok és placenta macrophagok kokultivált tenyészetében	27.
A HCMV IE és pp65 fehérjéinek expressziója	27.
A citokintermelés vizsgálata a fertőzetlen, a HCMV-vel fertőzött és a kokultivált sejttenyészetekben	28.
A citokineket blokkoló ellenanyagok hatása a HCMV szaporodására a kokultivált tenyészetekben	29.
A VSV fertőzőképességének vizsgálata syncytiotrophoblast sejteken	29.
VSV(HIV-1) pszeidotípusok előállítása	30.
VSV(HIV-1) pszeidotípusok fertőzőképességének vizsgálata syncytiotrophoblast sejteken	30.
HIV-1 burokantigének szerepének vizsgálata a VSV(HIV-1 _{Ba-L}) és VSV(HIV-1 _{IIIb}) syncytiotrophoblastba való bejutásában	31.
A penetráció mechanizmusának vizsgálata syncytiotrophoblast sejteken VSV(HIV-1 _{Ba-L}) és VSV(HIV-1 _{IIIb}) pszeidotípusokkal történő fertőzés esetén	31.
HIV-1 termelés vizsgálata fertőzött syncytiotrophoblastokban és kokultivált sejtek tenyészetében	32.
A HIV-1 Tat és p24 fehérjék kimutatása a sejt kultúrákban	33.
A citokintermelés vizsgálata fertőzetlen, HIV-fertőzött és kokultivált sejttenyészetekben	33.
A citokineket blokkoló ellenanyagok hatása a HIV-1 replikációjára a kokultivált tenyészetekben	35.
MEGBESZÉLÉS	36.
ÖSSZEFOGLALÁS	42.
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	43.
IRODALOMJEGYZÉK	44.
KÖZLEMÉNYEK	62.
FONTOSABB ELŐADÁSOK, POSZTEREK	64.

BEVEZETÉS

A magzat méhen belüli fertőződése fontos módja a humán cytomegalovírus (HCMV) és a humán immundeficiencia vírus 1. típusa (HIV-1) vertikális terjedésének. A vírusok placentán való átjutásának mechanizmusa jórészt ismeretlen.

A placenta syncytiotrophoblast sejtjei (ST) - melyek folytonos, sokmagvú hámréteget alkotnak - közvetlenül érintkeznek az anyai vérrel és szelektív barriert képeznek az anya és a magzat között [Enders, 1989]. A vírusoknak át kell jutniuk a syncytiotrophoblast rétegen ahhoz, hogy elérjék a mélyebben fekvő cytotrophoblast sejteket, placenta macrophagokat (Hofbauer sejtek), fibroblastokat, illetve a magzati kapillárisokat szegélyező endothel sejteket.

Bár a syncytiotrophoblast rétegben HIV-1-specifikus provirális DNS-t *in situ* többen is kimutattak [Lewis et al., 1990; Chandwani et al., 1991; Backé et al., 1992], nem tisztázott, hogy a trophoblastok fertőzése sejtmentes víruspartikulákkal megtörténhet-e. Több *in vitro* vizsgálat azt igazolta, hogy a syncytiotrophoblast sejtek megfertőzhetők laboratóriumi HIV-1 törzsekkel [Mano és Chermann, 1991; Zachar et al., 1991a; Tóth et al., 1995]. Más kutatók [Bourinbaiar és Nagorny, 1993; Kilani et al., 1997] nem tudták bizonyítani a trophoblastok sejtmentes vírussal való fertőzhetőségét. Véleményük szerint a syncytiotrophoblastok HIV-1 fertőzése csak sejt-sejt kölcsönhatás révén valósulhat meg.

Az egymásnak ellentmondó eredmények oka lehet, hogy a kísérletekben más-más HIV-1 törzseket használtak, illetve, hogy eltérő módszereket alkalmaztak a vírusfertőzés kimutatására. Kísérleteink során a syncytiotrophoblast sejtek szabad HIV-1 virionokkal történő fertőzésének lehetőségét a vesicularis stomatitis vírus (VSV) pszeudotípusaival kívántuk tisztázni. Ha a HIV-vel krónikusan fertőzött sejteket VSV-vel felülfertőzzük, létrejönnek olyan VSV(HIV-1) pszeudotípusok is, melyek burka retrovirális glikoproteineket hordoz, és így rezisztensek az anti-VSV szérum neutralizáló hatásával szemben [Dalglish et al., 1984]. Ezek a vírusok csak olyan sejtekbe képesek bejutni, melyek rendelkeznek HIV-1-specifikus receptorokkal. A penetráció után a replikáció további szakaszai is végbemennek, és új, nem pszeudotípus (a HIV-1 burokantigének ugyanis nem genetikailag kódoltak a pszeudotípus esetén) VSV virionok jönnek létre. Ezek jól látható citopátiás elváltozást okoznak: a sejtek lekerekednek és elpusztulnak. Így a HIV-1 buroknak a penetrációban betöltött szerepére egyszerűen a VSV által okozott citopátiás hatás alapján következtethetünk.

In situ immunhisztokémiai [Sinzer et al., 1993] és *in vitro* vizsgálatok is kimutatták [Tóth et al., 1995], hogy a HCMV képes megfertőzni az ST sejteket. Nem tisztázott azonban,

hogyan tud a vírus átjutni a syncytiotrophoblast rétegen. Ezekben a sejtekben ugyanis HCMV replikációs ciklusa – a legtöbb megfigyelés szerint – abortív. A fertőzött ST sejtekben általában csak nagyon korai vírusfehérjék mutathatók ki.

Az *in vitro* HCMV-vel, illetve HIV-vel fertőzött syncytiotrophoblast kultúrákban vírusürítés általában nem figyelhető meg, vagy annak mértéke a legjobb esetben is csak igen csekély [Hemmings et al., 1998; Tóth et al., 1995; Zachar et al., 1991b; Fazely et al., 1995]. A trophoblastok *in vivo* produktív fertőzése valószínűleg csak meghatározott feltételek mellett mehet végbe, és különböző kofaktorok befolyásolhatják.

A placenta macrophagok és a syncytiotrophoblastok közötti közvetlen sejt-sejt kölcsönhatások szerepét a HCMV és a HIV-1 vertikális átvitelében még nem tanulmányozták. Ezeknek a kölcsönhatásoknak kiemelt jelentősége lehet, mivel a Hofbauer sejtek a placenta kötőszöveti állományában nagyszámban jelenlévő és mobilis elemek [Goldstein et al., 1988]. *In vivo* és *in vitro* vizsgálatok is igazolják, hogy a HCMV és a HIV-1 is képes megfertőzni ezeket a sejteket [Schwartz et al., 1992; Lewis et al., 1990; Kesson et al., 1993], amelyek tehát vektorai lehetnek a vírus anyáról magzatra való terjedésének.

Több tanulmány számol be arról, hogy különböző sejtek közötti adhezív kölcsönhatás fokozhatja mind a HCMV, mind a HIV-1 replikációját [Waldman et al., 1995; Guetta et al., 1997; Schrier et al., 1993; Rothe et al., 1998]. Kísérleteink során arra voltunk kíváncsiak, hogy a Hofbauer sejtek képesek-e stimulálni a két vírus szaporodását az előzetesen megfertőzött ST sejtekben, illetve a fertőzött syncytiotrophoblastok átadják-e a vírust a szomszédos macrophagoknak. Mivel a közvetlen sejt-sejt kölcsönhatás különböző citokinek képződését indukálja [Takahashi et al., 1996; Parry et al., 1997; Vey et al., 1997], azt feltételeztük, hogy a kokultivált sejtek által termelt citokineknek kulcsszerepe lehet a HCMV és HIV-1 génexpressziójának fokozásában. Ezért megvizsgáltuk, hogy hatással van-e a kokultiváció a syncytiotrophoblastok és a placenta macrophagok citokintermelésére. Amennyiben igen, befolyásolják-e ezek a HCMV és a HIV replikációját.

Az epidemiológiai vizsgálatok alapján a HIV-1 átjutása a magzatba a terhességnek vagy a korai, vagy a késői fázisában történik meg [Blanche et al., 1994; Dabis et al., 1993]. Számos tanulmány közvetett bizonyítékot szolgáltatott arra vonatkozóan, hogy a késői intrauterin fertőződésnek van nagyobb szerepe a HIV-1 transzplacentális átvitelében [Krivine et al., 1992; Luzuriaga et al., 1993]. A HCMV anyáról magzatra való terjedésének valószínűségét nem befolyásolja, hogy a terhesség során mikor fertőződik meg az anya [Stagno et al., 1986].

Ezekből a megfigyelésekből kiindulva a HCMV, valamint a HIV transzplacentális átvitelét modellező kísérleteinkhez szülésből származó placentából szeparáltunk trophoblast és Hofbauer sejteket.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A HCMV virion szerkezete

A humán cytomegalovírus a *Herpesviridae* család *Betaherpesvirinae* alcsaládjába tartozik. A virion átmérője átlagosan 230 nm. A vírusgenom lineáris, kettősszálú DNS, melyet 162 kapszomerből felépülő ikozahedrális kapszid vesz körül. A vírus burokkal is rendelkezik. A burok és a kapszid között foglal helyet az amorf szerkezetű tegument vagy más néven matrix. A víruspartikulában több mint 30 fehérje található. A kapszidot 4 féle protein alkotja (major capsid protein /MCP/, minor capsid protein /mCP/, mCP-binding protein /mC-PB/, és smallest capsid protein /SCP/). A tegument a virion fehérjetömegének 40 %-át tartalmazza. Az itt található proteinek többsége foszforilált (pp), kivételt jelent a HMWP (high-molecular-weight protein) és a hmw-BP (HMWP-binding protein). Ezeknek a fehérjéknek a dekapzidációban és a DNS becsomagolásában lehet szerepe. A tegument főkomponensei a pp65 (lower matrix protein /LM/) és a pp150 (basic phosphoprotein /BPP/), melyek szerepet játszhatnak a virális gének szabályozásában, és befolyásolhatják a gazdasejt anyagcseréjét. A pp71 (upper matrix protein /UM/) is hat a virális gének expressziójára, transzaktivátor funkcióval rendelkezik. A felsoroltakon kívül egyéb matrix proteinek létezéséről is tudunk, de ezek csak kis mennyiségben vannak jelen a virionban, és működésük sem ismert. A burookban legalább 8 glikoproteint (gp) mutattak ki, melyek komplexeket alkotnak. A tüskeszerű nyúlványokban elhelyezkedő glikoproteineknek a fogékony célsejtekbe való penetrációban van szerepe [Gibson, 1996].

A HCMV szaporodási ciklusa

A HCMV nagyon jól szaporodik human fibroblastokban, többnyire ezeket a sejteket szokták használni a vírus tenyésztésére. *In vivo* körülmények között a nyálmirigyek és a vese hámsejtjei, valamint az endothel sejtek is fontos célsejtek. A vér alakos elemei közül a cytomegalovírus a polymorphonuclearis leukocytákat, a monocytákat és a lymphocytákat képes megfertőzni. A virion a sejt felszíni receptorhoz történt kötődés után fúzióval jut be a sejtbe. A kapszid a citoplazmán keresztül a sejtmaghoz transzportálódik. A dekapzidáció után a kiszabaduló DNS genom cirkuláris formát vesz fel és bekerül a sejtmagba. A vírus gének expressziója egy pontosan meghatározott kaszkárendszerben megy végbe. Az időbeli lefolyás szerint nagyon korai (immediate-early; IE), korai (early; E) és késői (late; L) történéseket különböztetünk meg. Az IE gének alpha, az E gének béta, az L gének pedig

gamma fehérjéket kódolnak. Az alpha és béta proteinek zömmel enzimek vagy DNS-kötő fehérjék, a gamma proteinek szinte kivétel nélkül struktúr komponensek. A késői ciklus további két részre osztható aszerint, hogy a génextpresszió a DNS replikáció előtt vagy után megy végbe [Mocarski, 1996].

A virális DNS transzkripcióját a celluláris RNS polimeráz II enzim végzi. A HCMV több olyan enzimet is kódol, melyeknek a DNS szintézisében van szerepe. A DNS a sejtmagban épül be az üres kapszidba. A maturáció a maghártyáról való lefűződés közben történik. A burokkal rendelkező víruspartikulák tubuláris struktúrákon vagy vakuolákon keresztül jutnak ki a sejtől.

A nagyon korai géntermékek közül az IE1 és IE2 fehérjék kulcsfontosságúak. Az IE1 protein autoregulatorikus hatást fejt ki. A korai gének expressziójának indukálásában főleg az IE2 proteinek van szerepe, ezt a hatást az IE1 fehérje általában fokozza. Az IE2 protein heterolog promoterek transzaktiválására is képes. Az *ie2* génről egy olyan rövidebb fehérje is átíródik, mely a szaporodási ciklus késői fázisában játszik szerepet. Az említetteken kívül még legalább 5 további nagyon korai gént írtak le, ezek produktumainak szerepe még nem kellően ismert.

A korai génproduktumok szerepe leginkább a vírus DNS replikációjában és metabolizmusában ismert. A DNS replikációjában a DNS polimeráz, a DNS folyamatos szintézisét biztosító DNS-kötő fehérjék, valamint a helikáz-primáz játszanak szerepet. Vannak még olyan proteinek is, melyek a nukleotid metabolizmusban és a DNS repair-ben fontosak.

A késői struktúr fehérjéket kódoló gének egy részének transzkripciója már a DNS replikációja előtt megkezdődik (gamma₁ proteinek), más késői fehérjék megjelenése viszont a DNS replikáció függvénye (gamma₂ proteinek) [Mocarski, 1996].

A citokinek hatása a HCMV replikációjára

A HCMV szaporodását befolyásoló igen fontos tényezők a különböző citokinek. Az interferon α (IFN- α), interferon- β (IFN- β) és a bázikus fibroblast növekedési faktor (bFGF) gátolja a vírus szaporodását [Cockley és Rapp, 1986; Nakamura et al., 1988; Alami et al., 1993]. Az interleukin-8 (IL-8) stimulatív hatását fibroblastokban [Murayama et al., 1994] és monocytákban [Capobianchi et al., 1997], a transzformáló növekedési faktor β 1 (TGF- β 1) stimulatív hatását pedig fibroblastokban [Alami et al., 1993] figyelték meg. Vannak olyan citokinek is, melyeknek a HCMV-re kifejtett hatása sejttípustól, illetve a sejtek differenciáltsági állapotától függően változik. Az interferon- γ (IFN- γ) fibroblastokban gátolja a HCMV szaporodását [Yamamoto et al., 1987]. A monocytákban differenciálódásuk

elősegítésével stimulálja a replikációs ciklust, míg differenciált macrophagokban egyáltalán nem hat a vírus szaporodására [Söderberg-Nauclér et al., 1997]. A tumor necrosis factor α (TNF- α) szintén elősegíti a monocyták macrophaggá történő differenciálódását, így serkentheti a cytomegalovírus szaporodását, de a macrophagokban végbemenő HCMV replikációra nincs hatással [Söderberg-Nauclér et al., 1997]. A stimulatív hatású citokinek közül az IL-8-at és a TGF- β 1-et a syncytiotrophoblastok [Shimoya et al., 1992; Lysiak et al., 1995] és a macrophagok [Assoian et al., 1987; Ishikawa et al., 1995] is képesek termelni.

A HCMV vertikális átvitele

A humán cytomegalovírus transzplacentális átvitele a leggyakoribb kongenitális vírusfertőzés. Az USA-ban és Európában az újszülöttek 0,2 – 2 %-a fertőzött HCMV-vel, azaz vírus tenyészthető ki a vérükből, vizeletükből és torokváladékukból. A csecsemők további 8 – 60 %-a válik fertőzötté életének első 6 hónapjában, ugyanis a vertikális átvitel nemcsak a terhesség alatt, hanem a szülés során és a szoptatás idején is bekövetkezhet. A fejlett országokban, jó higiéniés és gazdasági körülmények között élő felnőttek között a szeropozitivitás aránya 40 – 80 %, ugyanez a mutató a fejletlen országokban és a rossz körülmények között élők körében 90 – 100 %. [Britt és Alford, 1996].

Kongenitális HCMV fertőzések

Ha egy szeronegatív nőt terhessége alatt HCMV infekció ér, körülbelül 40 %-os valószínűséggel a magzat is megfertőződik. Szeropozitív terhes anyák egy részében – valószínűleg hormonális hatásra – reaktiválódhat a HCMV, az ilyen esetekben azonban a vírus 0,5 %-nál kisebb gyakorisággal jut át a placentán [Stagno et al., 1986; Yow et al., 1988]. Maradandó károsodás a fertőzött magzatok körülbelül 10 %-ában alakul ki, és elsősorban azokban az esetekben, amikor a vírus az anya primer infekciója után jut át a placentán. Reaktivált fertőzés esetén a magzati károsodások vagy hiányoznak, vagy enyhék. A fertőzés a legsúlyosabb esetben a magzat elhalását okozza. A nem halálos kimenetelű, de súlyos klinikai tünetekkel járó cytomegáliás zárványbetegségekre a hepatitis, hepatosplenomegalia, icterus, bőrvérzések, központi idegrendszeri tünetek (szellemi retardáció, microcephalia, encephalitis, intracranialis meszesedés, sükettség, vakság), anaemia és pneumonia jellemzőek. Előfordulhat, hogy az intrauterin fertőzés tünetei nem közvetlenül a születés után láthatók, hanem 4-5 éves korra alakulnak ki, és szellemi visszamaradottságban, súlyos halláskárosodásban, látászavarokban nyilvánulnak meg [Maródi, 1998a].

A kongenitális fertőzéseket befolyásoló tényezők

A tünetekkel járó kongenitális cytomegalovírus fertőzések legnagyobb kockázati tényezője a terhesség alatt bekövetkező primer infekció. A vertikális átvitel valószínűségét nem befolyásolja, hogy a terhesség melyik szakaszában fertőződik meg az anya. A magzati károsodás azonban súlyosabb lehet, ha a méhen belüli fejlődés egy korábbi stádiumában jut át a vírus a placentán [Stagno et al., 1986]. A méhlepényen áthatoló vírus mennyisége és virulenciája is hat természetesen a fertőzés kimenetelére. A primer fertőzést követő anyai ellenanyagválasz és vírus transzplacentális átvitele között szoros összefüggés van. Azokban az anyákban, akik megfertőzik magzatukat, magasabb a HCMV-specifikus ellenanyagok szintje. Ez nem meglepő, ha az ellenanyagválaszt úgy tekintjük, mint a vírus replikációjának egy indirekt mérőeszközét. Ha az anya szervezetében a vírus intenzíven szaporodik, a magzat megfertőződésének kockázata is nagyobb. Epidemiológiai vizsgálatok szerint a vertikális átvitel veszélyét növeli a fiatal anyai életkor, a rossz szociális-gazdasági életkörülmény, és ha az anyának volt korábban valamilyen nemi betegsége [Britt és Alford, 1996].

Nem tisztázott, hogyan tud a HCMV átjutni a syncytiotrophoblast rétegen. Fertőzött anyai sejtek bejuthatnak a placenta stromájába akár az ST barrier sérülésein át, akár az ép syncytiotrophoblastokon keresztül (transzcitózis). *In situ* immunhisztokémiai [Sinzger et al., 1993] és *in vitro* vizsgálatok is igazolták [Tóth et al., 1995], hogy a cytomegalovírus képes megfertőzni az ST sejteket, de a replikációs ciklusa abortív. A fertőzött sejtekben csak nagyon korai és korai vírusfehérjék mutathatók ki. Bizonyos tényezők, például társfertőző vírusok hatására azonban a szaporodási ciklus permisszívvé válhat. Egy *in vitro* kísérlet szerint, ha az ST sejteket először HIV-vel, majd azután HCMV-vel fertőzzük meg, a sejt kultúrák felülűszojában infektív HCMV virionok jelennek meg [Tóth et al., 1995]. Ez az eredmény összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy HIV-fertőzött nőkben nagyobb a kongenitális HCMV fertőzés valószínűsége, mind a primer, mind a reaktiválódó HCMV infekció esetén [Cooper et al., 1992].

A HIV-1 virion felépítése

A humán immundeficiencia vírus a *Retroviridae* víruscsalád *Lentivirus* genusába tartozik. A sejtmentes vírus (virion) átlagosan 100 nm átmérőjű, gömb alakú partikula, melyet kettős lipidrétegből álló burok vesz körül. Az RNS genomot tartalmazó központi rész (nukleoid) a lentivírusokra jellemző módon kúp vagy henger alakú. Minden virion két genomális RNS molekulát tartalmaz (duplovírus). A virionban hat struktúrfehérje, három enzim és három regulátor fehérje található. A burkon belüli kapszid tartalmazza a

nukleinsavat és a polipeptid természetű fehérjét. A nukleokapszid fehérje (p7, NC), a reverz transzkriptáz (p66/p51, RT) és az integráz enzim (p32, IN) a genomiális RNS-hez kötődik. Ezzel a belső maggal állnak összefüggésben a Vif (p23) és Nef (p27) regulátor fehérjék, de pontos lokalizációjuk egyelőre ismeretlen. A szintén regulátor funkciójú Vpr (p15) protein valószínűleg a belső komplexen kívül található. A Vpr a p6 struktúrfehérjéhez kötődik. Az RNS-nukleokapszid komplexet a p24 kapszid (CA) protein veszi körül, ez a polipeptid a HIV fő struktúrkomponense. A CA fehérjén kívül található a proteáz enzim (p10, PR). A kapszid és a burok között helyezkedik el a matrix (p17, MA) protein. A virion felszínét 72 nyúlvány alkotja. A felszíni glikoprotein (gp120, SU) fogantyú alakú, melyet a transzmembrán (gp41, TM) glikoprotein rögzít a virion burkához [Luciw, 1996; Freed, 1998].

