

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Humán herpeszvírus-8 szerológiai vizsgálata

Dr. Juhász Attila

Témavezető: Prof. Dr. Gergely Lajos

**Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Mikrobiológiai Intézet
2001**

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A HHV-8 taxonómiája, morfológiája, genomi szerveződése

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

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

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

A LUR feltehetően 80-nál is több különféle polipeptidet kódol, melyek közül számos a herpeszvírusokra jellegzetes replikációs enzimek, szabályozó- és struktúrfehérjék homológja. A legközelebbi humán homológ lymphocryptovírus alcsaládba tartozó EBV-vel közös régiók homológiája 60-70%-os DNS szinten. A LUR további jellegzetessége, hogy celluláris génekkel homológ kódoló szakaszokat is tartalmaz struktúráisan blokkba tömörülve a vírusgenom repetitív elemeket tartalmazó szakaszai közelében.

A HHV-8 szerepe a Kaposi szarkómában

A Kaposi szarkóma maga egy vasculáris eredetű tumor, melynek sokáig valódi tumor volta is vitatott volt. Klinikailag a Kaposi szarkóma léziók legtöbbször multiplex formában jelentkeznek a bőrön vagy nyálkahártyákon folt, plakk és tumor stádiumot különböztetve meg. A léziók egymástól függetlenül progrediálhatnak, illetve mutathatnak regressziót. A klinikum az egyes epidemiológiai formák között - klasszikus, iatrogén, afrikai endémiás és AIDS-hez társult Kaposi szarkóma- mutat lényeges eltéréseket, de az egyes formákon belül jellegzetességeket is. Szövettanilag a Kaposi szarkóma megnyúlt endothelsejtekkel határolt atipikus neoangiogenezissel, mononukleáris infiltrátummal, extravazális vörösvértestekkel, később orsó alakú sejtek proliferációjával jellemezhető. A lézió neoplasztikus komponensének a legvalószínűbben endotheliális eredetű orsósejteket tartják.

A Kaposi szarkóma valamennyi stádiumában és epidemiológiai formájában igen magas arányban (100-95%) lehet a HHV-8 jelenlétét igazolni. Kaposi szarkóma (KS) léziókban a HHV-8 DNS és RNS lokalizációjának vizsgálatát in situ technikákkal végezték el. A vírusra specifikus nukleinsavakat detektáltak a tumorra jellemző orsósejtekben, atipikus endotheliális sejtekben valamint a tumorban szintén előforduló mononukleáris sejt infiltrátumban is. A tumor stádiumú léziókban dominánsan jelenlévő orsósejtek a HHV-8 genomot cirkuláris episzómális formában hordozzák a sejtmagban. A Kaposi tumorban azonosított látens transzkriptek közül a látens nukleáris antigén-1-t (LNA-1) kódoló orf73, a virális ciklint kódoló orf72, a virális FLIP-et kódoló orf71 és a kaposint kódoló orfK12 RNS szakaszait mutatták ki. A Kaposi szarkóma lézióban jelenlévő monocita eredetű sejtekben és az orsósejtek 2-5%-ában lítikus ciklus fordul elő. A következőkben a teljesség igénye nélkül, ezen látens géntermékek és az angiogenezis gondolatkör mentén kiválasztott néhány lítikus géntermék lehetséges szerepét tekintem át a Kaposi szarkóma kialakulásában.

Orf73/LNA-1

A HHV-8-at látens formában hordozó sejtekben az orf73 által kódolt látens nukleáris antigén-1 (LNA-1) expressziója egy tricisztronális RNS molekuláról történik. Maga az RNS-transzkript sorrendben a LNA-1, v-ciklin, v-FLIP kódoló szakaszokat tartalmazza.

Immunfluoreszcens és immunhisztokémiai vizsgálatok szerint a LNA-1 speciális nukleáris testekbe koncentrálnak és jellegzetesen pöttyös mintázatot mutat a sejtmagon belül.