A HIV-1 replikációs ciklusa

A HIV-1 szaporodásának első lépéseként a virion adszorpciója és penetrációja megy végbe. A HIV fő célsejtjei a CD4⁺ T-lymphocyták és macrophagok, ezekbe a vírus membránfúzióval jut be. A gp120 felszíni glikoprotein először a sejt felszíni CD4 molekulához, majd egy koreceptorhoz kötődik. Ez a folyamat olyan konformációs változást okoz a burok glikoproteinek szerkezetében, hogy most már a gp41 TM protein is képes kapcsolatba lépni egy, a sejtmembránra lokalizálódó fúziós molekulával. Ezt követően a virion burka és a sejtmembrán összeolvad és a szabaddá váló HIV nukleokapszid bekerül a sejt citoplazmájába. A dekapszidáció során a p24 kapszid fehérje eltávolítása történik meg. A vírus RNS és a reverz transzkriptáz enzim szabaddá válásával kezdetét veszi a reverz transzkripció. Ennek során a genomiális RNS DNS-re íródik át. Az enzim mellett a p7 nukleokapszid fehérje és a Vif regulátor protein is fontos szerepet játszik a reverz transzkripcióban azzal, hogy biztosítják a nukleinsav-enzim komplex stabilitását és védik a nukleinsavakat a celluláris nukleázok emésztő hatásával szemben. A vírusgenom DNS kópiáját provirális DNS-nek nevezzük. A reverz transzkripció fontos jellemzője, hogy eredményeként a terminálisan jelenlevő U5 és U3 szekvenciák megduplázódnak. Így a provirális DNS mindkét végén jelen lesznek az U3-R-U5 szekvenciák. Az U3, R és U5 szekvenciákat tartalmazó régió neve long terminal repeat (LTR). A HIV szaporodásához feltétlenül szükséges, hogy a provirális DNS beépüljön a sejtgenomba. A provirális DNS egy preintegrációs komplex transzportja révén jut el a gazdasejt DNS-éhez. A preintegrációs komplex komponensei a virális nukleinsavak, a reverz transzkriptáz, az integráz, a p17 matrix fehérje és a Vpr/Vpx regulátor protein. A HIV egyik fontos specifikuma, hogy a provirális DNS beépüléséhez nem szükséges a maghártya eltűnése, ezért ez a vírus a nem osztódó

macrophagokban is képes szaporodni. A preintegrációs komplexnek a maghátyán át történő nukleáris importját a matrix fehérje és regulátor Vpr protein teszik lehetővé. A sejtmagba bejutott provirális DNS integrációját az integráz enzim hajtja végre. A provirális DNS transzkripcióját a celluláris RNS polimeráz II enzim végzi. Ennek során a teljes vírus genommal megegyező hosszúságú mRNS keletkezik, melyből az átszabás (splicing) során különböző hosszúságú fragmentumok keletkeznek. A kétszeresen vágott fragmentumok a korai, míg az egyszeresen vágott fragmentumok és a vágatlan RNS a késői fehérjék translációjához szolgálnak mRNS-ként. A korai transláció termékei a Tat, Rev és Nef fehérjék. Ezek közül a Tat a transzkripció, a Rev pedig a transláció szabályozásában játszik esszenciális szerepet. A késői transláció során az egyszeresen vágott mRNS-ek a Vif, Vpr és Vpu regulátor fehérjék, valamint a gp160 prekursor glikoprotein szintézisében játszanak szerepet. A vágatlan RNS szerepe kettős. Egyrészt erről egy p55 Gag és egy p160 Gag-Pol prekursor fehérje szintetizálódik, másrészt a vágatlan RNS fog genomiális nukleinsavként beépülni az új virionokba. A további lépések a virion összeépülésével kezdődnek, ezt követik a lefűződés és maturáció egymással szorosan összefüggő folyamatai. Az összeépülés során kialakul a genomiális RNS-ből és a prekursor polipeptidekből álló éretlen nukleokapszid. A nukleokapszid a citoplazma membrán belső felszínéhez vándorol és kezdeményezi annak kitüremkedését (budding). A lefűződés és maturáció során a citoplazma membrán kitüremkedésében megjelennek az Env fehérjék (gp41, gp120), a vírus proteáz enzime pedig megkezd a prekursor polipeptidek felvágását. Az Env prekursor glikoprotein hasítását nem a virális, hanem egy celluláris proteáz végzi. A prekursor polipeptidekből létrejönnek a virionba beépülő enzimek, valamint az MA, CA, p6 és NC struktúrfehérjék. A maturáció és a virion burkának kialakulása a lefűződés során tovább folytatódik és a replikációs ciklus a virion kiszabadulásával fejeződik be [Luciw, 1996; Tang et al., 1999].

A citokinek hatása a HIV-1 szaporodására

A citokinek stimulálhatják vagy gátolhatják a HIV szaporodását. Sőt, olyan citokinek is vannak, melyek induktív és szuppresszív hatást egyaránt kifejthetnek. A stimulatív hatású citokinek közül a granulocytá-macrophag kolónia stimuláló faktor (GM-CSF) [Perno et al., 1989], macrophag kolónia stimuláló faktor (M-CSF) [Gendelman et al., 1988], interleukin-1 (IL-1) [Osborn et al., 1989], interleukin-2 (IL-2) [Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1983], interleukin-6 (IL-6) [Poli et al., 1990], tumor nekrozis faktor- α és tumor nekrozis faktor- β (TNF- β) a legfontosabbak [Folks et al., 1989]. Ezeket a citokineket – az IL-2 kivételével – a syncytiotrophoblast sejtek [Paulesu et al., 1991; Kameda et al., 1990; Jokhi et

al., 1994; Saito et al., 1993; Chen et al., 1991] és macrophagok [Dinarello et al., 1988; Horii et al., 1988; Sullivan et al., 1983; Rambaldi et al., 1987; Burchett et al., 1988] is képesek termelni. A GM-CSF és az M-CSF a reverz transzkripció mértékét fokozza a macrophagokban. Az IL-1, a TNF- α és a TNF- β az NF- κ B celluláris transzkripciós faktor aktiválásán keresztül fejt ki hatását. A HIV-1 az LTR enhancer régiójában két NF- κ B kötőhellyel rendelkezik. Az NF- κ B jelentősen fokozza a provirális DNS transzkripcióját. Szerepének fontosságát jól bizonyítja, hogy a látens HIV-et indukálni képes faktorok zöme az NF- κ B aktiválásán keresztül fejt ki a stimulatív hatását. Az IL-6 úgy serkenti a HIV szaporodását, hogy a C/EBP transzkripciós faktor révén fokozza a virális gének expresszióját, valamint hat a translációra is. Fontos körülmény, hogy maga a HIV fertőzés is indukál IL-1, IL-6, GM-CSF és TNF- α szintézist a macrophagokban [Clouse et al., 1991]. Az IL-2 a CD4⁺ T-lymphocytákban és a perifériás vér mononukleáris sejtjeiben fejt ki stimulatív hatást a HIV szaporodására. Egyes adatok szerint gyulladást keltő citokinek (IL-1, IL-6, TNF) indukálására vezethető vissza [Todd et al., 1991; Kinter et al., 1995] ez a hatás.

Gátló hatású citokinek az interferon- α , interferon- β [Yamamoto et al., 1986] és interleukin-13 (IL-13) [Montaner et al., 1993]. Az interferonok több ponton képesek blokkolni a HIV szaporodását. A gátló hatás főleg a transzkripció és a lefűződés szintjén érvényesül, de kiterjed a reverz transzkripcióra és a virionok összeépülésére is. Az IL-13 valószínűleg a translációra hat.

Bifunkcionális hatású az interferon- γ [Hartshorn et al., 1987; Koyanagi et al., 1988; Biswas et al., 1992] és az interleukin-4 (IL-4) [Kazazi et al., 1992; Schuitemaker et al., 1992]. Az interferon- γ ellentétes hatását macrophag tenyészeteken figyelték meg. A citokint HIV fertőzés előtt adva stimulatív, a fertőzés után alkalmazva gátló hatás volt kimutatható. Ez azzal magyarázható, hogy az IFN- γ fokozni képes a fiatal macrophagok differenciálódását. Ez olyan mértékben növeli a transzkripció hatásfokát, hogy hozzá képest a gátló hatás alárendelt jelentőséggel bír. A HIV fertőzést követően viszont csak a gátló hatás jut érvényre. Az interleukin-4 hatását monocyta-macrophag rendszerben vizsgálva kiderült, hogy az IL-4 a monocyták differenciálódásának stimulálása révén fokozza a HIV szaporodását, differenciált macrophagokban azonban gátló hatást fejt ki.

A HIV vertikális terjedése

A különböző populációkban elvégzett vizsgálatok alapján, a HIV-pozitív terhes nők mintegy 20 %-os valószínűséggel fertőzik meg csecsemőiket [Peckham, 1994]. A napjainkban használt profilaktikus antivirális kezelés azonban ezt a veszélyt harmadára

lecsökkentheti [Lallemant et al., 2000]. A gyermek megfertőződhet a méhen belül [Maury et al., 1989], a szülés folyamán (vérrel, illetve hüvelyi váladékkal való érintkezés következtében) [Ehrnst et al., 1991] vagy a szoptatás alatt [Dunn et al., 1992]. A tünetek nagymértékben függenek a fertőzés időpontjától. Az infekciónak gyorsan és lassan progrediáló formáját különböztetik meg

A gyorsan progrediáló forma a méhen belüli fertőzés következménye. Jellemzői a néhány hónapos korban jelentkező, igen súlyos, vissza-visszatérő, hagyományos kórokozókkal (streptococcusok, staphylococcusok, *Streptococcus pneumoniae*, salmonellák stb.), vagy pedig az opportunistá ágensekkel (*Pneumocystis carinii*, HCMV, Epstein-Barr-vírus, Herpes simplex vírus, *Candida*, *Cryptosporidium* stb.) történő infekciók. Ugyancsak gyakori az újszülöttkori BCG oltás nyomán jelentkező BCG-sepsis. Jellemző továbbá a súlyfejlődés megállása, sőt az atrophíába torkolló fogyás, a lymphadenopathia, a parotisduzzanat és az ekzema. A psychosomaticus fejlődés is megakad és – a corticalis atrophia és a demyelinisatio miatt – jelentős visszafejlődés észlelhető. A halál általában 3 éves kor körül következik be.

A lassan progrediáló forma főleg az intrapartum és a postpartum fertőzés következménye. A lappangási idő 1-2 év, a csecsemőkori infekciók gyakorisága és szokatlan súlyossága hívják fel rá a figyelmet. Erre a formára is jellemző a szellemi teljesítőképesség fokozatos romlása, ami azonban lassabban alakul ki, mint a gyorsan progrediáló formában. Erre a kórformára jellemző a lymphoid interstitialis pneumonitis (LIP), valamint a hypergammaglobulinaemia. A betegek kb. 60%-a 5 éves kora előtt meghal, de a túlélők is számos idült szervi ártalommal (pl. carditis, nephrosis) terheltek. Az opportunistá *Pneumocystis carinii* okozta pneumonia után a halál rendszerint egy éven belül bekövetkezik [Maródi, 1998b].

A magzat méhen belüli fertőződése

Az intrauterin fertőződés lehetőségét bizonyítja, hogy virális nukleinsavat mutattak ki köldökzsinór-vérben és újszülöttek perifériás vérében közvetlenül a születés után [Lauré et al., 1988; Rogers et al., 1989], illetve magzati szövetekben [Courgnaud et al., 1991]. A HIV a syncytiotrophoblast rétegen keresztül juthat el a placenta stromájába, majd a magzati kapillárisokba. A barrieren való keresztüljutás történhet fertőzött anyai sejteknek (monocyták, T-lymphocyták) az ST rétegen való áthatolásával, vírus-ellenanyag komplexek révén és a trophoblastok megfertőzésével [Moussa et al., 1999].

Az ST rétegben HIV-1-specifikus provirális DNS-t *in situ* több vizsgálatban is kimutattak [Lewis et al., 1990; Chandwani et al., 1991; Backé et al., 1992]. *In vitro* kísérletekben kapott eredmények alapján, egyes szerzők szerint a trophoblastok fertőzése sejtmentes víruspartikulákkal is megtörténhet [Mano és Chermann, 1991; Zachar et al., 1991a; Tóth et al., 1995], mások szerint a syncytiotrophoblastok HIV-1 fertőzése csak sejt-sejt kölcsönhatás révén valósulhat meg [Bourinbaiar és Nagorny, 1993; Kilani et al., 1997]. Az *in vitro* HIV-vel fertőzött trophoblast kultúrákban azonban vírusürítés általában nem figyelhető meg, vagy annak mértéke igen csekély [Mano és Chermann, 1991; Zachar et al., 1991b; Fazely et al., 1995]. HIV-pozitív terhesek placentáiban a trophoblast sejtekben HIV p24 antigént kimutattak ki [Lewis et al., 1990; Backé et al., 1992], ami arra utal hogy a trophoblastok *in vivo* produktív fertőzése meghatározott, átmeneti feltételek mellett valószínűleg végbemehet. Ezen megfigyelések alapján a vírus transzplacentális átvitelét különböző kofaktorok befolyásolhatják. A kofaktorok fontos csoportját képezhetik a HIV szaporodását stimuláló citokinek.

A vertikális átvitelt befolyásoló tényezők

Nem ismerjük még az összes tényezőt, ami befolyásolhatja a HIV-1 anyáról magzatra történő terjedését. Néhány – az anya állapotára jellemző – laboratóriumi értékről már kiderült, hogy a méhen belüli fertőződés nagyobb kockázatát jelzi. Ha a terhesség alatt a HIV folyamatosan kitenyészthető az anya perifériás vérének mononukleáris sejtjeiből, vagy a vérben a fertőzőképes virionok száma nagy, ez fokozza a veszélyét a vertikális átvitelnek [Roques et al., 1993; Pitt et al., 1997]. Az anyai vérplazmában a magasabb HIV RNS szint fokozott kockázatot jelent, de nem egyértelmű, hogy mekkora az a küszöbérték, ami felett a magzat fertőződése nagy valószínűséggel be fog következni [Coll et al., 1997; Thea et al., 1997].

Az anya immunológiai állapota szintén nagyon fontos tényezője a vertikális átvitelnek. A CD4⁺ lymphocyták kevés száma fokozott kockázati faktor [Newell és Peckham, 1993; Mayaux et al., 1995; Landesman et al., 1996]. A CD8⁺ sejtek megnövekedett száma – a viraemiával való szoros összefüggés miatt – szintén jelzi a transzmisszió nagyobb valószínűségét [St. Louis et al., 1993].

A terhesség alatt az anya vérében jelen lévő HIV-1 virionok tropizmus is jelentős faktor lehet. A placentán ugyanis szinte kizárólag csak macrophagtróp törzsek jutnak át [Van't Wout et al., 1994; Ometto et al., 1995]. Ez utóbbi tény motivált minket, hogy megvizsgáljuk a placenta macrophagok szerepét a transzplacentális terjedésben.

A placenta macrophagok (Hofbauer sejtek)

A placenta Hofbauer sejtjei magzati eredetűek, és a chorionbolyhokban a fibroblastok mellett ezek képezik a kötőszöveti sejtek többségét. A chorion mesenchymájából származnak, ezért már a csontvelő kifejlődése előtt jelen vannak a bolyhokban. Számos morfológiai, citokémiai és immunológiai tulajdonságuk megegyezik a csontvelő eredetű macrophagokéval. A placenta macrophagok 10 napos tenyészetében a sejtek nonspecifikus észteráz és savanyú foszfatáz aktivitást mutattak. A felszínükön HLA-ABC, HLA-DR, CD45, CD4 és intracellulárisan CD68 fehérjéket expresszáltak. A sejtek 80%-a volt CD14 pozitív [Kesson et al., 1994]. Ezek az eredmények megerősítik, hogy a Hofbauer sejtek macrophag fenotípusúak. Vannak olyan sajátoságaik is, amelyekben eltérnek a csontvelő eredetű macrophagoktól. Ezek között a legjelentősebb az, hogy a Hofbauer sejtek képesek osztódni [Castellucci et al., 1987; Goldstein et al., 1988].

A syncytiotrophoblast rétegen átjutott HCMV, vagy a HIV könnyen továbbterjedhet a placenta stromájába, ugyanis a Hofbauer sejtek – a vírusok lehetséges célsejtjei – közvetlenül a trophoblast réteg alatt is megtalálhatóak. Más fagocitáló sejtekhez hasonlóan a Hofbauer sejtek is mobilisak, így fontos szerepük lehet a vírusok szétterjedésében a placenta szövetei között.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vírusok

A HCMV AD169 törzsét [Rowe et al., 1956] humán embrionális fibroblast sejt kultúráján termeltük. A tápfolyadékot leszívtuk, amikor a citopátiás elváltozás a sejtek közel 100 %-ában megfigyelhető volt, majd lecentrifugáltuk (1000 g, 10 perc). A felülúszókat 0,45 µm-es pórusnagyságú szűrőn átszűrtük. A felülúszókból egyesítés után ultracentrifugálással (113000 g, 1 óra, 4 °C) a vírusokat kiülepítettük. Az üledéket tápfolyadékkal óvatosan mostuk, majd a vírust az eredeti térfogat harmincad részét képező tápfolyadékban elszuszpendáltuk.

A VSV Indiana törzsét WISH sejtekben szaporítottuk, és a titrálásra is ezt a sejt vonalat használtuk. Az infektív virionok mennyiségének meghatározása plakk-képző módszerrel történt, a VSV titerét PFU (plaque forming unit)/ml egységben adtuk meg.

A HIV-1 IIIB [Popovic et al., 1984], RF [Starcich et al., 1986] és MN [Curgo et al., 1988] törzseit H9 sejtekben szaporítottuk, a Ba-L [Gartner et al., 1986] és Ada-M [Gendelman et al., 1988] törzseket pedig monocita eredetű macrophagokban.

Koncentrált HIV-1 Ba-L preparátumot úgy állítottunk elő, hogy a fertőzött macrophagok tápfolyadékát leszívtuk, majd lecentrifugáltuk (1000 g, 10 perc). A felülúszókat 0,45 µm-es pórusnagyságú szűrőn keresztül szűrtük, és ultracentrifugáltuk (100000 g, 2 óra, 4 °C). Az üledéket óvatosan mostuk, majd a vírust a kiindulási térfogat harmincad részét képező tápfolyadékban szuszpendáltuk el.

A víruskoncentrátumokat és a víruspreparátumokat felhasználásukig -70 °C-on tároltuk.

HCMV titrálása

A HCMV-t humán embrionális fibroblast kultúrákban titráltuk Wentworth (1970) módszere alapján. Erre a célra 24-lyukú titráló lemezekre (Nunc, Koppenhága, Dánia) fibroblastokat szélesztettünk úgy, hogy minden lyukba 6×10^4 sejt került. Ezt a sejtmennyiséget 1 ml Eagle MEM tápfolyadékkal mértük be, mely 10 % magzati borjúsavót (fetal calf serum; FCS), 2 mM glutamint, 100 U/ml penicillint, valamint 100 µg/ml streptomycint tartalmazott. A titrálás kezdetekor a fibroblastok 80-90 %-os monolayert képeztek. A mintákból tízes léptékű hígítási sorozatot készítettünk. Az izotóniás foszfátpufferelt sóoldattal (phosphate buffered saline; PBS) előzetesen kimosott lyukakba

200-200 µl került a hígítási sorozat megfelelő tagjaiból. A lemezeket 2 óráig 37 °C-on inkubáltuk, majd a folyadékra teget leszívtuk, a sejteket mostuk, végül a lyukakba 5 % FCS-t tartalmazó szemiszolid tápfolyadékot (1 rész 0,6 %-os agaróz oldat és 1 rész 2x MEM) mértünk be. A fertőzött sejteket 37 °C-on inkubáltuk és rendszeresen vizsgáltuk HCMV által indukált citopátiás hatás jelenlétére. Egy hét elteltével az első szemiszolid rétegre egy újabb, friss MEM/agaróz réteg került. A HCMV titerét a különböző hígításokban megfigyelhető plakkok száma alapján állapítottuk meg, és azt PFU/ml-ben fejeztük ki.

HIV titrálása

A HIV titrálására a kísérletek jellegétől függően három különböző módszert használtunk.

A virionok reverz transzkriptáz aktivitásának mérése

A reverz transzkriptáz aktivitás mérése a Hoffman (1985) által leírt módszer szerint történt. Első lépésként az 500 µl mintákat 500 µl RPMI-1640 tápfolyadékkal egészítettük ki, és magas fordulatszámmal (3500 g, 10 perc) lecentrifugáltuk. A felülúszóból 800 µl-t kivettünk, és a sejtmentes supernatanshoz 400 µl polyethylen-glykol-NaCl oldatot (27 % PEG, 0,3 M NaCl) adtunk. Az elegyet egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk és másnap a fehérjékkel együtt kicsapott vírust lecentrifugáltuk (2000 g, 15 perc). A virionok feltárása céljából az üledékhez 50 µl lízispuffert adtunk, melynek összetétele a következő volt: 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM dithiothreitol, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,05 % Triton X-100, 0,5 mM EDTA, 34,8 % glicerin. A mintákat a lízispufferrel tört jégen inkubáltuk 20 percig, majd azokból 10 µl-t kivettünk, és 40 µl reakcióelegyet adtunk hozzá, melynek komponensei az alábbiak voltak: 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM dithiothreitol, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,05 % Triton X-100, 0,5 mM EDTA, 0,3 mM glutation, 2 µM TTP, 3,75 µM ³H-TTP és 20 µg/ml poly(rA)olygo(dT)₁₂₋₁₈ templát. A minták és a reakcióelegy keverékét 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően minden csőből 30 µl-t Whatman szűrőpapír-korongra cseppentettünk – melyet előzetesen 10 mM Na-pirofoszfát oldatban impregnáltunk –, és a mintákat szobahőmérsékleten 1 órán át szárítottuk. Ezután a filtereket 5 %-os triklórecetsav oldatban háromszor 5 percig, majd 96 %-os etil-alkoholban 1 percig mostuk. A nedves filtereket szárítószekrényben 30 °C-on megszártottuk, majd egyenként 7-7 ml szcintillációs folyadékba (0,4 % 2,5-diphenyloxazol toluolban) helyeztük. A minták radioaktivitását megmértük, és a bennük lévő vírus titerét cpm/ml (count per minute/ml) egyégben kifejezve adtuk meg.

Vírusspecifikus p24 antigén mennyiségi meghatározása ELISA módszerrel

Ennél a módszernél a sejt kultúrák felülszójában a HIV titerét ELISA kit segítségével határoztuk meg (Beckman Coulter, Miami, FL, USA), melyben a HIV p24 antigénjére specifikus egér MAb-ot a microplate lyukaihoz kötötték. A módszer megbízhatóságát pozitív és negatív kontroll segítségével ellenőriztük. Bemértük a lyukakba a leírás szerint elkészített standardokat, a pozitív és negatív kontrollt, valamint a vizsgálandó mintáinkat. Lízispuffer hozzáadása után 1 órán át, 37 °C-on inkubáltuk. Hatszori mosást követően minden lyukba bemértük a biotin reagenst, mellyel ismét 1 órán át, 37 °C-on inkubáltuk. Ezután hatszor alaposan mostuk, és hozzáadtuk a streptavidinnel konjugált tormaperoxidázt, mellyel 30 percen át, 37 °C-on inkubáltuk. Újabb mosásokat követően bemértük a szubsztrátot, mely tetrametil-benzidint és hidrogén-peroxidot tartalmazott. Harminc perces, szobahőmérsékleten történő inkubálás után a reakciót 2 M H₂SO₄-val állítottuk le. Az optikai denzitást 450 nm-en olvastuk le, és az értékeket az 540 nm-en mért abszorbanciával korrigáltuk.

Az infektív HIV titerének meghatározása syncytiumképzés alapján

Az infektív virionok mennyiségének meghatározása a mintákban a Wu és munkatársai (1996) által leírtak szerint történt. A vizsgálat elvégzéséhez a 7 napos, monocyta eredetű macrophagokat 1,7 mM EDTA-t tartalmazó 0,25 %-os tripszin oldat (37 °C , 10 perc) és sejt kaparó segítségével a tenyésztőpalack aljáról leválasztottuk. A sejteket háromszor mostuk, 10 % humán szérumot (HuSe), 2mM glutamint és antibiotikumokat tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékban felvettük, majd 2 részre választottuk. A macrophagok egyik részét 96-lyukú titráló lemezekre szélesztettük (1,4x10⁵ sejt/lyuk), ezeket használtuk indikátor sejtekként. A másik rész macrophagjai voltak a „target” sejtek. A vizsgálandó mintákból 500–500 µl-t és 500 µl tápfolyadékban 3x10⁵ macrophagot Eppendorf csőbe mértünk. A sejteket a vírusinokulummal 2,5 órán át 37 °C-on rázattuk. Az inkubálás után a sejteket centrifugáltuk (8000 g, 1 perc), mostuk, és tápfolyadékban reszuszpendáltuk. Trypankék festéssel meghatároztuk a viabilis sejtek számát. Ezután négyes léptékű hígítási sort készítettünk. A hígítási sorozat megfelelő tagjaiból a fertőzött macrophagokat a fertőzetlen indikátor sejtekhez adtuk. A végpont-titrálást három párhuzamos vizsgálat formájában végeztük. A macrophagokat 37 °C-n inkubáltuk 3-4 hétig, a tápfolyadék felét hetente frissre cseréltük. A kultúrákban rendszeresen vizsgáltuk a syncytiumképzést. A HIV titerét syncytium-képző egységek (syncytium forming unit; SFU) száma alapján 1 ml vírusszuspenzióra vonatkoztatva adtuk meg.

Cytotrophoblastok és macrophagok (Hofbauer sejtek) szeparálása, tenyésztése

Kísérleteinkhez a cytotrophoblast sejteket [Douglas és King, 1989], valamint a Hofbauer sejteket [Wilson et al., 1983] normál szülésből származó placentákból szeparáltuk. A placenta magzati részét apró darabokra vágtuk, és izotóniás foszfátpufferben (phosphate buffered saline; PBS) többször mostuk. A szövetdarabokat DNase I enzimet (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) tartalmazó, 0,25 %-os tripszinben 37 °C-on emésztettük. A háromszor 30 perces emésztésből nyert sejtfrakciókat egyesítettük. A sejtseparálás további lépései attól függték, hogy cytotrophoblastot vagy Hofbauer sejtet akartunk kinyerni.

A cytotrophoblast sejtek szeparálása

A vörösvértestek és egyéb kontamináns sejtek zömét Percoll (Pharmacia, Uppsala, Svédország) gradiens centrifugálással (20 perc, 800 g) távolítottuk el. A következő lépésben a cytotrophoblastoktól a még megmaradt kontamináns sejteket immunmágneses technikával választottuk el. A sejtekhez anti-HLA ABC monoklonális ellenanyagokat adtunk (mouse anti-human HLA-ABC, DAKO, Koppenhága, Dánia), majd 30 percig rázattuk tört, olvadó jégen. PBS-sel történő egyszeri mosás után hozzáadtuk a szekunder ellenanyagot. A szekunder ellenanyag olyan, birkában termelt anti-egér immunglobulin volt, melyet vas partikulumokkal konjugáltak (Dynabead M-450, sheep anti-mouse IgG, Dynal A. S. Oslo, Norvégia). A Dynabead hozzáadása után a szuszpenziót ismét tört jégen rázattuk 30 percig. Ezután mágnessel eltávolítottuk azokat a sejteket, melyek HLA A, B vagy C antigéneket hordoznak a felszínükön. Mivel a cytotrophoblastok ilyen antigénekkal nem rendelkeznek, a szuszpenzióban maradtak. A cytotrophoblast sejteket 6-lyukú tenyésztőlemezre (Costar, Cambridge, MA, USA) vagy tárgylemez-alapú tenyésztőpalackba (Nunc) szélesztettük. A 35 mm átmérőjű lyukakba, illetve a tenyésztőpalackba 3×10^6 trophoblastot mértünk be. A tenyésztés 2 mM glutaminnal, antibiotikumokkal és 15 % FCS-sel komplettált KGM (keratinocyte growth medium, Clonetics, San Diego, CA, USA) tápfolyadékban történt. A sejtpopuláció tisztaságát indirekt immunfluoreszcenciás módszerrel ellenőriztük, cytokeratin- (epithel sejt), vimentin- (fibroblast), CD3- (T-lymphocyta), CD14- (monocyta), CD31- (endothel sejt) és CD68- (macrophage) specifikus monoklonális IgG ellenanyagok felhasználásával. A szeparált sejtek >99% arányban cytokeratin-pozitívak voltak, gyakorlatilag tiszta cytotrophoblast tenyészeteket kaptunk. A trophoblastok több mint 95 % volt viabilis. A KGM tápfolyadék olyan komponenseket tartalmaz, melyek a cytotrophoblastok differenciálódását indukálják, ezért a kultúrákban sejtfúziós folyamatok

zajlottak le és a sejtek kiszélesztését követő 5. napon a tenyészeteket sokmagvú óriássejtek (syncytiotrophoblastok) alkották. A syncytiumok kialakulását desmoplakin festéssel és a chorion-gonadotropin hormon szekréciónak mérésével ellenőriztük. A kísérletek során ezeket az 5 napos syncytiotrophoblast kultúrákat használtuk. A tenyésztés 5. napján a tápfolyadékot 10 % HuSe-t tartalmazó KGM-re cseréltük.

A macrophagok kinyerése

Az emésztésből származó szűrletet centrifugáltuk (180 g, 7 perc), majd a sejteket 30 ml PBS-ben vettük fel. Alapos szuszpendálás után az oldatot 1:2 arányban Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Svédország) oldatra rétegeztük (sűrűsége 1,077 g/ml), majd 20 percen keresztül, 700 g-vel, 10 °C-on, fékezés nélkül centrifugáltuk. Ezt követően az interfázisban lévő sejteket leszívtuk, és tiszta centrifugacsőbe tettük. A sejteket kétszer mostuk PBS-sel úgy, hogy az alaposan összeszuszpendált oldatot lecentrifugáltuk (10 °C, 300 g, 10 perc). A második mosás után a sejteket 10 ml PBS-ben reszuszpendáltuk, 30-75 % Percoll (Pharmacia) gradiensre rétegeztük, és fékezés nélkül 700 g-vel, 10 °C-on, 20 percig, centrifugáltuk. Ezután az 1,045-1,065 g/ml sűrűségnek megfelelő interfázisban lévő sejteket leszívtuk, és tiszta centrifugacsőben kétszer mostuk PBS-sel a már leírt módon. A sejteket 2 mM glutamint, 10-% HuSe-t és antibiotikumokat tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékban vettük fel, majd 6-lyukú tenyésztőlemezre (Costar), vagy tárgylemez-alapú palackokba (Nunc) szélesztettük (3×10^6 sejt/palack vagy lyuk). A kontamináns fibroblastok eltávolításához a fibroblastok és a macrophagok letapadásában mutatkozó különbséget használtuk ki. A sejteket 24 órán keresztül, 37 °C-on inkubáltuk, majd leszívtuk a tápfolyadékot, amit 5 percig, 300 g-vel lecentrifugáltunk. A sejteket háromszor mostuk PBS-sel, majd 0,25 %-os tripszinnel emésztettük 5 percig. Ezt követően a tripszint, illetve a felvált fibroblastokat eltávolítottuk, és a sejteket alaposan, kétszer mostuk PBS-sel. Majd fele részben a lecentrifugált, fele részben pedig friss tápfolyadékot adtunk a sejt kultúrákra. A sejt populációk tisztaságát 72 óra múlva a nem specifikus észteráz aktivitás kimutatásával ellenőriztük, melyhez α -naphtyl-acetát észteráz (Sigma, St. Louis, MO, USA) festést használtunk. A sejtek >99%-a észteráz-pozitív volt.

A kokultivációs vizsgálatokhoz a cytotrophoblastokat és a macrophagokat ugyanabból a placentából párhuzamosan nyertük ki.

A monocyta eredetű macrophagok szeparálása és tenyésztése

A perifériás vér mononukleáris sejtjeit (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) Ficoll-Hypaque (Pharmacia) sűrűség-grádiens centrifugálással nyertük ki „buffy coat” (a vér alakos elemeit tartalmazó) preparátumokból. Ehhez a sűrített vért steril PBS-sel kétszeresére hígítottuk, majd Ficoll-Hypaque oldatra rétegeztük. Ezt követően a grádienseket 30 percig 4 °C hőmérsékleten centrifugáltuk 800 g sebességgel. A PBMC frakciót az interfázisból szívtuk le, majd PBS-sel kétszer mostuk. A sejteket 2 mM glutamint, 10 % HuSe-t és antibiotikumokat tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékban vettük fel. Körülbelül 5×10^7 sejtet tettünk a 25 cm²-es tenyésztőpalackokba (Greiner, Kremsmuenster, Ausztria), vagy 2×10^7 sejtet szélesztettünk a 6-lyukú tenyésztőlemezen (Costar) a 35 mm átmérőjű lyukak midegyikébe. Egy órás inkubálást (37 °C) követően eltávolítottuk a le nem tapadt sejteket. A letapadt sejtekre 5 µg/ml concanavalin A-t (Sigma) tartalmazó friss tápfolyadékot adtunk a differenciálódás elősegítése céljából. A sejtpopulációk tisztaságát 72 óra múlva a nem specifikus észteráz aktivitás kimutatásával ellenőriztük, melyhez α -naphthyl-acetát észteráz (Sigma) festést használtunk. A sejtek >99%-a észteráz-pozitív volt. Kísérleteinkben 7 napos, monocyta eredetű macrophag kultúrákat fertőztünk

Sejtvonalak

A hám eredetű WISH és MDBK sejteket 10 % FCS-t tartalmazó Eagle MEM tápfolyadékban tenyésztettük. A lymphoid H9, Sup-T1 és CEM-SS sejteket, valamint a promonocyta U937 sejteket 10 % FCS-t tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékban tartottuk fenn. A tápfolyadékok 2 mM glutamint, 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint is tartalmaztak.

A kísérleteinkhez használt víruskoncentrátumok, víruspreparátumok és sejtkultúrák midegyike az elvégzett tesztek alapján (Bionique Laboratories, Inc., Saranac Lake, USA) *Mycoplasma* fertőzéstől mentes volt.

Syncytiotrophoblastok fertőzése HCMV-vel

Az 5 napos ST kultúrák HCMV fertőzésekor a multiplicitása 1 PFU/sejt volt, amit a kiszélesztett cytotrophoblastok számának megfelelően állapítottunk meg. A sejteket a vírusszuspenzióval 37 °C-on, 2 órán át inkubáltuk, majd a tenyészeteket ötször mostuk szérummentes KGM tápfolyadékkal. Végül 10 % HuSe-t, 2 mM glutamint és antibiotikumokat tartalmazó KGM tápfolyadékot adtunk a sejtekre.

A pszeudotípus vírusok előállítás

A pszeudotípusok előállítás két lépésben történt: először HIV-vel fertőztünk sejteket, majd felülfertőztük VSV-vel. Abból a célból, hogy HIV-1-et folyamatosan ürítő sejteket állítsunk elő, U937 sejteket a HIV-1 IIIB, RF vagy MN törzseivel [Clapham et al., 1987], a Sup-T1 sejteket pedig Ba-L illetve Ada-M törzsekkel fertőztük [Chowdhury et al., 1995]. Két hónap múlva a perzisztensen fertőzött kultúrákban a sejtek több mint 95 %-ában lehetett indirekt citoplazma IFA-val virális p24 antigént kimutatni. A sejtek tápfolyadékából vett mintákban a reverz transzkriptáz aktivitás pedig meghaladta a 10^6 cpm/ml értéket. A HIV-vel krónikusan fertőzött U937 és Sup-T1 sejteket ekkor VSV-vel felülfertőztük, 10 PFU/sejt multiplicitással [Dalglish et al., 1984]. A kultúrákat 12-18 óra múlva lecentrifugáltuk (3800 g, 5 perc), a felülúszókat szétosztottuk és lefagyasztottuk -70°C -ra.

A pszeudotípus vírusok titrálása

A VSV(HIV-1) pszeudotípusokat a Clapham és munkatársai (1987) által leírtak szerint titráltuk, kontrollként nem pszeudotípus VSV-t használtunk. A vizsgálandó mintákat 1 órán át, 37°C -on inkubáltuk hővel inaktivált, nyúl anti-VSV szérum tízszeres feleslegével, amikor a pszeudotípusok mennyiségét akartuk meghatározni, illetve antiszérum nélkül, amikor az összes VSV-t titráltuk. (Az anti-VSV szérum titerét előzetesen meghatároztuk.) A pszeudotípusok kialakulását VSV(HIV-1_{IIIB}), VSV(HIV-1_{RF}) és VSV (HIV-1_{MN}) pszeudotípusok esetén HIV neutralizáló szérum, VSV(HIV-1_{Ba-L}) és VSV(HIV-1_{Ada-M}) pszeudotípusoknál HIV-specifikus immunglobulin blokkoló hatásával ellenőriztük. A pszeudotípusok titerét a HIV-1 törzsek tropizmusának megfelelő sejt kultúrákon, IIIB, RF és MN HIV-1 törzssel pszeudotipizált VSV esetén poli-L-lizinnel letapasztott CEM-SS sejteken [Nara et al., 1987], míg Ada-M és Ba-L HIV-1 törzssel pszeudotipizált VSV esetén macrophag kultúrákon határoztuk meg. A 7 napos macrophagokat és 1 nappal a szélesztés után a CEM-SS sejteket azokkal a vírusmintákkal fertőztük meg (1 óra, 37°C), amelyeket előzetesen vagy anti-VSV szérummal, vagy anti-VSV és anti-HIV-1 szérumokkal együttesen blokkoltunk. A vírusadszorpció után a sejteket (5×10^5 / 35 mm-es lyuk) mostuk és feleslegben adott (10^6) MDBK sejtekkel fedtük le. Az MDBK sejtek plakk-indikátorként szerepeltek az újonnan képződött VSV partikulák kimutatására. Két óra múlva, amikor az MDBK sejtek már letapadtak, a sejt kultúrákra agart tartalmazó tápfolyadékot öntöttünk. A keletkezett plakkok számát 1-2 nap múlva olvastuk le, és PFU/ml egységben adtuk meg.

A syncytiotrophoblastok fertőzése VSV-vel és VSV(HIV-1) pszeudotípusokkal

Öt napos syncytiotrophoblast kultúrákat fertőztünk meg VSV-vel, illetve VSV(HIV-1) pszeudotípusokkal. A fertőzés előtt háromszor mostuk a sejteket, majd vírusszuspenzióval 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Ezután ötször mostuk a trophoblastokat szérumentes tápfolyadékkal, majd visszaadtuk a sejtekre az eredeti tápfolyadékot. A vírussal fertőzött és a kontrollként használt fertőzetlen sejt kultúrák tápfolyadékából különböző időpontokban mintát vettünk, és a VSV titert plakkképző módszerrel WISH sejteken határoztuk meg. A VSV és a VSV(HIV-1) pszeudotípusok fertőzőképességének vizsgálatok a syncytiotrophoblastokat a vírusadszorpció után mostuk és MDBK sejtekkel fedtük. Az MDBK sejtek letapadása után (2 óra), a sejt kultúrákra agart tartalmazó tápfolyadékot adtunk. A keletkezett plakkok mennyiségét 1-2 nappal a fertőzés után értékeltük.

Syncytiotrophoblastok fertőzése HIV-1_{Ba-L}-lal

Kísérleteinkhez 5 napos syncytiotrophoblast kultúrákat fertőztünk. Először eltávolítottuk a sejtekről a tápfolyadékot, majd háromszor mostuk nem komplettált KGM tápfolyadékkal. A fertőzés multiplicitása 1 SFU/sejt volt, melyet a kiszélesztett cytotrophoblastok számának megfelelően állapítottunk meg. A HIV-1 Ba-L preparátumokat a fertőzés előtt DNáz enzimmel (80 U/ml) (Promega, Madison, WI, USA) kezeltük 37°C-on, 1 órán át. A vírusszuspenzió hozzáadását követően a sejteket 2 órán át inkubáltuk 37 °C-on. Ezt követően a kultúrákat alaposan, ötször mostuk nem kiegészített KGM tápfolyadékkal. Végül 10 % HuSe-t, 2 mM glutamint és antibiotikumokat tartalmazó KGM tápfolyadékot adtunk a sejtekre.

Kokultiváció

A syncytiotrophoblastokat 4 nappal a fertőzés után 9 napos macrophagokkal kokultiváltuk. Ehhez a Hofbauer sejtekről a tápfolyadékot eltávolítottuk, háromszor mostuk PBS-sel, majd 1,7 mM EDTA-t tartalmazó 0,25%-os tripszin oldattal 37 °C-on, 10 percig inkubáltuk. Ezután a macrophagokat a tenyésztőpalackról sejt kaparóval leválasztottuk. A sejteket háromszor mostuk hideg PBS-sel, majd 2 mM glutamint, 10 % HuSe-t és antibiotikumokat tartalmazó KGM tápfolyadékban vettük fel. Alapos szuszpendálás után centrifugáltuk (300 g, 10 perc), majd a sejteket újra az említett tápfolyadékban reszuszendáltuk, végül pedig 1:1 arányban a syncytiotrophoblastokhoz adtuk.

Immunszérumok és konjugátumok

Az egér monoklonális ellenanyag (MAb) E-13 [Mazeron et al., 1992], amely a HCMV IE1 és IE2 antigénjével is reagál, a Biosoft cégtől származott (Párizs, Franciaország). A HCMV pp65 matrix proteinjére specifikus egér MAb a DAKO cég terméke volt.

A CXCR4 (12G5), a CCR3 (7B11) és a CCR5 (12D1) elleni egérben termelt monoklonális ellenanyagot, a humán HIV-specifikus immunglobulint (Cat. No. 3957) és a HIV-neutralizáló szérumot (Cat. No. 1983) az AIDS Research and Reference Reagent Program (Division of AIDS Program, NIAID, NIH, Rockville, MD, USA) révén kaptuk. Az egér anti-CD4 (Leu 3a) MAb-ot a Becton Dickinson (Mountain View, CA, USA) cégtől, a nyúl anti-VSV antiszérumot a Lee Biomolecular Research (San Diego, CA, USA) cégtől szereztük be. A HIV p24 antigénjére specifikus, egér monoklonális ellenanyagot a DAKO cégtől vásároltuk. A vírus Tat fehérjéje elleni [Hauber et al., 1987], nyúlban termeltetett, poliklonális ellenanyag az NIH-től származott.

Az IL-1 β , az IL-6, az IL-8, a TGF- β 1, illetve a TNF- α citokinnel reagáló MAb-ok az R&D Systems cég (Minneapolis, MN, USA) termékei voltak.