A vírusgenom elhelyezkedése a látensen fertőzött sejtek magjában a LNA-1 reaktív helyekre korlátozódik (co-localisatio). A LNA-1 egy doménje a vírusgenomot köti, mégpedig a vírusgenom terminális repetíciójának területén. Míg a fehérje egy másik doménje a hiszton H1-hez képes kapcsolódni. A sejtosztódáskor a LNA-1 biztosítja a vírusgenom epizómális fennmaradását a leánysejtekben. Minden valószínűség szerint a LNA-1-nek egyéb szerepe is van a látens vírusreplikáció iniciálásában és folyamatában. Ahogyan a DNS tumorvírusoknál, úgy a HHV-8-nál is megtalálható a tumorszupresszor fehérjék inaktiválásának mechanizmusa. A HHV-8 esetében a p53 potens transzkripciós aktivitását éppen a LNA-1 képes gátolni. A LNA-1 p53 interakció eredményeképpen a p53 indukálta apoptózis is gátlódik experimentális rendszerekben. Ahogyan az említett példákból kitűnik a LNA-1-nek alapvető szerepe van a vírus látens perzisztenciájának fenntartásában és ezzel összefüggésben az onkogenezisben is.

Orf72/v-ciklin

A virális ciklin a D típusú celluláris ciklinekkel mutat homológiát. A hasonlatosság funkcionális értelemben is fennáll. A normálisan celluláris D-ciklinek által aktivált ciklin dependens kinázokat (cdk6/cdk4) a v-ciklin is képes aktiválni. Azonban a v-ciklin/cdk6 komplex rezisztens a cdk inhibitor proteinek gátló hatására. A v-ciklin/cdk6 komplex képes az Rb fehérje inaktiválására annak foszforilálásával. A foszforilált Rb fehérje már nem képes az E2F transzkripciós faktorok kötésére, amelyek az S-fázisba történő átmenethez szükséges gének transzaktiválásáért felelősek. Minden bizonnyal a v-ciklin a normális sejtciklus szabályozásának megzavarásával hozzájárulhat a G₁-S fázisátmenet felgyorsításához, valamint fokozott sejtproliferációhoz.

Orf71/v-FLIP

Az orf71 által kódolt virális FLIP (Flice/caspase-8 inhibitory protein) a celluláris és más vírusok virális FLIP-jeihez hasonlóan két DED (death effector domain) homológot tartalmaz. A HHV-8 v-FLIP képes a CD95/Fas receptor útvonalon bekövetkező apoptotikus szignál gátlására. A HHV-8 v-FLIP sejthalált gátló hatása mind a szolúbilis mind a membránhoz kötött Fas ligand által bekövetkező caspase-8 aktiválódásra fennáll. Továbbá a v-FLIP transzdukált sejtvonalak tumorigenitása fokozott a v-FLIP negatív kontrolléhoz képest immunkompetens egérmodellben. Az experimentális tumormodellben a v-FLIP expresszió csökkentti az intratumorális apoptotikus sejtek arányát. Mindezek alapján feltételezhető, hogy

a v-FLIP a Kaposi szarkóma esetében a tumorsejtek védelmét szolgálhatja a sejtes immunitás effektor sejtjeivel szemben és végső soron a daganatnövekedés progressziójához járulhat hozzá.

OrfK12/kaposin

Az orfK12-ről átíródó RNS jelen van a KS orsósejtjeiben. Az általa kódolt mindössze 60 aminosavnyi hidrofób fehérje a kaposin. A kaposin gén önmagában elegendő patkány fibroblasztok tumorigenikus transzformációjához. A kaposint expresszáló sejtek alacsonyán differenciált, vaszkuláris típusú tumort hoznak létre tímuszmentes egér subcután injektálásával. A kísérletes körülmények között bizonyított, kaposint jellemző onkogén potenciál minden bizonnyal szerepet játszik a Kaposi szarkóma kialakulásában és fenntartásában is.

A HHV-8 és az angiogenezis, lítikus gének

A herpeszvírusokra jellemző produktív vírustermeléssel járó ciklus leggyakrabban a sejt lízisével jár (lítikus ciklus elnevezés). A KS lézióban a sejtek kb. 5%-ában detektálhatók lítikus transzkriptek. Ezek a sejtek a mai tudásunk szerint pusztulásra vannak ítélve, így nem szerepelnek a lézió proliferáló sejthányadában. A lítikus ciklusban aktív gének azonban meglepő módon, de mégis hozzájárulhatnak a Kaposi szarkóma lézió kialakulásához. Pontosabban azok a lítikus géntermékek, amelyek valamilyen módon parakrin hatással bírnak a környezetükben levő többi sejtre. Az alábbiakban ismertetem azokat a lítikus géntermékeket, melyek minden bizonnyal ezen a módon szerepet játszanak a KS kialakulásában.