A macrophagok CD68 antigénjére specifikus, fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált egér MAb-ot, a tetrametilrodamin-izotiocianáttal (TRITC) jelzett, nyúlban termelt anti-egér immunglobulin (Ig) konjugátumot és a TRITC-cel jelölt, sertésben termelt anti-nyúl Ig konjugátumot a DAKO cégtől szereztük be. A FITC-cel jelzett, nyúlban termelt anti-egér- és a sertésben termelt anti-nyúl-immunglobulin szintén a DAKO cégtől származott.

Immunfluoreszcens technikák (IFA)

A HCMV IE és L antigénjét kifejező, valamint az IL-8 és a TGF- β 1 citokineket produkáló sejteket kettős immunfluoreszcenciával identifikáltuk. Ezt a módszert használtuk a HIV-1 Tat és p24 fehérjét expresszáló, valamint az IL-1 β , IL-6 és TNF- α citokineket termelő sejtek azonosítására is. Ehhez először a fenti antigénekre specifikus indirekt IFA-t, majd FITC-cel konjugált anti-CD68 MAb felhasználásával direkt IFA-t végeztünk. Ehhez a vizsgálathoz a sejteket tárgylemez-alapú palackban (Nunc) tenyésztettük. A sejt kultúrákról a tápfolyadékot leszívtuk, háromszor mostuk PBS-sel, majd 80 %-os jéghideg acetonnal a tárgylemezre fixáltuk. Ezután háromszor PBS-sel, kétszer 1 % FCS tartalmú PBS-sel (PBS-FCS) mostuk 5-5 percig. Az anti-IE (1:40), anti-pp65 (1:20), anti-IL-8 (1:40), anti-TGF- β 1 (1:40), illetve az anti-Tat (1:1000), anti-p24 (1:40), anti-IL-1 β (1:40), anti-IL-6 (1:40), vagy anti-TNF- α (1:40) primer ellenanyaggal a sejteket szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk, ezután háromszor, 5-5 percig mostuk PBS-FCS-ben. (Az ellenanyagok neve után zárójelben a

hígítás mértékét adjuk meg.) Ezt követően a megfelelő TRITC konjugátumot (1:30) adtuk a mintákhoz, és azokat újabb 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, utána háromszor mostuk a sejteket PBS-FCS-sel. A direkt IFA során a FITC-cel konjugált anti-CD68 MAb-ot (1:40) inkubáltuk a mintákkal szobahőmérsékleten 30 percig. Ezt követően a sejteket háromszor PBS-FCS-sel, kétszer PBS-sel, végül desztillált vízzel mostuk 5-5 percig. A preparátumokat ragasztó géllal (DAKO) és fedőlemezzel lezártuk, majd fluoreszcens mikroszkópban (Leitz Orthoplan, Wetzlar, Németország) vizsgáltuk. A FITC konjugátumok esetén az excitációs fény hullámhossza 495 nm, az emittált fényé pedig 525 nm volt. A TRITC-cel konjugált minták esetén a gerjesztő fény hullámhossza 555 nm, míg a kibocsátotté 570 nm volt.

A pszeudotípus vírusok előállításakor a perzisztensen fertőzött sejtekben a HIV-1 p24 fehérje expresszióját, valamint a fertőzött syncytiotrophoblast tenyészetekben a VSV proteinek megjelenését indirekt citoplazma IFA-val az alábbiak szerint mutattuk ki:

A szuszpenziós kultúrákban szaporodó Sup-T1 és U937 sejteket háromszor mostuk PBS-sel, majd acetonnal tárgylemezre fixáltuk. Az IFA-hoz a syncytiotrophoblastokat tárgylemez-alapú palackban tenyésztettük, és 80 %-os acetonnal fixáltuk. A fixálás után a sejteket háromszor mostuk PBS-FCS-ben. Az anti-p24 (1:40) illetve az anti-VSV (1:100) primer ellenanyaggal a sejteket szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk, majd háromszor mostuk PBS-FCS-ben. Ezt követően a fluoreszkáló festékekkel jelzett szekunder ellenanyagot (1:40) adtuk a mintákhoz, és azokat újabb 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezután a sejteket háromszor PBS-FCS-sel, kétszer PBS-sel, végül desztillált vízzel mostuk 5-5 percig. A preparátumokat ragasztó géllal (DAKO) és fedőlemezzel lezártuk, majd fluoreszcens mikroszkópban (Leitz Orthoplan) értékeltük. Az excitációs fény hullámhossza 495 nm, az emittált fényé pedig 525 nm volt.

Az immunfluoreszcens vizsgálatokat megfelelő pozitív és negatív kontrollok használatával végeztük el.

Citokintermelés vizsgálata

Az IL-8 és TGF- β 1, illetve az IL-1 α , IL-1 β , IL-6, GM-CSF, M-CSF és TNF- α termelés kvantitatív kimutatásához szendvics ELISA módszeren alapuló kiteket használtunk (R & D Systems). A citokinek mennyiségét a különböző (kokultivációs, csak macrophagokat, illetve csak syncytiotrophoblastokat tartalmazó) sejtenyészetek felülúszóiból határoztuk meg, a gyártó előírásainak megfelelően.

EREDMÉNYEK

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

A HCMV szaporodásának vizsgálata fertőzött syncytiotrophoblastok és placenta macrophagok kokultivált tenyészetében

Annak vizsgálatára, hogy a placenta macrophagok képesek-e a cytomegalovírus expresszióját fokozni a syncytiotrophoblast sejtekben, a fertőzött ST sejteket Hofbauer sejtekkel kokultiváltuk a HCMV fertőzést követő 4. napon. Az önmagukban tenyésztett, és cytomegalovirussal fertőzött syncytiotrophoblastok felülúszójában a fertőzést követő 18 napon belül infektív viriont nem lehetett detektálni. Ezzel szemben a fertőzött ST sejtek és a placenta macrophagok kokultivációja fertőzőképes virionok termelődését eredményezte (*I. dolgozat 1. ábra*). Vírusürítés először a kokultiváció kezdetétől számított 4. napon volt kimutatható, és a 6. napon volt a legnagyobb mértékű. A vírustermelés a 10. napig kis mértékben, majd azután jelentősen csökkent.

A HCMV IE és pp65 fehérjéinek expressziója

A HCMV sejtekbe történő bejutásának és replikációjának bizonyítására, a vírus IE és pp65 fehérjét immunfluoreszcenciás módszerrel vizsgáltuk. A sejt típusokat a macrophagokra jellemző CD68 antigének kimutatásával azonosítottuk. Az önmagukban tenyésztett, HCMV-vel fertőzött ST sejtekben a fertőzés után már 1 nappal detektálható volt az IE gén expressziója, és 3 nap alatt 13 %-ra emelkedett az IE antigén-pozitív sejtek aránya. Ezekben a tenyészetekben pp65 protein egyáltalán nem volt kimutatható (az adatokat nem mutatjuk). A kokultivált, HCMV-vel fertőzött ST sejtekben az IE fehérjék expressziója meredeken emelkedett a kokultiváció 2 – 4. napján (*I. dolgozat 2. ábra*). Az IE antigének legnagyobb mértékű kifejeződését a 4 – 6. napon lehetett megfigyelni, ekkor a sejtek körülbelül 74 %-ában voltak detektálhatóak. A kokultiváció 3. napján a syncytiotrophoblastokban a pp65 antigén megjelenését észleltük (*I. dolgozat 3. ábra A, B*). A pp65 antigénre pozitív sejtek aránya az 5. napon érte el a legnagyobb, körülbelül 63 %-os értéket, majd a 9. napig nagyjából ezen az állandó szinten maradt (*I. dolgozat 2. ábra*). A kettős immunfluoreszcenciás vizsgálatok során kiderült, hogy az IE antigének a kokultiváció kezdete

után 6 nappal a macrophagokban is megjelentek (*I. dolgozat 3. ábra C, D*). Az IE fehérjét expresszáló Hofbauer sejtek aránya a 9. napon volt a legnagyobb, 76 % (*I. dolgozat 2. ábra*). A kokultiváció 8. napján a macrophagokban a pp65 antigén is kimutatható volt (*I. dolgozat 3. ábra E, F*). Egy nappal később a placenta macrophagok 48 %-a mutatott pp65 antigén-specifikus fluoreszcenciát (*I. dolgozat 2. ábra*). Ezek a megfigyelések egyértelműen bizonyítják, hogy a HCMV-vel fertőzött sejtek átadták a vírust a kokultivált macrophagoknak.

A citokintermelés vizsgálata a fertőzetlen, a HCMV-vel fertőzött és a kokultivált sejtenyészetekben

Annak eldöntésére, hogy citokineknek van-e szerepe a vírusszaporodás indukálásában, az IL-8 és a TGF- β 1 szekréciónak vizsgáltuk fertőzetlen, HCMV-vel fertőzött és kokultivált sejtkultúrákban (*I. dolgozat 4. ábra*).

A fertőzetlen syncytiotrophoblast kultúrákban kismennyiségű, folyamatos IL-8 szekréciónak tapasztaltunk (0,8 ng/ml). A fertőzetlen macrophagok is termeltek IL-8-at - akár RPMI-1640, akár KGM tápfolyadékot használtunk a tenyésztéshez – közel 2,4 ng/ml mennyiségben. A HCMV-vel fertőzött ST sejtekben az IL-8 ürítés kissé fokozódott a fertőzetlen sejtekhez viszonyítva. A fertőzött ST sejtek és a placenta macrophagok együttes tenyésztésekor az IL-8 szekréciónak jelentős fokozódását tapasztaltuk a kultúrák felülűszójában. A citokintermelés a kokultiváció 3. napján volt a legnagyobb (17,8 ng/ml), majd fokozatosan csökkent a következő 6 nap alatt. Meglepő volt, hogy a fertőzetlen ST sejtek és a Hofbauer sejtek kokultivációs tenyészetében is hasonló nagyságú és kinetikájú IL-8 termelést detektáltunk (*I. dolgozat 4. ábra*).

A konstitutívan termelt TGF- β 1 mennyisége a syncytiotrophoblastokban 3,6 ng/ml, a macrophagokban 2,8 ng/ml volt (*I. dolgozat 5. ábra*). Az ST sejtek TGF- β 1 ürítése nem növekedett számottevően a HCMV fertőzés hatására. Ezzel szemben a HCMV-fertőzött ST sejtek és a placenta macrophagok kokultivációja nagymértékű TGF- β 1 szekréciónak eredményezett. A maximális TGF- β 1 kibocsátást a kokultiváció 3. napján észleltük (21,8 ng/ml). A citokin ürítése a 9. nappal fokozatosan lecsökkent. Lényegében ugyanezeket az eredményeket kaptuk, amikor fertőzetlen ST sejteket és Hofbauer sejteket tenyésztettünk együtt (*I. dolgozat 5. ábra*).

Annak meghatározására, hogy a kokultivált tenyészetekben milyen sejtekben fokozódik az IL-8 és a TGF- β 1 termelés, kettős immunfluoreszcenciát alkalmaztunk. Eredményeink szerint mind az IL-8 (*I. dolgozat 6. ábra*), mind a TGF- β 1 fokozott termeléséért az ST sejtekhez tapadt macrophagok a felelősek (*I. dolgozat 7. ábra*).

A citokineket blokkoló ellenanyagok hatása a HCMV szaporodására a kokultivált tenyészetekben

Az előbbi eredményeink alapján feltételeztük, hogy a kokultiváció hatására fokozódó citokintermelés indukálhatja a HCMV szaporodását. A kérdés megválaszolásához IL-8 és TGF- β 1 elleni neutralizáló ellenanyagokat használtuk hogy blokkoljuk a citokinek hatását. A blokkoló ellenanyagokat (a sejtek legnagyobb citokinszekrécióját alapul véve) tízszeres feleslegben adtuk a sejtekhez. A kezelés akkor kezdődött, amikor a macrophagokat hozzáadtuk a fertőzött ST sejtekhez, és további 10 napig folytatódott. Az anti-IL-8 kezelés hatására 24-ed, az anti-TGF- β 1 kezelés hatására 35-öd részére csökkent az infektív HCMV títtere a sejt kultúrák felülúszójában (*I. dolgozat 8. ábra*). A kezelések hatására a HCMV ürítés időtartama is rövidebb lett. Amikor az anti-IL-8 és az anti-TGF- β 1 kezelést kombináltuk, nem tudtunk infektív viriont kimutatni a sejtek felülúszójában.

A VSV fertőzőképességének vizsgálata syncytiotrophoblast sejteken

Kísérleteink során a syncytiotrophoblast sejtek szabad HIV-1 virionokkal történő fertőzésének lehetőségét a vesicularis stomatitis vírus pszeudotípusaival kívántuk tisztázni. Először azt kellett megvizsgálnunk, hogy a VSV képes-e permisszíven fertőzni a syncytiotrophoblast sejteket. Ehhez 5×10^5 syncytiotrophoblast sejtet fertőztünk többféle multiplicitással (5×10^5 , 5×10^4 és 5×10^3 PFU VSV / 5×10^5 ST sejt), majd a sejtek felülúszójában különböző időpontokban meghatároztuk a virionok mennyiségét (*II. dolgozat 1. ábra*). A sejt kultúrák felülúszójában virionok jelentek meg, minél nagyobb volt a fertőzés multiplicitása annál korábbi időpontban (5×10^5 PFU esetén 5, 5×10^4 PFU esetén 8, míg 5×10^3 PFU esetén 10 órával a fertőzést követően). A maximális titer 5×10^5 PFU / 5×10^5 ST sejt multiplicitás esetén 11 órával a fertőzést követően 7×10^7 PFU/ml, 5×10^4 PFU esetén 18 órával a fertőzés után 5×10^7 PFU/ml, míg 5×10^3 PFU esetén 20 óra elteltével 1×10^7 PFU/ml volt. A VSV fertőzés hatására a syncytiotrophoblastok lekerekedtek és elpusztultak (*II. dolgozat 2. ábra*).

A VSV proteinek expresszióját a fertőzött syncytiotrophoblastokban indirekt citoplazma IFA-val, nyúl anti-VSV antiszérum felhasználásával mutattuk ki. Ehhez 5×10^5 syncytiotrophoblast sejtet 5×10^4 PFU VSV-vel fertőztünk. VSV-specifikus fluoreszcenciát először 6 órával a fertőzést követően tudtunk kimutatni, míg maximális intenzitást 12 óra múlva tapasztaltunk (*II. dolgozat 3. ábra*).

VSV(HIV-1) pszeudotípusok előállítás

Kísérleteink következő szakaszában a T-lymphotróp IIIB és MN, a kettős tropizmusú RF és a macrophagtróp Ada-M és Ba-L HIV-1 törzsekkel VSV pszeudotípusokat állítottunk elő U937 és Sup-T1 sejttenyészetekben. Ennek során a krónikusan fertőzött, HIV-1 termelő sejteket VSV-vel felülfertőztük a korábban leírtaknak megfelelően. Kontrollként a VSV-t HIV-vel nem fertőzött U937 és Sup-T1 sejtekben is szaporítottuk. Meghatároztuk a különböző sejtek által termelt összes VSV mennyiségét, majd ezt követően megvizsgáltuk, hogy létrejöttek-e és milyen mennyiségben pszeudotípusok. A vizsgálathoz anti-VSV szérumot, valamint VSV(HIV-1_{IIIB}), VSV(HIV-1_{RF}) és VSV (HIV-1_{MN}) pszeudotípusok esetén HIV neutralizáló szérumot, VSV(HIV-1_{Ba-L}) és VSV(HIV-1_{Ada-M}) pszeudotípusoknál HIV-specifikus immunglobulint használtunk. A pszeudotípusok titerét a HIV-1 törzsek tropizmusának megfelelően, IIIB, RF és MN HIV-1 törzssel pszeudotipizált VSV esetén CEM-SS sejteken, míg Ada-M és Ba-L HIV-1 törzssel pszeudotipizált VSV esetén macrophag kultúrákon határoztuk meg. A vírusokat a fertőzést megelőzően 1 órán át, 37°C-on inkubáltuk a megfelelő immunszérummal. A kísérletek eredményeit a *II. dolgozat I. táblázatában* tüntettük fel. Az antiszérumok specificitásának igazolására normál nyúl, illetve humán szérumkontrollt alkalmaztunk. A normál szérumnak neutralizáló hatása nem volt. A csak VSV-vel fertőzött sejtek által termelt vírus szinte teljes mennyiségét neutralizálni lehetett anti-VSV immunszérummal. Ugyanakkor a HIV-1-termelő sejtek felülfertőzéséből származó VSV egy része rezisztens volt a kezelésre. Mivel azonban ezeknek a vírusoknak a nagy részét HIV neutralizáló szérummal, illetve HIV-specifikus immunglobulinnal neutralizálni tudtuk, ez bizonyította, hogy létrejöttek VSV(HIV-1) pszeudotípus partikulák. A pszeudotípus vírusok titere $3,8 \times 10^4$ és $7,4 \times 10^4$ PFU/ml érték között volt.

VSV(HIV-1) pszeudotípusok fertőzőképességének vizsgálata syncytiotrophoblast sejteken

Összehasonlítottuk a VSV és VSV(HIV-1) pszeudotípusok fertőzőképességét syncytiotrophoblastokban és a HIV-1 törzsek tropizmusának megfelelő célsejtekben (IIIB, MN és RF HIV-1 törzsekkel pszeudotipizált VSV esetében CEM-SS sejtekben, míg Ada-M és Ba-L törzsekkel pszeudotipizált VSV esetében macrophagokban). A vizsgálat során 5×10^5 célsejtet fertőztünk 5×10^4 PFU VSV-vel vagy VSV(HIV-1) pszeudotípussal tízszeres feleslegben alkalmazott VSV antiszérum jelenlétében. Az eredményeket a *II. dolgozat 4. ábráján* foglaltuk össze. A VSV(HIV-1_{MN}), a VSV(HIV-1_{RF}) és a VSV(HIV-1_{Ada-M}) nem bizonyultak infektívnek syncytiotrophoblastok esetében (a plakk-képző aktivitás nem haladta

meg a neutralizált VSV-nél kapott értéket). Ugyanakkor a IIIB és Ba-L HIV-1 törzsekkel pszeudotipizált VSV megfertőzte a syncytiotrophoblastokat. Ezen pszeudotípusok plakk-képző aktivitása a syncytiotrophoblastokban tízszer kisebb volt, mint a macrophagok (VSV(HIV-1_{Ba-L})), illetve a CEM-SS sejtek esetén (VSV(HIV-1_{IIIB})), de mintegy százszorosan meghaladta a neutralizált VSV plakk-képző aktivitását.

HIV-1 burokantigének szerepének vizsgálata a VSV(HIV-1_{Ba-L}) és VSV(HIV-1_{IIIB}) syncytiotrophoblastba való bejutásában

Annak bizonyítására, hogy e két pszeudotípusnak a syncytiotrophoblast sejtekbe való bejutásáért a IIIB, illetve a Ba-L HIV-1 törzsek burokantigénjei felelősek, anti-HIV-1 immunszérumoknak (HIV-1 neutralizáló szérum és HIV-specifikus immunglobulin) a vírusszaporodásra kifejtett hatását vizsgáltuk. Kontrollként nem pszeudotipizált VSV-t használtunk. Az antiszérumok specificitásának vizsgálatához normál, humán szérumot alkalmaztunk (az adatokat nem ábrázoltuk, de ebben az esetben semmilyen neutralizáló hatást nem figyeltünk meg). A vizsgálat során 5×10^5 ST sejtet fertőztünk 5×10^4 PFU VSV-vel vagy VSV(HIV-1) pszeudotípussal. A vírusokat a fertőzést megelőzően 1 órán át 37°C -on inkubáltuk az anti-HIV-1 szérumokkal. A fertőzést követően különböző időpontokban meghatároztuk a sejtek felülúszójában a vírustitert (*II. dolgozat 5. ábra*). Nem pszeudotipizált VSV esetén sem a HIV-1 neutralizáló szérum, sem a HIV-specifikus immunglobulin nem fejtett ki gátló hatást. Ugyanakkor a VSV(HIV-1_{Ba-L}) pszeudotípussal történő fertőzéskor a HIV-specifikus immunglobulin erősen gátolta a syncytiotrophoblastokba való bejutást. A HIV neutralizáló szérum ennek a pszeudotípusnak a penetrációját nem akadályozta meg. A VSV(HIV-1_{IIIB}) pszeudotípus syncytiotrophoblastba való bejutását mindkét szérum gátolta. A HIV neutralizáló szérum hatása erősebbnek bizonyult, hiszen itt legkorábban 32 órával a fertőzést követően tudtunk viriont kimutatni, és a maximális titer is csak 10^3 nagyságrendű volt. Míg a HIV-specifikus immunglobulint alkalmazva vírusürítést először a 28. órában figyeltünk meg, és a maximális titer 8×10^4 PFU/ml volt.

A penetráció mechanizmusának vizsgálata syncytiotrophoblast sejteken VSV(HIV-1_{Ba-L}) és VSV(HIV-1_{IIIB}) pszeudotípusokkal történő fertőzés esetén

A bejutás mechanizmusának vizsgálatához anti-CD4, anti-CXCR4, anti-CCR5 és anti-CCR3 monoklonális ellenanyagokat használtunk külön-külön illetve a koreceptorokat és a CD4 receptort együttesen is blokkolva. VSV(HIV-1_{IIIB}) pszeudotípus esetén CD4-, CXCR4- és CCR3-receptorokat gátló, míg VSV(HIV-1_{Ba-L}) vírussal való fertőzéskor anti-CD4, anti-

CCR5 és anti-CCR3 ellenanyagokat használtunk. A sejteket (syncytiotrophoblastokat és kontrollként macrophagokat, valamint CEM-SS sejteket) a fertőzés előtt 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk az ellenanyagokkal, majd 5×10^5 sejtet fertőztünk 5×10^4 PFU VSV(HIV-1_{IIIb}) illetve VSV(HIV-1_{Ba-L}) pszeidotípusokkal. Kontrollként normál, egér IgG-t használtunk. Az eredményeket a *II. dolgozat II. táblázatában* foglaltuk össze.

VSV(HIV-1_{IIIb})-vel történő fertőzés esetén azt tapasztaltuk, hogy syncytiotrophoblastnál sem külön-külön az anti-CD4, anti-CXCR4 és az anti-CCR3, sem pedig együtt az anti-CD4 és a koreceptorokra specifikus ellenanyagoknak nem volt blokkoló hatása. Ugyanakkor a kontroll CEM-SS sejtek fertőzésénél az anti-CD4, az anti-CXCR4, az anti-CD4+anti-CXCR4 és az anti-CD4+anti-CCR3 is gátolta a penetrációt. A korábbi közleményekben leírtakkal egyezően [Björndal et al., 1997; Ghorpade et al., 1998] az önmagában alkalmazott anti-CCR3 azonban itt sem akadályozta meg a sejtbe való bejutást. VSV(HIV-1_{Ba-L}) pszeidotípussal történő fertőzéskor a syncytiotrophoblastokba való bejutást nem gátolta az anti-CD4, az anti-CCR5 és az anti-CCR3 szérumok egyenkénti alkalmazása, illetve a CD4 receptor és a koreceptorok együttes blokkolása sem. Ugyanakkor macrophagok esetében minden kezelés sikeresen gátolta a penetrációt, kivéve a CCR3 receptor önmagában történő blokkolását.

HIV-1 termelés vizsgálata fertőzött syncytiotrophoblastokban és kokultivált sejtek tenyészetében

Kísérleteink során arra voltunk kíváncsiak, hogy a placenta macrophagokkal történő kokultiváció hatással van-e a HIV-1 replikációjára a fertőzött syncytiotrophoblastokban. A vizsgálatokhoz a HIV-1 Ba-L törzset használtuk, mert transzplacentálisan főleg a macrophagtróp törzsek jutnak át, és a megelőző kísérletek szerint ez a törzs képes megfertőzni az ST sejteket. Fertőzött syncytiotrophoblastok, valamint fertőzött ST sejtek és fertőzetlen placenta macrophagok kokultivációs tenyészetének felülúszójában vizsgáltuk a HIV-1 termelést (*III. dolgozat 1. ábra*). A HIV-vel fertőzött syncytiotrophoblast sejtek felülúszójában vírust nem tudtunk kimutatni a fertőzést követő 22 nap alatt. A fertőzött syncytiotrophoblastok és a Hofbauer sejtek kokultivációja azonban HIV-1 termelést eredményezett. A felülúszóban a kokultiváció utáni 5. napon volt először kimutatható a HIV-1 p24 antigén. Ennek a vírusspecifikus fehérjének a koncentrációja a kokultivációs tenyészet felülúszójában az 5. napon 430 pg/ml volt, a 16. napra 1950 pg/ml-re növekedett, majd a kokultiváció 20. napjára 1420 pg/ml-re csökkent. Mivel a p24 antigén jelenléte nem jelenti feltétlenül azt, hogy a sejtek fertőzőképes vírust ürítenek, ezért a felülúszók syncytiumképző

aktivitását is vizsgáltuk. A HIV-1 p24 antigén mennyiségével összhangban azt kaptuk, hogy az infektív virionok ürítése a kokultiváció 16. napján volt a legnagyobb (8×10^3 SFU/ml), majd fokozatosan csökkent.

A HIV-1 Tat és p24 fehérjék kimutatása a sejt kultúrákban

A HIV-1 génexpressziójának tanulmányozásához immunfluoreszcenciás vizsgálatokat végeztünk, amelyek során a Tat és a p24 vírus-specifikus fehérjék megjelenésének kinetikáját követtük nyomon a különböző sejt kultúrákban. Az önmagukban tenyésztett, HIV-vel fertőzött ST sejtekben sem Tat, sem p24 protein nem volt kimutatható (az adatokat nem mutatjuk). A kettős immunfluoreszcenciás vizsgálatok alapján – a macrophag-specifikus CD68 marker és a virális proteinek kimutatása egyszerre történt –, a placenta macrophagokkal kokultivált, fertőzött ST sejtekben a Tat fehérje már a kokultivációt követő 2. napon detektálható volt (*III. dolgozat 2. ábra és 3. ábra A, B*). A *tat* gén termékének expressziója meredeken emelkedett a 3. és 6. nap között. A Tat protein kifejeződése a 6 – 12. napon volt a legnagyobb mértékű, amikor a sejteknek körülbelül 76 %-ában lehetett kimutatni (*III. dolgozat 2. ábra*). A p24 protein a HIV-fertőzött ST sejtekben a kokultiváció 4. napján volt először kimutatható (*III. dolgozat 3. ábra C, D*). A p24 antigén-pozitív sejtek aránya a 8. napon érte el a maximális értéket, ekkor a sejteknek megközelítőleg 67 %-a mutatott p24 antigén-specifikus fluoreszcenciát. A p24 antigén expressziója közel állandó maradt a 14. napig (*III. dolgozat 2. ábra*). A kettős immunfluoreszcenciával azt is sikerült kimutatnunk, hogy a kokultiváció 7. napján a Tat fehérje a macrophagokban is megjelent (*III. dolgozat 3. ábra E, F*). A Tat proteint expresszáló sejtek száma azután gyorsan növekedett, a 12. napon a Hofbauer sejtek 81 %-a volt Tat-pozitív (*III. dolgozat 2. ábra*). A fertőzött ST sejtekkel kokultivált placenta macrophagokban a p24 antigén is detektálható volt. A 9. napon lehetett először kimutatni (*III. dolgozat 3. ábra G, H*), és a 14 - 16. napon volt a legnagyobb a p24 antigén-specifikus fluoreszcenciát mutató sejtek aránya (73 %). Mindez azt bizonyítja, hogy a fertőzött ST sejtekből ürülő vírus megfertőzte a macrophagokat.

A citokintermelés vizsgálata fertőzetlen, HIV-fertőzött és kokultivált sejttenyészetekben

Mivel a közvetlen sejt-sejt kapcsolat különböző citokinek képződését indukálhatja, azt feltételeztük, hogy a kokultivált sejtek által termelt citokineknek kulcsszerepe lehet a HIV-1 génexpressziójának fokozásában. Ezért fertőzetlen, HIV-fertőzött, valamint kokultivált sejt kultúrákban vizsgáltuk az IL-1 α , IL-1 β , IL-6, GM-CSF, M-CSF és a TNF- α szekrécióját. A különböző tenyészetek felülúszójából meghatározott időközönként mintát vettünk, majd az

össze gyűjtött mintákban meghatároztuk a citokinek mennyiségét. Egyetlen sejtkultúrában sem volt mérhető szintű az IL-1 α , a GM-CSF és az M-CSF szekréció (az adatokat nem mutatjuk).

A fertőzetlen ST sejtek és a placenta macrophagok folyamatosan termeltek IL-6-ot, de annak a mennyisége kevesebb volt mint 20 pg/ml (*III. dolgozat 4. ábra*). A syncytiotrophoblastok HIV-vel való fertőzése nem növelte meg a sejtek IL-6 szekrécióját. Ha azonban fertőzetlen ST sejteket Hofbauer sejtekkel tenyésztünk együtt, a sejtkultúra felülúszójában jelentős IL-6 ürítést észleltünk. A kokultiváció által indukált IL-6 termelés az első napon volt a maximális (5175 pg/ml), majd meredeken csökkent. A kokultiváció 6. napjára IL-6 szekréció visszasüllyedt az alapszintre. A HIV-fertőzött ST sejtek és a placenta macrophagok kokultivációs tenyészetében az IL-6 termelésnek egy második hulláma is kialakult. A 4. napon kezdődő ismételt növekedés után a 10. napon 7250 pg/ml értéket ért el. Az IL-6 termelés a következő négy napon nagyjából azonos szinten maradt, majd lecsökkent.

A fertőzetlen syncytiotrophoblastok és a Hofbauer sejtek konstitutív TNF- α termelése nem érte el a 10 pg/ml mennyiséget (*III. dolgozat 5. ábra*). A fertőzött ST sejtek tenyészetében nem volt szignifikánsan nagyobb a TNF- α ürítés. A fertőzetlen ST sejtek és a placenta macrophagok kokultivációja azonban fokozta a TNF- α szekréciót. A legnagyobb TNF- α mennyiséget az 1. napon mértük (480 pg/ml), majd a TNF- α szekréció a 7. napra visszaállt a konstitutív termelés szintjére. Ha fertőzött ST sejteket és placenta macrophagokat tenyésztünk együtt a TNF- α ürítésben a kezdeti csúcs után a 10. napon egy második csúcsot (1250 pg/ml) tapasztaltunk. A 10. nap után a TNF- α termelés jelentősen csökkent.

A *III. dolgozat 6. ábráján* látható, hogy sem a fertőzetlen, sem a fertőzött ST sejtek nem ürítettek spontán IL-1 β -t. Az önmagukban tenyésztett placenta macrophagok is csak kis mértékben (8 pg/ml) termelték a citokint. A fertőzetlen syncytiotrophoblastok és a Hofbauer sejtek kokultivációja sem eredményezett fokozott IL-1 β kibocsátást. Ezzel szemben a HIV-fertőzött ST sejtek és a placenta macrophagok kokultivációja során a 6-10. nap között megnövekedett az IL-1 β termelés, a legnagyobb koncentráció 265 pg/ml volt. A 10. napot követően az IL-1 β szekréció lecsökkent.

Kettős immunfluoreszcenciával határoztuk meg, hogy a kokultivációs tenyészetekben mely sejtek felelősek a fokozott IL-1 β , IL-6 és TNF- α ürítésért. A fertőzetlen ST sejtek és a Hofbauer sejtek együttes tenyésztése esetén, a kokultiváció kezdete után 24 órával vizsgáltuk az IL-6 és a TNF- α termelést. A vizsgálat eredménye szerint (*III. dolgozat 7. ábra*) a syncytiotrophoblastokhoz tapadó macrophagokban volt intenzív IL-6-specifikus fluoreszcencia látható. Az anti-TNF- α ellenanyagok is elsősorban a Hofbauer sejtekkel reagáltak, az ST sejtekben alig volt fluoreszcencia detektálható. (*III. dolgozat 8. ábra*). HIV-

fertőzött ST sejtek és a placenta macrophagok tenyésztésében a kokultiváció után 10 nappal határoztuk meg az IL-1 β -t, IL-6-ot és a TNF- α -t szekretáló sejteket. Az anti-IL-1 β ellenanyag főleg a macrophagokkal lépett reakcióba, az ST sejtekben halvány fluoreszcencia volt látható (*III. dolgozat 9. ábra*). Az anti-IL-6 és az anti-TNF- α ellenanyagokkal elvégzett vizsgálatok során lényegében ugyanezeket az eredményeket kaptuk.

A citokineket blokkoló ellenanyagok hatása a HIV-1 replikációjára a kokultivált tenyészetekben

Azt, hogy a citokineknek milyen szerepe lehet a HIV-1 replikációjának fokozódásában, blokkolós kísérletekkel vizsgáltuk. Ezek során az anti-IL-1 β , az anti-IL-6 és az anti-TNF- α neutralizáló ellenanyagokat tízszeres feleslegben alkalmaztuk. A HIV-fertőzött ST sejtek és a placenta macrophagok együttes tenyésztése során, először a kokultiváció kezdetekor, majd 6 napig naponta adtuk az antitesteket. A kezelést külön-külön, és az ellenanyagokat kombinálva is elvégeztük. Az anti-TNF- α kezelés 12-ed, az anti-IL-6 kezelés 35-öd részére csökkentette a sejtek felülúszójában az infektív HIV-1 virionok mennyiségét (*III. dolgozat 10. ábra*). A kombinált anti-IL-6 és anti-TNF- α kezeléskor a felülúszóban nem lehetett infektív virionot detektálni a 22 napos vizsgálati periódus alatt. Az anti-IL-1 β kezelés önmagában alkalmazva lényegében nem volt hatással a HIV-1 szaporodására a kokultivált tenyészetekben. A kombinált kezelésekből az anti-IL-1 β ellenanyag nem tudta fokozni a blokkoló hatását sem az anti-IL-6, sem az anti-TNF- α antitesteknek (az adatokat nem mutatjuk).

MEGBESZÉLÉS

Az *in vitro* vizsgálatok többsége szerint a HCMV nem képes permisszíven szaporodni a syncytiotrophoblastokban [Rosenthal et al., 1981; Sinzger et al., 1993; Van Lijnschoten et al., 1994]. A cytomegalovírus transzplacentális átvitelét modellező kísérleteink során mi is ezt az eredményt kaptuk. Halwachs-Baumann és munkatársai (1998) véleménye szerint a vírus teljes replikációs ciklusa végbemegy az ST sejtekben. A megfertőzött kultúrák szinte valamennyi sejtjében kimutatták a HCMV struktúr fehérjéit. A vizsgálatainkhoz használt ST kultúrák azonban körülbelül 5 %-nyi fibroblastot is tartalmaztak. A fibroblastok vagy a közvetlen kontaktus, vagy citokinek termelése révén stimulálhatták a HCMV szaporodását a trophoblastokban. Hasonló jelenséget figyeltek meg Ho és munkatársai (1996). Eredményeik szerint a tüdő eredetű fibroblastok képesek voltak a HIV-1 expresszióját fokozni promonocytá sejtben. Hemmings és munkacsoportja (1996) nagytisztaságú ST tenyészetet fertőzött HCMV-vel. A sejtpopuláció kevesebb mint 3 %-ában a vírus produktív replikációját mutatták ki. A sejtek által ürített vírus mennyisége nagyon eltérő volt a különböző trophoblast preparátumokban, néhány esetben nem is lehetett infektív vírust detektálni a kultúra felülúszójában. *In vivo*, a fertőzött ST sejtek egy idő után lelöködnék a chorionbolyhok felszínéről, a trophoblastok ugyanis – más hámszövethez hasonlóan – képesek megújítani felszínüket [Smith et al., 1997]. Ezt, és a HCMV-nek az ST sejtekben tapasztalt korlátozott szaporodását figyelembe véve, nehéz megmagyarázni a primer anyai fertőzéskor tapasztalható magas (40 %) transzplacentális átviteli arányt.

Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a syncytiotrophoblastok és a placenta macrophagok kölcsönhatása fokozni képes a HCMV replikációját az ST sejtekben. A kokultivált sejtek felülúszójában jelentős mennyiségű infektív viriont tudunk detektálni. A folyamat kinetikáját úgy határoztuk meg, hogy a pp65-pozitív sejteket azonosítottuk a fertőzött ST sejtek és a Hofbauer sejtek kokultivációs tenyészetében különböző időpontokban. A pp65 antigén a vírusszaporodás korai és késői fázisában is kimutatható. Megjelenése a HCMV produktív replikációs ciklusára utal [Weiner et al., 1985; Grefte et al., 1993]. A pp65 fehérjét a sejtek passzívan is felvehetik, leukocyták esetében ezt Grefte és munkacsoportja (1994) írta le. A mi modell rendszerünkben nem ez történt, ugyanis a pp65 antigén megjelenése előtt mindkét sejttypusban detektálhatók voltak az IE antigének.

Eredményeink szerint, miután az ST sejtekben produktívvá vált a HCMV szaporodási ciklusa, a kokultivációs tenyészetekben a Hofbauer sejtek is fertőzötté váltak. *In vivo*, a

megfertőződött macrophagok továbbíthatják a vírust a placenta más sejtjei és a chorionbolyhok kapillárisai felé. Ezt alátámaszthatja az a megfigyelés, hogy cytomegalovírus okozta placentitis esetén a macrophagokban virális antigéneket lehet kimutatni [Sinzger et al., 1993].

Kimutattuk, hogy HCMV replikációjának stimulálását a kokultiváció során a macrophagok által nagy mennyiségben termelt IL-8 és TGF- β 1 okozza. Bár nem ismerjük az ST sejtek és a placenta macrophagok kölcsönhatásának molekuláris mechanizmusát, valószínűleg fontos szerepet játszanak ebben azok az adhéziós molekulák, amelyek mindkét sejtípus felszínén megtalálhatóak [Xiao et al., 1997].

Az IL-8 és a TGF- β 1 hatását blokkoló ellenanyagok segítségével kimutattuk, hogy a két citokin együttesen jobban fokozta a HCMV replikációját, mint külön-külön. Ez azzal magyarázható, hogy míg a TGF- β 1 egy celluláris transzkripciós faktoron keresztül (nuclear factor-1, NF-1) a fő IE-promoterre hat és a nagyon korai gének expresszióját fokozza, addig az IL-8 a nagyon korai és a késői virális proteinek mennyiségét is képes növelni [Murayama et al., 1994; Murayama et al., 1998].

Vizsgálataink eredményei szerint az ST réteg és a Hofbauer sejtek közötti kölcsönhatásnak fontos szerepe lehet a HCMV szétterjedésében a placenta szövetei között. A HCMV transzplacentális átvitele azonban – még az anya primer fertőzése esetén is – ritkábban következik be, mint amit az *in vitro* kísérleteink eredményei alapján feltételeznénk. Az *in vivo* és az *in vitro* megfigyelések közötti eltérést megmagyarázhatja, hogy egyrészt az ST sejtek fertőzéséhez nagyszámú infektiós viriont tartalmazó inokulum szükséges [Hemmings et al., 1998; Goldstein et al., 1988], másrészt a fertőzés helyéhez tapadt NK (natural killer) sejtek elpusztíthatják a fertőzötté vált syncytiotrophoblastokat [Zdravkovic et al., 1994]. Ezek a körülményeknek csökkenthetik a cytomegalovírus magzatba történő átjutásának valószínűségét.

A HIV-1 transzplacentális terjedésének vizsgálata során, először a syncytiotrophoblast sejtek szabad HIV-1 víruspartikulákkal történő fertőzésének lehetőségét kívántuk tisztázni, a vesicular stomatitis vírus (VSV) pszeudotípusaival. A T-lymphotróp IIIB illetve a macrophagtróp Ba-L HIV-1 törzsekkel pszeudotipizált VSV képes volt a syncytiotrophoblastokba bejutni. Ezzel szemben a T-lymphotróp MN, a macrophagtróp Ada-M és a kettős tropizmusú RF [Doranz et al., 1997] törzsekkel pszeudotipizált VSV nem bizonyult infektiósnak. Eredményeink alapján a HIV-1 törzsek eredeti, T-lymphocytákra illetve macrophagokra vonatkoztatott tropizmus és a syncytiotrophoblast sejtekbe történő bejutása között nincs összefüggés. Hasonló megfigyelésről számolt be Tateno és

munkacsoportja (1989), akik szerint a HIV-1 izolátumoknak a humán fibroblast sejteken tapasztalt fertőzőképessége, valamint az izolátumok eredete és T-sejt illetve macrophag tropizmusa között nincs összefüggés. A syncytiotrophoblastok tehát megfertőzhetők sejtmentes HIV-1 virionnal, de a penetráció képessége törzsspecifikus. Mindez arra utal, hogy csak egyes anyai HIV-1 variánsok képesek áthatolni a trophoblast rétegen. További vizsgálatokkal kell kideríteni, hogy a különböző variánsok burok glikoproteinjeinek szerkezete és a syncytiotrophoblastokra vonatkoztatott tropizmusa között mi a kapcsolat.

A HIV bejutása a $CD4^+$ T-lymphocytákba és macrophagokba membránfúzióval történik. Ennek során a vírus gp120 glikoproteinje először a CD4 receptorhoz, majd egy koreceptor molekulához kötődik. Az így létrejövő konformációs változás teszi lehetővé, hogy a gp41 glikoprotein kapcsolatba lépjen a sejt felszínén lévő fúziós receptorral. A HIV-1 izolátumok analízise során megállapították, hogy azok a sejtropizmusuktól függően különböző kemokin receptorokat használnak koreceptorként. A T-lymphotróp HIV-1 törzsek számára a CXCR4 [Feng et al., 1996], míg a macrophagtrópok esetén a CCR5 [Dragic et al., 1996] a koreceptor. A CCR3 szerepe kevésbé tisztázott. Abban az esetben, ha a célsejt felszínén a CCR3 nagy mennyiségben jelen van, T-lymphotróp és macrophagtróp törzsek bejutásában is szerepe lehet [Alkhatib et al., 1997; Rucker et al., 1997]. Kimutatták azonban, hogy a macrophagtróp HIV-1 törzsek a primer macrophagokba való bejutáshoz nem használják a CCR3-t, annak ellenére, hogy jelentős mennyiségben expresszálódik ezeknek a sejteknek a felszínén [Rana et al., 1997; Ghorpade et al., 1998]. A T-lymphocytákon kevés CCR3-t lehet kimutatni, ezért valószínűleg nincs szerepük a T-lymphotróp törzsek bejutásában [Ponath et al., 1996]. A prototípus T-sejttróp törzsek is inkább a CXCR4 révén fertőzik meg a $CD4^+$ sejteket [Björndal et al., 1997]. Úgy tűnik, hogy a CCR3 molekulát a kettős tropizmusú törzsek használják macrophagokba vagy dendritikus sejtekbe való bejutáshoz [Rana et al., 1997; Rubbert et al., 1998]. A blokkolási kísérletek eredményei azt jelzik, hogy a HIV-1 sem CD4-et, sem kemokin receptorokat nem használ a syncytiotrophoblast sejtek fertőzése során. Ezt alátámasztják azok a megfigyelések, miszerint a syncytiotrophoblastok felszínéről hiányoznak a CD4 [Lairmore et al., 1993], a CXCR4 és a CCR5 [Moussa et al., 1999] molekulák. A CD4-receptortól független HIV fertőzést többféle sejttypusban kimutattak, így az idegrendszer sejteiben [Harouse et al., 1989], izomsejtekben [Clapham et al., 1989], kötőszöveti sejtekben [Tateno et al., 1989], májsejtekben [Cao et al.,

1990], colorectális epithéliumban [Omary et al., 1991] és endothel sejtekben [Moses et al., 1993]. A HIV-1 a CD4-negatív sejtekbe mannóz receptorok [Ezekowitz et al., 1989], galaktozil-ceramid receptorok [Bhat et al., 1991; Fantini et al., 1993] vagy egy membránhoz kötött, gp120-at kötő protein [Curtis et al., 1992] révén juthat be. A HIV-1 izolátumok megfertőzhetnek CD4-negatív sejteket olyan módon is, hogy közvetlenül kölcsönhatásba lépnek egy kemokin receptorral [Hesselgesser et al., 1997; Missé et al., 1999]. A HIV-1 a syncytiotrophoblastokba elvileg vagy közvetlen membránfúzióval, vagy endocitózissal juthat be. A syncytiotrophoblast sejtek felszínén lévő HIV-1-kötő molekulák azonosítása elősegítené a víruspenetráció mechanizmusának megértését.