Orf74/v-IL-8R

A HHV-8 orf74 szekvenciája alapján a celluláris IL-8 receptor (IL-8R) homológja. Az eddig ismert celluláris és virális kemokin receptoroktól eltérően a v-IL-8R agonistától függetlenül konstitutív módon aktív. Ennek eredményeként a v-IL-8R kemokin stimuláció nélküli jelátviteli folyamatot tart fenn, melynek eredménye fokozott sejtproliferáció. A virális-IL-8R-t stabilan kifejező sejtvonalak tumorigenikusak nude egérben, jellegzetesen vasculáris tumor fenotípussal. A v-IL8R transzgén egérben a Kaposi szarkómához nagymértékben

hasonló vasculáris szarkóma fejlődik ki. Ezek a hatások fenotípusosan ugyan nagymértékben a KS-ra emlékeztetnek, mégsem valószínű, hogy a v-IL-8R közvetlenül játssza szerepét a tumorsejtek proliferációjában, hiszen az azt expresszáló sejtek a lítikus dogma szerint halálra vannak ítélve. Sokkal inkább az emlegetett parakrin hatás jelentősége érhető tetten, hiszen a virális kemokin receptor homológot kifejező sejtek emelkedett VEGF szekréciót mutatnak.

v-MIP-ek

A HHV-8 genom három szakasza is a celluláris makrofág inflammatórikus protein 1 α -val (MIP) homológ virális fehérjéket (v-MIP-I-II-III) kódol. A v-MIP-I és -II embrionált tojás chorioallantoismembránján erőteljes erújdonszövetképződést indukál. A v-MIP-II szelektív T-helper-2 (Th-2) kemoattraktáns hatásáról is beszámoltak. Újabb adatok szerint a v-MIP-III is rendelkezik neangiogenetikus és Th-2 kemoattraktáns hatással. Valószínűleg a tumorra elsősorban jellemző Th-2 típusú infiltráció is a v-MIP-ek leukocita migrációt befolyásoló hatására vezethető vissza. Elképzelhető, hogy ezen hatás a vírussal fertőzött tumorsejtek esetében az antivirális immunválaszt elkerülő stratégiának is része. Nagy valószínűséggel a virális-MIP-ek parakrin hatása hozzájárul a főleg korai Kaposi-lézióra szövettanilag jellegzetes erújdonszövetképződéshez.

Endothelsejtek transzformációja HHV-8-cal

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

Amennyiben HPV16 E6-E7 génekkel transzdukált humán dermális microvasculáris endotheliális sejtkultúrát fertőznek HHV-8-cal az in vitro megfigyelt transzformáció szintén

lezajlik, azzal a különbséggel, hogy a sejtek orsósejtszerű morfológiváltozása a sejteknek csak a HHV-8 vírusgenomot tartalmazó és látens vírusantigéneket expresszáló sejtjeire korlátozódik. A HHV-8-cal nem fertőződött sejtek megtartják utcakövezetszerű morfológiájukat. A dermális microvasculáris endothelkultúrában azonban a KS tumorhoz hasonlóan a sejtek alacsony százalékában spontán produktív ciklus figyelhető meg, melynek eredménye a HHV-8 fertőzés fokozatos kiterjedése a kultúra minden sejtjére. A fentebb ismertetett kísérletes eredmények alapvető bizonyítékul szolgálnak a HHV-8 transzformáló képességéről, valamint a HHV-8-cal transzformált endothelkultúrák a vírus onkogenitásának experimentális bizonyítására szolgálhatnak állatmodellben.

A HHV-8 és egyéb kórképek

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

A HHV-8 epidemiológiája

A HHV-8 epidemiológiájának megismerésében a vírusellenes ellenanyagok detektálása adja meg a valós helyzetet leginkább tükröző képet. A szerológiai megközelítés megkívánta a HHV-8 antigénjeinek karakterizálását és egyre érzékenyebb és specifikusabb mérőmódszerek kidolgozását. Az alábbiakban röviden összefoglalom azokat a fontos HHV-8 antigéneket, amelyekre mai tudásunk szerint a vírus szerológiai vizsgálatát alapozzuk.