A pszeidotípusokkal végzett fertőzések egyértelműen bebizonyították, hogy a virális replikáció első lépései végbemehetnek a syncytiotrophoblast sejtekben. Az *in vitro* HIV-vel fertőzött syncytiotrophoblast kultúrákban a legjobb esetben is csak igen csekély mértékű vírusürítés figyelhető meg [Mano and Chermann, 1991; Zachar et al., 1991b; Fazely et al., 1995]. A penetrációt követően a vírusreplikáció gátolt lehet a reverz transzkripció, a provirális DNS integrálódása, vagy a transzkripció szintjén. A provirális DNS jelenlétét igazoló megfigyelések alapján a transzkripció gátlása valószínű.

A lehetséges kofaktoriális tényezők közül azt vizsgáltuk, hogy lehet-e szerepe a placenta macrophagoknak a HIV-1 replikációjának indukálásában. Amikor az önmagukban tenyésztett ST sejteket megfertőztük a HIV-1 Ba-L törzsével, nem tudtuk a kultúrák felülúszójában vírust kimutatni. Ha azonban a syncytiotrophoblastokat a fertőzést követően placenta macrophagokkal kokultiváltuk, a felülúszóban detektálható volt a HIV.

Eredményeink szerint tehát az ST sejtek és a placenta macrophagok közötti kölcsönhatás a HIV-1 látens fertőzését produktívvá teheti a syncytiotrophoblastokban. Sőt, a kokultivált tenyészetekben a macrophagok is fertőzötté váltak. A vírusspecifikus Tat és p24 fehérjék megjelenésének kinetikája azt bizonyítja, hogy a HIV replikációja először az ST sejtekben vált permisszívvé, majd ezt követően a trophoblastokból ürülő vírus fertőzte meg a macrophagokat. Ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy HIV-pozitív terhes nőknél a placenta macrophagjaiban HIV-specifikus antigén és nukleinsav gyakran kimutatható [Lewis, 1990; Backé et al., 1992; Martin et al., 1992]. A fertőzött syncytiotrophoblastból és fertőzetlen macrophagból álló kokultivációs rendszerünk egy olyan jelenséget modellez, ami végbemehet a HIV transzplacentális átvitele során.

Kimutattuk, hogy a sejt-sejt kölcsönhatás, valamint a HIV fertőzés a Hofbauer sejtekben fokozott citokintermelést eredményezett. Az ST sejtekkel való együttes tenyésztés hatásaként a placenta macrophagokban az IL-6 és a TNF- α gének expressziójának gyors és átmeneti megemelkedését figyeltük meg. Jelenleg nem ismertjük még a citokinszekréció stimulálásának mechanizmusát, ezért további vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy feltárjuk a folyamatban szerepet játszó adhéziós molekulákat és szignalizációs útvonalakat.

A blokkolási kísérletekből kiderült, hogy a HIV replikációját teljes mértékben gátolni lehetett a 6 napig tartó anti-IL-6 és anti-TNF- α kezeléssel. Ebből következik, hogy a sejt-sejt kontaktus következtében kiválasztott IL-6 és TNF- α okozta a látens HIV-1 fertőzés produktívá válását a syncytiotrophoblastokban. Az anti-citokin ellenanyagokkal elvégzett vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy az IL-6 és a TNF- α együttes hatása szinergisztikus. Ez azon alapulhat, hogy eltérő módon fejtik ki aktiváló hatásukat. A TNF- α az NF- κ B celluláris transzkripciós faktoron keresztül indukálhatja a provirális DNS transzkripcióját. [Duh et al., 1989]. Az IL-6 legalább két különböző úton hat. A C/EBP transzkripciós faktor közvetítésével hat a HIV transzkripciójára [Vesonen et al., 1992; Swingler et al., 1992; Henderson et al., 1996; Cantwell et al., 1998], és fokozhatja a vírus szaporodását poszttranszkripciós szinten is [Poli et al., 1990].

A Hofbauer sejtek a kokultivációs tenyészetekben a HIV fertőzés hatására is növelték a citokinek ürítését. Több tanulmány is beszámol róla, hogy a HIV burkának glikoproteinjei és a Tat fehérje is képes fokozni az IL- β [Wahl et al., 1989; Lafrenie et al., 1997], az IL-6 [Oyaizu et al., 1991; Scala et al., 1994] és a TNF- α [Takeda-Hirokawa et al., 1997; Chen et al., 1997] termelését. A glikoproteinek a sejt felszíni CD4 receptor által mediált szignál transzdukció útján hatnak, a Tat fehérje pedig transzaktiválja a citokinek kódoló gének promotereit. A HIV-fertőzött macrophagok által termelt IL-1 β , IL-6 és TNF- α így tovább fokozhatja a fertőzött sejtek vírustermelését.

A placenta bizonyos mértékig barriert képez a HIV fertőzéssel szemben. A vírus átjutása több szinten is gátolt lehet. Vizsgálataink eredményei szerint a HIV-1 bejutása a syncytiotrophoblastokba törzsspecifikus. Ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a chorionbolyhok trophoblast sejtjeiben kimutatható víruspopulációk sokkal homogénebbek, mint azok amelyeket az anyai vér mononukleáris sejtjeiben lehet detektálni a terhesség alatt [Menu et al., 1999]. Az első akadályt tehát az ST sejtek képezik. Ismeretes, hogy a placentán szinte kizárólag csak macrophagtróp HIV-1 törzsek jutnak át [Van't Wout et al., 1994; Ometto et al., 1995]. Eredményeink szerint a mobilis Hofbauer sejtek képesek a HIV szaporodását indukálni a látensen fertőzött trophoblastokban, és az abból ürülő

macrophagtróp vírussal fertőzhető. Valószínű, hogy még a macrophagtróp törzsek transzplacentális átjutása sem abszolút érvényű. Az átvitel gyakoriságát csökkentő tényező lehet a syncytiotrophoblast réteg folyamatos cseréje. Az ST réteg időnként leválik, és az alatta elhelyezkedő cytotrophoblastokból képződik újra [Smith et al., 1997]. Ez a fertőzött sejtek számának csökkenését eredményezheti. Ezáltal csökken annak valószínűsége, hogy a placenta macrophagok „átveszik” a vírust. A HIV transzplacentális átvitele tehát egy olyan kaszkád folyamat, melynek fontos elemei a syncytiotrophoblastok és a Hofbauer sejtek is.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. Önmagukban tenyésztett és kokultivált syncytiotrophoblast sejtekben vizsgáltuk a HCMV szaporodását. Megállapítottuk, hogy a HCMV-vel fertőzött syncytiotrophoblastokban a fertőzetlen placenta macrophagokkal történő együttes tenyésztés hatására jelentős mértékben fokozódott a virális gének expressziója. A kultúrák felülúszójában nagymennyiségű infektív HCMV volt kimutatható. Az ST sejtekből ürülő virionok a macrophagokat is megfertőzték, a vírusspecifikus antigének ezekben a sejtekben is megjelentek. A placenta különböző sejtjei közötti közvetlen kölcsönhatás a macrophagokban citokinek szekrécióját eredményezte. A kokultivált ST sejtekben a HCMV génexpressziójának fokozódása a macrophagok által termelt interleukin-8 és transzformáló növekedési faktor- β 1 hatására következett be.
2. A syncytiotrophoblast sejtek sejtmentes HIV-1 virionokkal történő fertőzésének lehetőségét VSV(HIV-1) pszeudotípusokkal tisztáztuk. Vizsgálataink eredményei szerint egyes HIV-1 törzsek képesek az ST sejtekbe bejutni. A penetráció képessége nincs összefüggésben a HIV-1 törzs T-sejtekre és macrophagokra vonatkoztatott tropizmusával, és a bejutás más mechanizmussal történik, mint T-lymphocyták vagy macrophagok esetében.
3. Kimutattuk, hogy az ST sejtek és a placenta macrophagok közötti kölcsönhatás eredményeként az syncytiotrophoblastok látens HIV fertőzése permisszívvé vált. A kokultiváció során az ST sejtek átadták a vírust a macrophagoknak, melyet a virális antigének expressziójának kinetikájával igazoltunk. Vizsgálataink szerint a közvetlen sejt-sejt kapcsolat hatására a macrophagokban termelt citokinek – az interleukin-6 és a tumor nekrosis faktor- α – indukálták a HIV-1 produktív szaporodási ciklusát az ST sejtekben.
4. Eredményeink arra utalnak, hogy az ST réteg és a placenta macrophagok kölcsönhatásának jelentős szerepe lehet mind a HCMV, mind a HIV anyáról magzatra történő terjedésében.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Legelőször is hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. D. Tóth Ferenc professzor úrnak a problémafelvetésben és a kísérleti körülmények megteremtésében nyújtott segítségét. Köszönettel tartozom értékes szakmai irányításáért és hasznos tanácsaiért.

Köszönöm, hogy kollégáim, Beck Zoltán, Szabó Judit, Kiss Jolán, Juhász Attila, Kónya József, Szarka Krisztina és Veress György barátságukkal és tanácsaikkal segítették a munkámat.

Köszönet illeti Lelesz Marianna, Kozmáné Markovics Erika, Svintek Szabolcsné és Márton József asszisztenseket, valamint Csoma Eszter molekuláris biológus hallgatót, akik a kísérletek kivitelezésében segítségemre voltak.

A fotók és az ábrák elkészítésében elvülhetetlen érdemeket szerzett Andirkó István és Magyar Zoltán.

Szeretném kifejezni hálámat a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika azon munkatársainak, akik egyéb fontos teendőik mellett arra is figyeltek, hogy a vizsgálatokhoz szükséges placenták időben eljussanak hozzám.

Külön szeretnék köszönetet mondani Dr. Gergely Lajos professzor úrnak, hogy lehetővé tette számomra a Mikrobiológiai Intézetben végzett munkát.

Végül szeretném megköszönni a feleségemnek és szüleimnek, hogy munkám során mellettem álltak és biztattak.

IRODALOMJEGYZÉK

1. ALCAMI, J., PAYA, C.V., VIRELIZIER, J.L., and MICHELSON, S. (1993). Antagonistic modulation of human cytomegalovirus replication by transforming growth factor β and basic fibroblastic growth factor. *J. Gen. Virol.* **74**, 269-274.
2. ALKHATIB, G., BERGER, E.A., MURPHY, P.M., and PEASE, J.E. (1997). Determinants of HIV-1 coreceptor function on CC chemokine receptor 3: importance of both extracellular and transmembrane/cytoplasmic regions. *J. Biol. Chem.* **272**: 20420-20426.
3. ASSOIAN, R.K., FLEURDELYS, B.E., STEVENSON, H.S., MILLER, P.J., MADTES, K.D., RAINES, E.W., ROSS, R., and SPORN, M.B. (1987). Expression and secretion of type β transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6020-6024.
4. BACKÉ, E., JIMENEZ, E., UNGER, M., SCHÄFER, A., JAUNIAUX, E., and VOGEL, M. (1992). Demonstration of HIV-1 infected cells in human placenta by in situ hybridisation and immunostaining. *J. Clin. Pathol.* **45**, 871-874.
5. BARRE-SINOUSI, F., CHERMANN, J.C., REY, F., NUGEYRE, M.T., CHAMARET, S., GRUEST, J., DAUGUET, C., AXLER-BLIN, C., VEZINET-BRUN, F., ROUZIOUX, C., ROZENBAUM, W., and MONTAGNIER, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871.
6. BHAT, S., SPITALNIK, S.L., GONZALEZ-SCARANO, T., and SILBERBERG, D.H. (1991). Galactosyl ceramide or a derivative is an essential component of the neural receptor for human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7131-7134.
7. BISWAS, P., POLI, G., KINTER, A.L., JUSTEMENT, J.S., STANLEY, S.K., MAURY, W.J., BRESSLER, P., ORENSTEIN, J.M., and FAUCI, A.S. (1992). Interferon gamma induces the expression of human immunodeficiency virus in persistently infected promonocytic cells (U1) and redirects the production of virions to intracytoplasmic vacuoles in phorbol myristate acetate-differentiated U1 cells. *J. Ex. Med.* **176**, 739-750.
8. BJÖRNDAL, A., DENG, H., JANSSON, M., FIORE, J.R., COLOGNESI, C., KARLSSON, A., ALBERT, J., SCARLATTI, G., LITTMAN, D.R., FENYŐ, E.M.

- (1997). Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J. Virol.* **71**, 7478-7487.
9. BLANCHE, S., MAYAUX, M.J., ROUZIOUX, C., TEGLAS, J.P., FIRTION, G., MONPOUX, F., CIRARU-VIGNERON, N., MEIER, F., TRICOIRE, J., COURPOTIN, C., VILMER, E., GRISCELLI, C., and DELFRAISSY, J.F. (1994). Relation of the course of HIV infection in children to the severity of the disease in their mothers at delivery. *N. Engl. J. Med.* **330**, 308-312.
 10. BOURINBAIAR, A.S., and NAGORNY, R. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 infection of choriocarcinoma-derived trophoblasts. *Acta Virol.* **37**, 21-28.
 11. BRITT, W.J., and ALFORD, C.A. (1996) Cytomegalovirus. In: Fields, B.N. (ed): Virology, Third edition, pp. 2493-2524, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
 12. BURCHETT, S.K., WEAVER, W.M., WESTALL, J.A., LARSEN, A., KRONHEIM, S., and WILSON, C.B. (1988). Regulation of tumor necrosis factor/cachectin and IL-1 secretion in human mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* **140**, 3473-3481.
 13. CANTWELL, C.A., STERNECK, E., and JOHNSON, P.F. (1998). Interleukin-6-specific activation of the C/EBPdelta gene in hepatocytes is mediated by Stat3 and Sp1. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2108-2117.
 14. CAO, Y., FRIEDMAN-KIEN, A.E., HUANG, Y., LI, X.L., MIRABILE, M., MOUDGIL, T., ZUCKER-FRANKLIN, D., HO, D.D. (1990). CD4-independent, productive human immunodeficiency virus type 1 infection of hepatoma cell lines in vitro. *J. Virol.* **64**, 2553-2559.
 15. CAPOBIANCHI, M.R., BARRESI, C., BORGHI, P., GESSANI, S., FANTUZZI, L., AMEGLIO, F., BELARDELLI, F., PAPADIA, S., and DIANZANI, F. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 gp120 stimulates cytomegalovirus replication in monocytes: possible role of endogenous interleukin-8. *J. Virol.* **71**, 1591-1597.
 16. CASTELLUCCI, M., CELONA, A., BARTELS, H., STEININGER, B., BENEDETTO, V., and KAUFMANN, P. (1987). Mitosis of the Hofbauer cell: possible implications for a fetal macrophage. *Placenta* **8**, 65-76.
 17. CHANDWANI, S., GRECO, M.A., MITTAL, K., ANTOINE, C., KRASINSKI, K., and BORKOWSKY, W. (1991). Pathology and human immunodeficiency virus expression in placentas of seropositive women. *J. Infect. Dis.* **163**, 1134-1138.
 18. CHEN, H.L., YANG, Y., HU, X.L., YELAVARTHI, K.K., FISHBACK, J.L., and HUNT, J.S. (1991). Tumor necrosis factor alpha mRNA and protein are present in

- human placental and uterine cells at early and late stages of gestation. *Am. J. Pathol.* **139**, 327-335.
19. CHEN, P., MAYNE, M., POWER, C., and NATH, A. (1997). The Tat protein of HIV-1 induces tumor necrosis factor-alpha production. Implications for HIV-1-associated neurological diseases. *J. Biol. Chem.* **272**, 22385-22388.
 20. CHOWDHURY, I.H., POTACH, M.J., and VOLSKY, D.J. (1995). Redefinition of tropism of common macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **11**: 1467-1471.
 21. CLAPHAM, P.R., WEBER, J.N., WHITBY, D., MCINTOSH, K., DALGLEISH, A.G., MADDON, P.J., DEEN, K.C., SWEET, R.W., and WEISS, R.A. (1989). Soluble CD4 blocks the infectivity of diverse strains of HIV and SIV for T cells and monocytes but not for brain and muscle cells. *Nature* **337**, 368-370.
 22. CLAPHAM, P.R., WEISS, R.A., DALGLEISH, A.G., EXLEY, M., WHITBY, D., and HOGG, N. (1987). Human immunodeficiency virus infection of monocytic and T-lymphocytic cells: receptor modulation and differentiation induced by phorbol ester. *Virology* **158**, 44-51.
 23. CLOUSE, K.A., COSENTINO, L.M., WEIH, K.A., PYLE, S.W., ROBBINS, P.B., HOCHSTEIN, H.D., NATARAJAN, V., and FARRAR, W.L. (1991). The HIV-1 gp120 envelope protein has the intrinsic capacity to stimulate monokine secretion. *J. Immunol.* **147**, 2892-2901.
 24. COCKLEY, K.D. and RAPP, F. (1986) Analysis of long-term human cytomegalovirus latency in vitro. *Intervirology* **26**, 129-139.
 25. COLL, O., HERNANDEZ, M., BOUCHER, C.A., FORTUNY, C., DE TEJADA, B.M., CANET, Y., CARAGOL, I., TIJNAGEL, J., BERTRAN, J.M., and ESPANOL, T. (1997). Vertical HIV-1 transmission correlates with a high maternal viral load at delivery. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **14**, 26-30.
 26. COOPER, E.R., SCHWARTZ, T., BRENA, A., REGAN, A.M., and PELTON, S.I. (1992). Cytomegalovirus as a cofactor in transmission and progression of perinatal HIV infection. *Pediatr. AIDS HIV Infect.* **3**, 302-310.
 27. COURGNAUD, V., LAURÉ, F., BROSSARD, A., BIGNOZZI, C., GOUDEAU, A., BARIN, F., and BRÉCHOT, C. (1991). Frequent and early in utero HIV-1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **7**, 83-88.

28. CURGO, C., GUO, H.G., FRANCHINI, G., ALDOVINI, A., COLLALTI, E., FARRELL, K., WONG-STAAAL, F., GALLO, R.C., and REITZ, M.S. (1988). Envelope sequences of two new United States HIV-1 isolates. *Virology* **164**, 531-536.
29. CURTIS, B.M., SCHARNOWSKE, S., and WATSON, A.F., (1992). Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8356-8360.
30. DABIS, F., MSELLATI, P., DUNN, D., LEPAGE, P., NEWELL, M.L., PECKHAM, C., and VAN DE PERRE, P. (1993). Estimating the rate of mother-to-child transmission of HIV. *AIDS* **7**, 1139-1148.
31. DALGLEISH, A.G., BEVERLEY, P.C.L., CLAPHAM, P.R., CRAWFORD, D.H., GREAVES, M.F., and WEISS, R.A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763-767.
32. DINARELLO, C.A. (1988). Biology of interleukin 1. *FASEB J.* **2**, 108-115.
33. DORANZ, B.J., LU, Z.H., RUCKER, J., ZHANG, T.Y., SHARM, M., CEN, Y.H., WANG, Z.X., GUO, H.H., DU, J.G., ACCAVITTI, M.A., DOMS, R.W., and PEIPER, S.C. (1997). Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **71**, 6305-6314.
34. DOUGLAS, G.C., and KING, B.F. (1989). Isolation of pure villous cytotrophoblast from term placenta using immunomagnetic microspheres. *J. Immunol. Methods* **119**, 259-268.
35. DRAGIC, T., LITWIN, V., ALLAWAY, G.P., MARTIN, S.R., HUANG, Y., NAGASHIMA, K.A., CAYANAN, C., MADDON, P.J., KOUP, R.A., MOORE, J.P., and PAXTON, W.A. (1996). HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-673.
36. DUH, E.J., MAURY, W.J., FOLKS, T.M., FAUCI, A.S., and RABSON, A.B. (1989). Tumor necrosis factor α activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF- κ B sites in the long terminal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5974-5978.
37. DUNN, D.T., NEWELL, M.L., ADES, A.E., and PECKHAM, C.S. (1992). Risk of human immunodeficiency virus type 1 transmission through breast feeding. *Lancet* **340**, 585-588.

38. EHRNST, A., LINDGREN, S., DICTOR, M., JOHANSSON, B., SÖNNERBORG, A., CZAJKOWSKI, J., SUNDIN, G., and BOHLIN, A.B. (1991). HIV in pregnant women and their offspring: evidence for late transmission. *Lancet* **338**, 203-207.
39. ENDERS, A.C. (1968). Fine structure of anchoring villi of the human placenta. *Am. J. Anat.* **122**, 419-451.
40. ENDERS, A.C. (1989). Trophoblast differentiation during the transition from trophoblast plate to lacunar stage of implantation in the rhesus monkey and human. *Am. J. Anat.* **186**, 85-92.
41. EZEKOWITZ, A.B., KUHLMAN, M., GROOPMAN, J.E., and BYRN, R.A. (1989). A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus. *J. Exp. Med.* **169**, 185-196.
42. FANTINI, J., COOK, D.G., NATHANSON, N., SPITALNIK, S.L., and GONZALEZ-SCARANO, F. (1993). Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosyl-ceramide, a potential alternative gp120 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2700-2704.
43. FAZELY, F., FRY, G.N., THIRKILL, T.L., HAKIM, H., KING, B.V., and DOUGLAS, G.C. (1995). Kinetics of HIV infection of human placental syncytiotrophoblast cultures: An ultrastructural immunocytochemical study. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **11**, 1023-1030.
44. FENG, Y., BRODER, C.C., KENNEDY, P.E., and BERGER, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-membrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-877.
45. FOLKS, T.M., CLOUSE, K.A., JUSTEMENT, J., RABSON, A., DUH, E., KEHRL, J.H., and FAUCI, A.S. (1989). Tumor necrosis factor α induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2365-2368.
46. FREED, E.O. (1998). HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* **251**, 1-15.
47. GALLO, R.C., SARIN, P.S., GELMANN, E.P., ROBERT-GUROFF, M., RICHARDSON, E., KALYANARAMAN, V.S., MANN, D., SIDHU, G.D., STAHL, R.E., ZOLLA-PAZNER, S., LEIBOWITZ, J., and POPOVIC, M. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 865-867.

48. GARTNER, S., MARKOVITS, P., MARKOVITZ, D.M., KAPLAN, M.H., GALLO, R.C., and POPOVIC, M. (1986). The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* **223**, 215-219.
49. GENDELMAN, H.E., ORENSTEIN, J.M., MARTIN, M.A., FERRUA, C., MITRA, R., PHIPPS, T., WAHL, L.A., LANE, H.C., FAUCI, A.S., BURKE, D.S., SKILLMAN, D., and MELTZER, M.S. (1988). Efficient isolation and propagation of human immunodeficiency virus on recombinant colony-stimulating factor 1-treated monocytes. *J. Exp. Med.* **167**, 1428-1441.
50. GHORPADE, A., XIA, M.Q., HYMAN, B.T., PERSIDSKY, Y., NUKUNA, A., BOCK, P., CHE, M., LIMOGES, J., GENDELMAN, H.E., and MACKAY, C.R. (1998). Role of the β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 in human immunodeficiency virus type 1 infection of monocytes and microglia. *J. Virol.* **72**, 3351-3361.
51. GIBSON, W. (1996). Structure and assembly of the virion. *Intervirology* **39**, 389-400.
52. GOLDSTEIN, J., BRAVERMAN, M., SALAFIA, C., and BUCKLEY, P. (1988). The phenotype of human placental macrophages and its variation with gestational age. *Am. J. Pathol.* **133**, 648-659.
53. GREFTE, A., HARMSSEN, M.C. VAN DER GIESSEN, M., KNOLLEMA, S., VAN SON, W.J., and THE, T.H. (1994). Presence of human cytomegalovirus (HCMV) immediate early mRNA but not ppUL83 (lower matrix protein pp65) mRNA in polymorphonuclear and mononuclear leukocytes during active HCMV infection. *J. Gen. Virol.* **75**, 1989-1998.
54. GREFTE, J.M.M., VAN DER GIESSEN, M., VAN SON, W.J., and THE, T.H. (1993). Circulating cytomegalovirus infected endothelial cells in patients with an active cytomegalovirus infection. *J. Infect. Dis.* **167**, 270-277.
55. GUETTA, E., GUETTA, V., SHIBUTANI, T., and EPSTEIN, S.E. (1997). Monocytes harboring cytomegalovirus: interactions with endothelial cells, smooth muscle cells, and oxidized low-density lipoprotein. Possible mechanisms for activating virus delivered by monocytes to sites of vascular injury. *Circ. Res.* **81**, 8-16.
56. HALWACHS-BAUMANN, G., WILDERS-TRUSCHNIG, M., DESOYE, G., HAHN, T., KIESEL, L., KLINGEL, K., RIEGER, P., JAHN, G., and SINZGER, C. (1998). Human trophoblast cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J. Virol.* **72**, 7598-7602.

57. HAROUSE, J.M., KUNSCH, C., HARTLE, H.T., LAUGHLIN, M.A., HOXIE, J.A., WIGDAHL, B., and GONZALEZ-SCARANO, F. (1989). CD4-independent infection of human neural cells by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **63**, 2527-2533.
58. HARTSHORN, K.L., NEUMEYER, D., VOGT, M.W., SCHOOLEY, R.T., and HIRSCH, M.S. (1987). Activity of interferons alpha, beta, and gamma against human immunodeficiency virus replication in vitro. *AIDS. Res. Hum. Retroviruses*. Summer; **3**, 125-133.
59. HAUBER, J., PERKINS, A., HERMER, E.P., and CULLEN, B.R. (1987). Trans-activation of human immunodeficiency virus gene expression is mediated by nuclear events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6364-6368.
60. HEMMINGS, D.G., KILANI, R., NYKIFORUK, C., PREIKSAITIS, J., and GUILBERT, L.J. (1998). Permissive cytomegalovirus infection of primary villous term and first trimester trophoblast. *J. Virol.* **72**, 4970-4979.
61. HENDERSON, A.J., CONNOR, R.I., and CALAME, K.L. (1996). C/EBP activators are required for HIV-1 replication and proviral induction in monocytic cell lines. *Immunity* **5**, 91-101.
62. HESSELGESSER, J., HALKS-MILLER, M., DELVECCHIO, V., PEIPER, S.C., HOXIE, J., KOLSON, D.L., TAUB, D., and HORUK, R. (1997). CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4: functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Current Biology* **7**, 112-121.
63. HO, W.Z., LI, Y.H., ZHU, X.H., SONG, L., and DOUGLAS, S.D. (1996). Induction of HIV-1 expression in chronically infected promonocytic cells cocultured with human lung fibroblasts. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **80**, 171-178.
64. HOFFMAN, A.D., BANAPOUR, B., and LEVY, J.A. (1985). Characterization of the AIDS-associated retrovirus reverse transcriptase and optimal conditions for its detection in virions. *Virology* **147**, 326-335.
65. HORII, Y., MURAGUCHI, A., SUEMATSU, S., MATSUDA, T., YOSHIZAKI, K., HIRANO, T., and KISHIMOTO, T. (1988). Regulation of BSF-2/IL-6 production by human mononuclear cells. Macrophage-dependent synthesis of BSF-2/IL-6 by T cells. *J. Immunol.* **141**, 1529-1535.
66. ISHIKAWA, Y., MUKAIDA, N., KUNO, K., RICE, N., OKAMOTO, S., and MATSUSHIMA, K. (1995). Establishment of lipopolysaccharide-dependent nuclear factor κ B activation in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* **270**, 4158-4164.

67. JOKHI, P.P., KING, A., and LOKE, Y.W. (1994). Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human trophoblast cells and by decidual large granular lymphocytes. *Hum. Reprod.* **9**, 1660-1669.
68. KAMEDA, T., MATSUZAKI, N., SAWAI, K., OKADA, T., SAJI, F., MATSUDA, T., HIRANO, T., KISHIMOTO, T., and TANIZAWA, O. (1990). Production of interleukin-6 by normal human trophoblast. *Placenta* **11**, 205-213.
69. KAZAZI, F., MATHIJS, J.M., CHANG, J., MALAFIEJ, P., LOPEZ, A., DOWTON, D., SORRELL, T.C., VADAS, M.A., AND CUNNINGHAM, A.L. (1992). Recombinant interleukin 4 stimulates human immunodeficiency virus production by infected monocytes and macrophages. *J. Gen. Virol.* **73**, 941-949.
70. KESSON, A.M., FEAR, W.R., WILLIAMS, L., CHANG, J., KING, N.J.C., and CUNNINGHAM, A.L. (1994). HIV infection of placental macrophages: their potential role in vertical transmission. *J. Leukoc. Biol.* **56**, 241-246.
71. KESSON, A.M., FEAR, W.R., KAZAZI, F., MATHIJS, J.M., CHANG, J., KING, N.J.C., and CUNNINGHAM, A.L. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 infection of human placental macrophages in vitro. *J. Infect. Dis.* **168**, 571-579.
72. KILANI, R.T., CHANG,, L.J., GARCIA-LLORET, M.I., HEMMINGS, D., WINKLER-LOWEN. B, and GUILBERT, L.J. (1997). Placental trophoblasts resist infection by multiple human immunodeficiency virus (HIV) type 1 variants even with cytomegalovirus coinfection but support HIV replication after provirus transfection. *J. Virol.* **71**, 6359-6372.
73. KINTER, A.L., POLI, G., FOX, L., HARDY, E., and FAUCI, A.S. (1995). HIV replication in IL-2-stimulated peripheral blood mononuclear cells is driven in an autocrine/paracrine manner by endogenous cytokines. *J. Immunol.* **154**, 2448-2459.
74. KOYANAGI, Y., O'BRIEN, W.A., ZHAO, J.Q., GOLDE, D.W., GASSON, J.C., and CHEN, I.S. (1988). Cytokines alter production of HIV-1 from primary mononuclear phagocytes. *Science* **241**, 1673-1675.
75. KRIVINE, A., FIRTION, G., CAO, L., FRANCOUAL, C., HENRION, R., and LEBON, P. (1992). HIV replicating during the first weeks of life. *Lancet* **339**, 1187-1189.
76. LAFRENIE, R.M., WAHL, L.M., EPSTEIN, J.S., YAMADA, K.M., and DHAWAN, S. (1997). Activation of monocytes by HIV-Tat treatment is mediated by cytokine expression. *J. Immunol.* **159**, 4077-4083.

77. LAIRMORE, M.D., CUTHBERT, P.S., UTLEY, L.L., MORGAN, C.J., DEZZUTTI, C.S., ANDERSON, C.L., SEDMAK, D.D. (1993). Cellular localization of CD4 in the human placenta. Implications for maternal-to-fetal transmission of HIV. *J. Immunol.* **151**, 1673-1681.
78. LALLEMANT, M., JOURDAIN, G., LE-COEUR, S., KIM, S., KOETSAWANG, S., COMEAU, A.M. PHOOLCHAROEN, W., ESSEX, M., MCINTOSH, K., and VITHAYASAI, V. (2000). A trial of shortened zidovudine regimens to prevent mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *N. Engl. J. Med.* **343**, 982-991.
79. LANDESMAN, S.H., KALISH, L.A., BURNS, D.N., MINKOFF, H., FOX, H.E., ZORRILLA, C., GARCIA, P., FOWLER, M.G, MOFENSON, L., TUOMALA, R. (1996). Obstetrical factors and the transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to child. The Women and Infants Transmission Study. *N. Engl. J. Med.* **334**, 1617-1623.
80. LAURÉ, F., COURGNAUD, V., ROUZIQUX, C., BLANCHE, S., VEBER, F., BURGARD, M., JACOMET, C., GRISCELLI, C., and BRÉCHOT, C. (1988). Detection of HIV DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. *Lancet* **332**, 538-541.
81. LEWIS, S.H., REYNOLDS-KOHLER, C., FOX, H.E., and NELSON, J.A. (1990). HIV-1 in trophoblastic and villous Hofbauer cells, and haematological precursors in eight-week fetuses. *Lancet* **335**, 565-568.
82. LUCIW, P. (1996). Human immunodeficiency viruses and their replication. In: Fields, B.N. (ed): *Virology*, Third edition, pp. 1881-1952, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
83. LUZURIAGA, K., MCQUILKEN, P., ALIMENTI, A., SOMASUNDARAN, M., HESSELTON, R.A., and SULLIVAN, J.L. (1993). Early viremia and immune responses in vertical human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Infect Dis.* **167**, 1008-1013.
84. LYSIAK, J.J., HUNT, J., PRINGLE, G.A., and LALA, P.K. (1995). Localization of transforming growth factor β and its natural inhibitor decorin in the human placenta and decidua throughout gestation. *Placenta* **16**, 221-231.
85. MANO, H., and CHERMANN, J.C. (1991). Replication of human immunodeficiency virus type 1 in primary cultured placental cells. *Res. Virol.* **142**, 95-104.

86. MARÓDI, L. (szerk.) (1998a). Neonatológia fejezet, Gyermekgyógyászat, 259-260. Medicina Könyvkiadó
87. MARÓDI, L. (szerk.) (1998b). Infektológia fejezet, Gyermekgyógyászat, 323-324. Medicina Könyvkiadó.
88. MARTIN, A.W., BRADY, K., SMITH, S.I., DECOSTE, D., PAGE, D.V., MALPICA, A., WOLF, B., and NEIMAN, R.S. (1992). Immunohistochemical localization of human immunodeficiency virus p24 antigen in placental tissue. *Hum. Pathol.* **23**, 411-414.
89. MAURY, W., POTT, B., and RABSON, A.R. (1989). HIV-1 infection of first-trimester and term human placental tissue: a possible mode of maternal-fetal transmission. *J. Infect. Dis.* **160**, 583-588.
90. MAYAUX, M.J., BLANCHE, S., ROUZIQUX, C., LE CHENADEC, J., CHAMBRIN, V., FIRTION, .G., ALLEMON, M.C., VILMER, E., VIGNERON, N.C., and TRICOIRE, J. (1995). Maternal factors associated with perinatal HIV-1 transmission: the French Cohort Study: 7 years of follow-up observation. The French Pediatric HIV Infection Study Group. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **8**, 188-194.
91. MAZERON, M.C., JAHN, G., and PLACHTER, B. (1992). Monoclonal antibody E-13 (M-810) to human cytomegalovirus recognizes an epitope encoded by exon 2 of the major immediate early gene. *J. Gen. Virol.* **73**, 2699-2703.
92. MENU, E., KÉOU, F.X.M., LAGAYE, S., PISSARD, S., MAUCLÉRE, P., SCARLATTI, G., MARTIN, J., GOOSSENS, M., CHAOUAT, G., and BARRÉ-SINOUSSE, F. (1999). Selection of maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in human placenta. *J. Infect. Dis.* **179**, 44-51.
93. MISSÉ, D., CERUTTI, M., NORAZ, N., JOURDAN, P., FAVERO, J., DEVAUCHELLE, G., YSSEL, H., TAYLOR, N, and VEAS, F. (1999). A CD4-independent interaction of human immunodeficiency virus-1 gp120 with CXCR4 induces their cointernalization, cell signaling, and T-cell chemotaxis. *Blood* **93**, 2454-2462.
94. MOCARSKI, E.S. (1996) Cytomegalovirus and their replication. In: Fields, B.N. (ed): Virology, Third edition, pp. 2447-2492, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
95. MONTANER, L.J., DOYLE, A.G., COLLIN, M., HERBEIN, G., ILLEI, P., JAMES, W., MINTY, A., CAPUT, D., FERRARA, P., and GORDON, S. (1993). Interleukin

- 13 inhibits human immunodeficiency virus type 1 production in primary blood-derived human macrophages in vitro. *J. Exp. Med.* **178**, 743-747.
96. MOSES, A.V., BLOOM, F.E., PAUZA, C.D., and NELSON, J.A. (1993). Human immunodeficiency virus infection of human brain capillary endothelial cells occur via a CD4/galactosylceramide-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10474-10478.
97. MOUSSA, M., MOGNETTI, B., DUBANCHET, S., MENU, E., ROQUES, P., GRAS, G., DORMONT, D., BARRE-SINOUSI, F., and CHAOUAT, G. (1999). Vertical transmission of HIV: Parameters which might affect infection of placental trophoblasts by HIV-1: A review. *Am. J. Reprod. Immunol.* **41**, 312-319.
98. MURAYAMA, T., KUNO, K., JISAKI, F., OBUCHI, M., SAKAMURO, D., FURUKAWA, T., MUKAIDA, N., and MATSUSHIMA, K. (1994). Enhancement of human cytomegalovirus replication in a human fibroblast cell line by interleukin-8. *J. Virol.* **68**, 7582-7585.
99. MURAYAMA, T., MUKAIDA, N., KHABAR, K.S.A., and MATSUSHIMA, K. (1998). Potential involvement of IL-8 in the pathogenesis of human cytomegalovirus infection. *J. Leukocyte Biol.* **64**, 62-67.
100. NAKAMURA, K., EIZURU, Y., and MINASHIMA, Y. (1988). Effect of natural human interferon-beta on the replication of human cytomegalovirus. *J. Med. Virol.* **26**, 363-373.
101. NARA, P.L., HATCH, W.C., DUNLOP, N.M., ROBEY, W.G., ARTHUR, L.O., GONDA, M.A., and FISCHINGER, P.J. (1987). Simple, rapid, quantitative, syncytium-forming microassay for the detection of human immunodeficiency virus neutralizing antibody. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **3**, 283-302.
102. NEWELL, M.L., and PECKHAM, C. (1993). Risk factors for vertical transmission of HIV-1 and early markers of HIV-1 infection in children. *AIDS* **7**, Suppl. 1, S91-S97.
103. NORAZ, N., LATHEY, J.L., and SPECTOR, S.A. (1997). Human cytomegalovirus-associated immunosuppression is mediated through interferon-alpha. *Blood* **89**, 2443-2452.
104. OMARY, M.B., BRENNER, D.A., GRANDPRE, L.Y., ROEBUCK, K.A., RICHMAN, D.D., and KAGNOFF, M.F. (1991). HIV-1 infection and expression in human colonic cells: infection and expression in CD4+ and CD4- cell lines. *AIDS* **5**, 257-281.

105. OMETTO, L., ZANOTTO, C., MACCABRUNI, A., CASELLI, D., TRUSCIA, D., GIAQUINTO, C., RUGA, E., CHIECO-BIANCHI, L., and DE ROSSI, A. (1995). Viral phenotype and host-cell susceptibility to HIV-1 infection as risk factors for mother-to-child HIV-1 transmission. *AIDS* **9**, 427-434.
106. OSBORN, L., KUNKEL, S., and NABEL, G.J. (1989). Tumor necrosis factor α and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2336-2340.
107. OYAIZU, N., CHIRMULE, Y.O., KALYANARAMAN, V.S., and PAHWA, S. (1991). Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins gp120 and gp160 induce interleukin-6 production in CD4+ T-cell clones. *J. Virol.* **65**, 6277-6282.
108. PARRY, S.L., SEBBAG, M., FELDMANN, F., and BRENNEN, F.M. (1997). Contact with T cells modulates monocyte IL-10 production: role of T cell membrane TNF- α . *J. Immunol.* **158**, 3673-3681.
109. PAULESU, L., KING, A., LOKE, Y.W., CINTORINO, M., BELLIZZI, E., and BORASCHI, D. (1991). Immunohistochemical localization of IL-1 α and IL-1 β in normal human placenta. *Lymphokine Cytokine Res.* **10**, 443-448.
110. PECKHAM, C.S. (1994). Human immunodeficiency virus infection and pregnancy. *Sex. Transm. Dis.* **21**, S28-S31.
111. PERNO, C.F., YARCHOAN, R., COONEY, D.A., HARTMAN, N.R., WEBB, D.S., HAO, Z., MITSUYA, H., DOHNS, D.G., and BRODER, S. (1989). Replication of human immunodeficiency virus in monocytes. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) potentiates viral production yet enhances the antiviral effect mediated by 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT) and other dideoxynucleoside congeners of thymidine. *J. Exp. Med.* **169**, 933-951.
112. PITT, J., BRAMBILLA, D., REICHELDERFER, P., LANDAY, A., MCINTOSH, K., BURNS, D., HILLYER, G.V., MENDEZ, H., and FOWLER, M.G. (1997). Maternal immunologic and virologic risk factors for infant human immunodeficiency virus type 1 infection: findings from the Women and Infants Transmission Study. *J. Infect. Dis.* **175**, 567-575.
113. POLI, G., BRESSLER, P., KINTER, A., DUH, E., TIMMER, W.C., RABSON, A., JUSTEMENT, J.S., STANLEY, S., and FAUCI, A.S. (1990). Interleukin 6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor α by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J. Exp. Med.* **172**, 151-158.

114. PONATH, P.D., QIN, S., POST, T.W., WANG, J., WU, L., GERARD, N.P., NEWMAN, W., GERARD, C., and MACKAY, C.R. (1996). Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. *J. Exp. Med.* **183**, 2437-2448.
115. POPOVIC, M., SARNGADHARAN, M.G., READ, E., and GALLO, R.C. (1984). Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**, 497-500.
116. RAMBALDI, A., YOUND, D.C., and GRIFFIN, J.D. (1987). Expression of M-CSF (CSF-1) gene by human monocytes. *Blood* **69**, 1409-1413.
117. RANA, S., BESSON, G., COOK, D.G., RUCKER, J., SMYTH, R.J., YI, Y., TURNER, J.D., GUO, H.H., DU, J.G., PEIPER, S.C., LAVI, E., SAMSON, M., LIBERT, F., LIESNARD, C., VASSART, G., DIMS, R.W., PARMENTIER, M., and COLLMAN, R.G. (1997). Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the *deltaccr5* mutation. *J. Virol.* **71**, 3219-3227.
118. ROGERS, M.F., OU, C.H., RAYFIELD, M., THOMAS, P.A., SCHOENBAUM, E.E., ABRAMS, E., KRASINSKI, K., SELWYN, P.A., MOORE, J., KAUL, A., GRIMM, K.T., BAMJI, M., and SCHOCHETMAN, G. (1989). Use of the polymerase chain reaction for early detection of the proviral sequences of human immunodeficiency virus in infants born to seropositive mothers. *N. Engl. J. Med.* **320**, 1649-1654.
119. ROQUES, P., MARCE, D., COURPOTIN, C., MATHIEU, F.P., HERVE, F., BOUSSIN, F.D., NARWA, R., MEYOHAS, M.C., DOLLFUS, C. and DORMONT, D. (1993). Correlation between HIV provirus burden and in utero transmission. *AIDS* **7**, Suppl. 2, S39-S43.
120. ROSENTHAL, L.J., PANITZ, P.J., CRUTCHFIELD, D.B., and CHOU, J.Y. (1981). Cytomegalovirus replication in primary and passaged human placental cells. *Intervirology* **16**, 168-175.
121. ROTHE, M., CHENE, L., NUGEYRE, M.T., BRAUN, J., BARRÉ-SINOUSI, F., and ISRAEL, N. (1998). Contact with thymic epithelial cells as a prerequisite for cytokine-enhanced human immunodeficiency virus type 1 replication in thymocytes. *J. Virol.* **72**, 5852-5861.