A HHV-8 fontos szerológiai antigénjei

LANA

A HHV-8 szerológiájának kezdetén az elsőgenerációs szerológiai próbákban a HHV-8-at látens episzomális formában hordozó testüregi lymphomasejtek (mint pl. BC-1, BCBL-1) szolgáltak antigénül indirekt immunfluoreszcens és Western-blot vizsgálatokban. Ezen vizsgálatok során a biztosan HHV-8 fertőzött Kaposi szarkómás betegek 80-90%-ának savói egy jellegzetesen nukleáris pöttyözöttséget adó fluoreszcenciát produkáltak. A LANA rövidítés ezt a specifikus morfológiájú immunreakciót adó látens vírusfertőzésre jellemző feltételezetten nem egységes nukleáris antigéncsoportot jelöli (latency associated nuclear antigens). Mások leírtak a testüregi lymphomasejtek nukleáris extraktjában Western-blot technikával szintén a Kaposi savók 80-90%-a által felismert 226-234 kDa antigénkettőst. A 226-234 kDa nukleáris antigén elleni antitestek megjelenése megelőzte a későbbi Kaposi szarkóma kialakulását HIV fertőzött személyekben. Később igazolódott, hogy a 226-234 kDa antigénkettőst az orf73 kódolja és az újonnan LNA-1-nek (latent nuclear antigen-1) keresztelt antigén immunfluoreszcens morfológiája megegyezik a LANA-éval. A LANA/LNA/LNA-1 elnevezéseket mára a tudományos közlemények többsége egymás szinonimájaként használja a több munkacsoport által is igazoltan orf73 által kódolt antigénre. Mivel az orf73-nak más humán herpeszvírusokban nincsen homológja ezért az anti-LNA-1 ellenanyag a HHV-8 fertőzés specifikus szerológiai markere. A Kaposi szarkómás egyének anti-LANA pozitív savói leggyakrabban az antigén karboxiterminális végével reagálnak. Lineáris epitóptérképezéssel kimutattak a fehérje más részén is epitópokat. Valószínű, hogy konformációs epitópok is jellemzik a LANA-t amelyek fontosak a HHV-8 szerológiájában. Éppen ezért az egész LANA-t használó anti-LANA immunfluoreszcencia egyszerűsége a módszer mindössze 70-80%-osra becsült szenzitivitása ellenére a mai napig a HHV-8

szerológia alapjaként szolgál. Főként a különböző munkacsoportok eltérő etnikai, földrajzi csoportokban végzett eredményeinek összevetéséhez nyújt elengedhetetlen támpontot az anti-LANA szerológia.

sVCA

A legközelebbi humán herpeszvírus, az EBV szerológiájában is fontos szerepet kapnak a virális strukturális antigének. Az EBV azonban nem csak támpontot, hanem problémát is jelentett a HHV-8 szerológiai vizsgálatához, hiszen az EBV-vel való nagyfokú homológia a szerológiai keresztreakciók lehetőségét veti fel. Egyes strukturális antigének, mint például az EBV orfBcLF1 által kódolt nagy kapszid fehérjéje a HHV-8 homológiával az orf25 által kódolt hasonló antigénnel 50%-ban azonos és a kettő között dokumentált szerológiai keresztreakcióra van példa. Olyan anti-lítikus immunfluoreszcens próbákban, ahol a savót alacsony hígításban vizsgálják forbol észterrel indukált, lítikus antigéneket expresszáló, testüregi limfómasejteken az alacsony szérumhígítás nagyban megnöveli a keresztreakciók lehetőségét és ellentmondásos adatokat eredményez. EBV orfBFRF3 által kódolt kis víruskapszid antigén (sVCA, small virus capsid antigen) ellen megjelenő ellenanyagok diagnosztikus értékűek az EBV fertőzés bizonyításában. A HHV-8 sVCA-t kódoló orf65 az EBV orfBFRF3-al mutatott homológiája alacsony fokú, különösen az orfBFRF3 sVCA fontos szerológiai epitópokat hordozó karboxiterminális végén. A HHV-8 sVCA 22kDa tömegű strukturális fehérje és az EBV orfBFRF3 sVCA-hoz hasonlóan szintén jó immunogén. A szerológialilag fontos epitópok a HHV-8 sVCA esetében is a polipeptidlánc karboxiterminális végén helyezkednek el. A HHV-8 orf65 karboxiterminális antigénnel nyert szerológiai eredmények kiegészítik az anti-LANA IFA-val nyert adatokat és a két antigén együttes használatával pontosabban jellemezhető a vírus szeroepidemiológiája. Az HHV-8 orf65 karboxiterminális antigénjét mind rekombináns, mind peptid antigén formátumban az anti-LANA IFA-hoz hasonlóan igen széles körben használják szeroepidemiológiai vizsgálatok céljából.