122. ROWE, W.P., HARTLEY, J.W., WATERMAN, S., TURNER, H.C., and HUEBNER, R.J. (1956). Cytopathic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**, 418-424.
123. RUBBERT, A., COMBADIÈRE, C., OSTROWSKI, M., ARTHOS, J., DYBUL, M., MACHADO, E., COHN, M.A., HOXIE, J.A., MURPHY, P.M., FAUCI, A.S., and WEISSMAN, D. (1998). Dendritic cells express multiple chemokine receptors used as coreceptors for HIV entry. *J. Immunol.* **160**, 3933-3941.
124. RUCKER, J., EDINGER, A.L., SHARON, M., SAMSON, M., LEE, B., BERSON, J.F., YI, Y., MARGULIES, B., COLLMAN, R.G., DORANZ, B.J., PARMENTIER, M., and DOMS, R.W. (1997). Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.* **71**, 8999-9007.
125. SAITO, S., MOTOYOSHI, K., SAITO, M., KATO, Y., ENOMOTO, M., NISHIKAWA, K., MORII, T., and ICHIJO, M. (1993). Localization and production of human macrophage colony-stimulating factor (hM-CSF) in human placental and decidual tissues. *Lymphokine Cytokine Res.* **12**, 101-107.
126. SCALA, G., RUOCCO, M.R., AMBROSINO, C., MALLARDO, M., GIORDANO, V., BALDASSARE, F., DRAGONETTI, E., QUINTO, I., and VENUTA, S. (1994). The expression of the interleukin 6 gene is induced by the human immunodeficiency virus 1 TAT protein. *J. Exp. Med.* **179**, 961-971.
127. SCHRIER, R.D., MCCUTCHAN, J.A., and WILEY, C.A. (1993). Mechanisms of immune activation of human immunodeficiency virus in monocytes/macrophages. *J. Virol.* **67**, 5713-5720.
128. SCHUITEMAKER, H., KOOTSTRA, N.A., KOPPELMAN, M.H., BRUISTEN, S.M., HUISMAN, H.G., TERSMETTE, M., and MIEDEMA, F. (1992). Proliferation-dependent HIV-1 infection of monocytes occurs during differentiation into macrophages. *J. Clin. Invest.* **89**, 1154-1160
129. SCHWARTZ, D.A., KHAN, R., and STOLL, B. (1992). Characterization of the fetal inflammatory response to cytomegalovirus placentitis. An immunohistochemical study. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **116**, 21-27.
130. SEDMAK, D.D., CHAIWIRIYAKUL, S., KNIGHT, D.A., and WALDMANN, W.J. (1995). The role of interferon beta in human cytomegalovirus-mediated inhibition of HLA DR induction on endothelial cells. *Arch Virol.* **140**, 111-126.

131. SHIMOYA, K., MATSUZAKI, N., TANIGUCHI, T., KAMEDA, T., KOYAMA, M., NEKI, R., SAJI, F., and TANIZAWA, O. (1992). Human placenta constitutively produces interleukin-8 during pregnancy and enhances its production in intrauterine infection. *Biol. Reprod.* **47**, 220-226.
132. SINZGER, C., MUNTEFERING, H., LONING, T., STOSS, H., PLACHTER, B., and JAHN, G. (1993). Cell types infected in human cytomegalovirus placentitis identified by immunohistochemical double staining. *Pathol. Anat. Histopathol.* **423**, 249-256.
133. SMITH, S.C., SYMONDS, E.M., and BARKER, P.N. (1997). Apoptosis within the trophoblast: its distinctive electron microscopy features, and the role which it plays in the pathophysiology of intrauterine growth restriction. *J. Soc. Gynecol. Invest.* **4**, 95A.
134. SÖDERBERG-NAUCLÉR, C., FISH, K.N., and NELSON, J.A. (1997). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha specifically induce formation of cytomegalovirus-permissive monocyte-derived macrophages that are refractory to the antiviral activity of these cytokines. *J Clin Invest.* **100**, 3154-3163.
135. ST LOUIS, M.E., KAMENGA, M., BROWN, C., NELSON, A.M., MANZILA, T., BATTER, V., BEHETS, F., KABAGABO, U., RYDER, R.W., and OXTOBY, M. (1993). Risk for perinatal HIV-1 transmission according to maternal immunologic, virologic, and placental factors. *JAMA* **269**, 2853-2859.
136. STAGNO, S., PASS, R.F., CLOUD, G., BRITT, W.J., HENDERSON, R.E., WALTON, P.D., VEREN, D.A., PAGE, F., and ALFORD, C.A. (1986). Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to the fetus, and clinical outcome. *JAMA* **256**, 1904-1908.
137. STARCICH, B.R., HAHN, B.H., SHAW, G.M., MCNEELY, P.D., MODROW, S., WOLF, H., PARKS, E.S., PARKS, W.P., JOSEPHS, S.F., GALLO, R.C., and WONG-STAAAL, F. (1986). Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* **45**, 637-648.
138. SULLIVAN, R., GANS, P.J., and MCCARROLL, L.A. (1983). The synthesis and secretion of granulocyte-monocyte colony stimulatory activity (CSA) by isolated human monocytes: Kinetics of the response to bacterial endotoxin. *J. Immunol.* **130**, 800-807.
139. SWINGLER, S., EASTON, A., and MORRIS, A. (1992). Cytokine augmentation of HIV-1 LTR-driven gene expression in neural cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**, 487-493.

140. TAKAHASHI, M., KITAGAWA, S., MASUYAMA, J.I., IKEDA, U., KASAHARA, T., TAKAHASHI, Y.I., FURUKAWA, Y., KANO, S., and SHIMADA, K. (1996). Human monocyte-endothelial cell interaction induces synthesis of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation* **93**, 1185-1193.
141. TAKEDA-HIROKAWA, N., NEOH, L.P., AKIMOTO, H., KANEKO, H., HISHIKAWA, T., SEKIGAWA, I., HASHIMOTO, H., HIROSE, S., MURAKAMI, T., YAMAMOTO, N., MIMURA, T., and KANEKO, Y. (1997). Role of curdlan sulfate in the binding of HIV-1 gp120 to CD4 molecules and the production of gp120-mediated TNF-alpha. *Microbiol. Immunol.* **41**, 741-745.
142. TANG, H., KUHEN, K.L., and WONG-STAAAL, F. (1999). Lentivirus replication and regulation. *Annu Rev Genet.* **33**, 133-170.
143. TATENO, M., GONZALEZ-SCARANO, F., and LEVY, J.A. (1989). Human immunodeficiency virus can infect CD4-negative human fibroblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4287-4290.
144. THEA, D.M., STEKETEE, R.W., PLINER, V., BORNSCHLEGEL, K., BROWN, T., ORLOFF, S., MATHESON, P.B., ABRAMS, E.J., BAMJI, M., LAMBERT, G., SCHOENBAUM, E.A., THOMAS, P.A., HEAGARTY, M., and KALISH, M.L. (1997). The effect of maternal viral load on the risk of perinatal transmission of HIV-1. New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. *AIDS* **11**, 437-444.
145. THIRY, L., SPRECHER-GOLDBERGER, S., JONCKHEER, T., LEVY, J., VAN DE PERRE, P., HENRIVAUX, P., COGNIAUX-LECLERC, J., and CLUMECK, N. (1985). Isolation of AIDS virus from cell-free breast milk of three healthy virus carriers. *Lancet* **II**, 891-892.
146. TODD, B., POPE, J.H., and GEORGHIOU, P (1991). Interleukin-2 enhances production in 24 hours of infectious human immunodeficiency virus type 1 in vitro by naturally infected mononuclear cells from seropositive donors. *Arch Virol.* **121**, 227-232.
147. TÓTH, F.D., MOSBORG-PETERSEN, P., KISS, J., ABOAGYE-MATHIESEN, G., HAGER, H., JUHL, C.B., GERGELY, L., ZDRAVKOVIC, M., ARANYOSI, J., LAMPÉ, L., and EBBESEN, P. (1995). Interactions between human immunodeficiency virus type 1 and human cytomegalovirus in human term syncytiotrophoblast cells coinfecting with both viruses. *J. Virol.* **69**, 2223-2232.

148. VAN LIJNSCHOTEN, G., STALS, F., EVERS, J.L., BRUGGEMAN, C.A., HAVENITH, M.H., and GERAEDTS, J.P. (1994). The presence of cytomegalovirus antigens in karyotyped abortions. *Am. J. Reprod. Immunol.* **32**, 211-220.
149. VAN'T WOUT, A.B., KOOSTRA, N.A., MULDER-KAMPINGA, G.A., ALBRECHT-VAN LEUT, N., SCHERPBIER, J., VEENSTRA, J., BOER, K., COUTINHO, R.A., MIEDEMA, F., and SCHUITEMAKER, H. (1994). Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. *J. Clin. Invest.* **94**, 2060-2067.
150. VESANEN, M., WESSMAN, M., SAMINEN, M., and VAHERI, A. (1992). Activation of integrated human immunodeficiency virus type 1 in human neuroblastoma cells by the cytokines tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *J. Gen. Virol.* **73**, 1753-1760.
151. VEY, E., DAYER, J.M., and BURGER, D. (1997). Direct contact with stimulated T cells induces the expression of IL-1 β and IL-1 receptor antagonist in human monocytes. Involvement of serine/threonine phosphatases in differential regulation. *Cytokine* **9**, 480-487.
152. WAHL, L.M., CORCORAN, M.L., PYLE, S.W., ARTHUR, L.O., HARELBELLAN, A., and FARRAR, W.L. (1989). Human immunodeficiency virus glycoprotein gp120 induction of monocyte arachidonic acid metabolites and interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 621-625.
153. WALDMAN, W.J., KNIGHT, D.A., HUANG, E.H., and SEDMAK, D.D. (1995). Bidirectional transmission of infectious cytomegalovirus between monocytes and vascular endothelial cells: an in vitro model. *J. Infect. Dis.* **171**, 263-272.
154. WEINER, D., GIBSON, W., and FIELDS, K.L. (1985). Anti-complement immunofluorescence establishes nuclear localization of human cytomegalovirus matrix protein. *Virology* **147**, 19-28.
155. WENTWORTH, B.B. and FRENCH, L. (1970). Plaque assay of cytomegalovirus strains of human origin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **135**, 253-258.
156. WILSON, C.B., HAAS, J.E., and WEAVER, W.M. (1983). Isolation, purification, and characteristics of mononuclear phagocytes from human placenta. *J. Immunol. Methods* **56**, 305-317.
157. WU, S.C., SPOUGE, J.L., MERGES, M.J., CONLEY, S.R., and NARA, P.L.L. (1996). A cytopathic infectivity assay of human immunodeficiency virus type 1 in human primary macrophages. *J. Virol. Methods* **59**, 45-55.

158. XIAO, J., GARCIA-LLORET, M., WINKLER-LOWEN, B., MILLER, R., SIMPSON, K., and GUILBERT, L.J. (1997). ICAM-1-mediated adhesion of peripheral blood monocytes to the maternal surface of placental syncytiotrophoblasts. Implications for placental villitis. *Am. J. Pathol.* **150**, 1845-1860.
159. YAMAMOTO, J.K., BARRE-SINOUSI, F., BOLTON, V., PEDERSEN, N.C., and GARDNER, M.B. (1986). Human alpha- and beta-interferon but not gamma- suppress the in vitro replication of LAV, HTLV-III, and ARV-2. *J. Interferon. Res.* **6** 143-152.
160. YAMAMOTO, N., SHIMOKATA, K., MAENO, K., and NISHIYAMA, Y. (1987). Effect of recombinant human interferon gamma against human cytomegalovirus. *Arch Virol.* **94**, 323-329.
161. YOW, M.D., WILLIAMSON, D.W., LEEDS, L.J., THOMPSON, P., WOODWARD, R.M., WALMUS, B.F., LESTER, J.W., SIX, H.R., and GRIFFITHS, P.D. (1988). Epidemiologic characteristics of cytomegalovirus infection in mothers and their infants. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **158**, 1189-1195.
162. ZACHAR, V., NORSKOV-LAURITSEN, N., JUHL, C., SPIRE, B., CHERMANN, J.C., and EBBESEN, P. (1991a). Susceptibility of cultured human trophoblasts to infection with human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* **72**, 1253-1260.
163. ZACHAR, V., SPIRE, B., HIRSCH, I., CHERMANN, J.C., and EBBESEN, P. (1991b). Human transformed trophoblast-derived cells lacking CD4 receptor exhibit restricted permissiveness for human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **65**, 2102-2107.
164. ZDRAVKOVIC, M., ABOAGYE-MATHIESEN, G., ZACHAR, V., MOSBORG-PETERSEN, P., TÓTH, F.D., LIU, X., and EBBESEN, P. (1994). In vitro cytotoxic activity of cord blood NK cells against herpes simplex virus type-1 infected purified human term villous cytotrophoblast. *Viral. Immunol.* **7**, 133-140.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezésben felhasznált közlemények:

1. **Bácsi, A.**, Aranyosi, J., Beck, Z., Ebbesen, P., Andirkó, I., Szabó, J., Lampé, L., Kiss, J., Gergely, L., and D. Tóth, F.: Placental macrophage contact potentiates the complete replicative cycle of human cytomegalovirus in syncytiotrophoblast cells: role of interleukin-8 and transforming growth factor- β 1.
J. Interferon Cytokine Res. **19**, 1153-1160 (1999) IF: 2.171
2. **Bácsi, A.**, Ebbesen, P., Szabó, J., Beck, Z., Andirkó, I., Csoma, E., and D. Tóth, F.: Pseudotypes of vesicular stomatitis virus bearing envelope antigens of various HIV-1 strains permissively infect human syncytiotrophoblasts cultured in vitro: implications for in vivo infection of syncytiotrophoblasts by cell-free HIV-1.
J. Med. Virol. **64**, 1-11 (2001) IF: 2.867
3. **Bácsi, A.**, Csoma, E., Beck, Z., Andirkó, I., Kónya, J., Gergely, L., and D. Tóth, F.,: Induction of human immunodeficiency virus type 1 replication in latently infected syncytiotrophoblast cells by contact with placental macrophages: role of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α .
J. Interferon Cytokine Res. (submitted) (2001) IF: 2.171

Egyéb közlemények:

1. Szabó, J., **Bácsi, A.**, Andirkó, I., Kiss, J., Nemes, J., and D. Tóth, F.: Reciprocal interactions between human cytomegalovirus and human T cell leukemia-lymphoma virus type I in monocyte-derived macrophages cultured in vitro.
AIDS Res. Hum. Retroviruses **14**, 699-709 (1998) IF: 2.499
2. Beck, Z., **Bácsi, A.**, Kovács, E., Kiss, J., Kiss, A., Balogh, E., Telek, B., D. Tóth, F., Andirkó, I., Oláh, É., Udvardy, M., and Rák, K.: Changes in oncogene expression implicated in evolution of chronic granulocytic leukemia from its chronic phase to acceleration.
Leukemia and Lymphoma **30**, 293-306 (1998) IF: 1.140

3. Szabó, J., **Bácsi, A.**, Beck, Z., Kiss, J., Andirkó, I., and D. Tóth, F.: Role of interleukin 8 and transforming growth factor β 1 in enhancement of human cytomegalovirus replication by human T cell leukemia-lymphoma virus type I in macrophages coinfecting with both viruses.
J. Interferon Cytokine Res. **19**, 209-217 (1999) IF: 2.171

4. Szabó, J., Beck, Z., Csomán, É., Liu, X., Andirkó, I., Kiss, J., **Bácsi, A.**, Ebbesen, P., and D. Tóth, F.: Differential patterns of interaction between HIV type I and HTLV type I in monocyte-derived macrophages cultured in vitro: Implications for in vivo coinfection with HIV type I and HTLV type I.
AIDS Res. Hum. Retroviruses **15**, 1653-1666 (1999) IF: 2.499

5. Beck, Z., Kiss, A., D. Tóth, F., Szabó, J., **Bácsi, A.**, Balogh, E., Borbély, Á., Telek, B., Kovács, E., Oláh, É., and Rák, K.: Alterations of p53 and Rb genes and the evolution of the accelerated phase of chronic myeloid leukemia.
Leukemia and Lymphoma **38**, 587-597 (2000) IF: 1.140

6. Szabó, J., Cervenák, L., D. Tóth, F., Prohászka, Z., Horváth, L., Kerekes, K., Beck, Z., **Bácsi, A.**, Erdei, A., B. Peerschke, E.I., Füst, G., Ghebrehiwet, B.: Soluble gC1q-R/p33, a cell protein that binds to the globular „Heads” of C1q effectively inhibits the growth of HIV-1 strains in cell cultures.
Clin. Immunol. **99**, 202-211 (2001) IF: 2.242

7. Beck, Z., **Bácsi, A.**, Liu, X., Szabó, J., Ebbesen, P., Andirkó, I., Csoma, E., Kónya, J., and D. Tóth, F.: Differential Patterns of Human Cytomegalovirus Gene Expression in Various T-Cell Lines Carrying Human T-Cell Leukemia-Lymphoma Virus Type I: Role of Tax-Activated Cellular Transcription Factors.
Virology (submitted) IF: 3.548

8. Tóth, F., **Bácsi, A.**, Beck, Z., Szabó, J.: Vertical transmission of human immunodeficiency virus (A review)
Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica (in press) IF: 0.0

9. Horváth, A., Bánhegyi, D., Bíró, A., Ujhelyi, E., Veres, A., Horváth, L., Prohászka, Z., **Bácsi, A.**, Tarján, V., Romics, L., Horváth, I., D. Tóth, F., Füst, G., and Karádi, I.: High level of anticholesterol antibodies (ACHA) in HIV patients. Normalization of serum ACHA concentration after introduction of HAART.

Immunobiology (submitted)

IF: 2.276

FONTOSABB ELŐADÁSOK, POSZTEREK

1. **Bácsi, A.**, Aranyosi, J., Szabó, J., Beck, Z., Ebbesen, P., D. Tóth, F.: Placental macrophage contact potentiates the complete replicative cycle of human cytomegalovirus in syncytiotrophoblast cells.
International School for Molecular Biology and Microbiology (ISMBM), 1999, Smolenice, Szlovákia
2. **Bácsi, A.**, Aranyosi, J., Ebbesen, P., D. Tóth, F.: Placental macrophage contact potentiates the complete replicative cycle of human cytomegalovirus in syncytiotrophoblast cells.
3rd Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 1999, Budapest
3. **Bácsi, A.**, Aranyosi, J., Beck, Z., Szabó, J., D. Tóth, F.: Syncytiotrophoblast cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus by contact with placental macrophage.
13th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, 1999, Budapest
4. **Bácsi, A.**, Aranyosi, J., Szabó, J., Beck, Z., D. Tóth, F.: A placenta macrophagok lehetséges szerepe a human cytomegalovírus transzplacentális átvitelében.
Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 1998, Miskolc
5. **Bácsi, A.**, Szabó, J., Nemes, J., Kiss, J., D. Tóth, F.: A humán cytomegalovírus és a human T-sejtes leukaemia-lymphoma I. típusa közötti kölcsönhatás vizsgálata CD4⁺ T-lymphocytá sejtvonalakban.
Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 1996, Nyíregyháza

6. Szabó, J., Beck, Z., **Bácsi, A.**, D. Tóth, F.: Studies on the susceptibility of natural killer cells to HIV-1 strains of various tropism.
14th European Immunology Meeting EFIS 2000, Poznan, Lengyelország
7. Beck, Z., Szabó, J., **Bácsi, A.** D. Tóth, F.: Induction of full replication cycle of human cytomegalovirus by Tax protein in CD4⁺ cells.
First Joint Meeting of the Slovenian Society for Microbiology and the Hungarian Society for Microbiology, 2000, Keszthely
8. Szabó, J., **Bácsi, A.**, Beck, Z., Kiss, J., Andirkó, I., D. Tóth, F.: Enhancement of human cytomegalovirus replication by HTLV-I in macrophages: Role of Tax-induced interleukin-8 and transforming growth factor- β 1 production.
Ninth International Conference on Human Retrovirology: HTLV 1999, Kagoshima, Japán
9. Szabó, J., Beck, Z., Csomán, É., Liu, X., Andirkó, I., Kiss, J., **Bácsi, A.**, Ebbesen, P., D. Tóth, F.: Differential patterns of interactions between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and human T-cell leukaemia-lymphoma virus type I (HTLV-I) in macrophages cultured *in vitro*: Implications for *in vivo* pathogenesis.
The Fourth European Conference on Experimental AIDS Research 1999, Tampere, Finnország