gp35-37

A forbol-észterrel indukált testüregi lymphoma sejtek cDNS könyvtárainak immunológiai tesztelése Kaposi szarkómás betegek savóival az orfK8.1-et azonosította egy domináns lítikus antigént kódoló szakaszként. Az orfK8.1-ről átírt RNS érése során három

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

Transzmissziós utak

A transzmissziós utak tekintetében a Kaposi szarkóma rizikócsoportjának tekintett HIV pozitív homoszexuális férfiak csoportjának emelkedett (kb 30%) szeroprevalenciája a vírus szexuális úton való terjedésére irányította a figyelmet. A HHV-8 szeroprevalenciája, esetleges szerokonverzió a férfi homoszexuális csoportokban a promiszkuitás mértékének, a homoszexuális aktivitás időtartamának és egyes homoszexuális praktikáknak a függvénye. Az STD klinikák beteganyagainak emelkedett szeroprevalenciája szintén a szexuális átvitel fontosságára hívja fel a figyelmet. A heteroszexuális kontaktus esetében kimutatható összefüggés az emelkedett HHV-8 szeroprevalencia és az üzletszerű szexuális életvitel között.

Az Kaposi szarkóma endémiás közép-afrikai országokban azonban már a pubertáskor előtt jelentős mértékű a szeropozitivitás. Ez ráirányítja a figyelmet a horizontális terjedés lehetőségére és fontosságára a HHV-8 fertőzés szempontjából endémiás területeken. Minden bizonnyal, más herpeszvírusokhoz hasonlóan a nem szexuális mucosális útvonal és a nyál is

szerepet játszik a HHV-8 terjedésében, hiszen a vírus DNS kimutatható volt oropharyngeális szövetekben és HIV+ páciensek nyálában is.

Vérrel, vérkészítménnyel történt átvitelre elvi lehetőség van, hiszen HHV-8-at lehet detektálni szeropozitív véradók mononucleáris sejtfrakciójában is. Az átvitel legvalószínűbben a magvas sejtfrakcióhoz kötött. Ennek megfelelően a naponta intravénás kábítószerrel használók csoportjában kimutatható a HHV-8 magasabb szeroprevalenciája. Mindazonáltal, a feltehetően közös tű használatával történt átvitel a HIV átvitelénél valószínűleg sokkal alacsonyabb frekvenciájú. Ezt támasztja alá a HIV pozitív intravénás kábítószerrel élvezők csak alacsony mértékben emelkedett Kaposi szarkóma incidenciája.

A Kaposi szarkóma transzplantáció utáni formájában a vírus grafftal történt átvitelére is vannak dokumentált esetek.

CÉLKITŰZÉSEK

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

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

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

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

MÓDSZEREK

Vírus DNS kimutatása, jellemzése

Archivált, paraffinba ágyazott szövettani blokkokból mutattunk ki HHV-8 orf26 specifikus szekvenciát nested-PCR módszerrel. Ugyanazon beteghez tartozó többszámú minta esetében a DNS amplimerek egyszálú DNS konformációs polimorfizmusának összehasonlító vizsgálatát (SSCP) is elvégeztük. Néhány esetben az SSCP eredményeket szekvenálással erősítettük meg.

Szerológiai vizsgálatok

Az anti-LANA títusú IgG ellenanyagokat indirekt immunfluoreszcenciás vizsgálattal (IFA) mutattuk ki HHV-8 pozitív BCBL-1 sejteken. Strukturális antigénekre specifikus IgG ellenanyagok kimutatására ELISA módszereket állítottunk be. Az orf65 karboxiterminális antigén esetében peptid ELISA és rekombináns antigén ELISA tesztet állítottunk be. Az eredményeket, a rekombináns antigén segítségével, Western blottal erősítettük meg. A rekombináns K8.1 antigén ELISA eredményeit, lítikusan indukált BCBL-1 sejtek segítségével, gp35-37 Western blottal erősítettük meg. A peptid antigént magunk szintetizáltuk Fmoc kémiával. A rekombináns antigéneket kódoló plazmidokat a megfelelő szakaszok DNS ill. RT-PCR klónozásával állítottuk elő. Az antigéneket E. coli prokarióta expressziós rendszer segítségével nyertük.

Statisztikai módszerek

Az adatok statisztikai elemzéséhez alkalmazott próbák: a Fischer-egzakt, T-, Mann-Whitney-próba, és regressziós analízis voltak.

EREDMÉNYEK

HHV-8 kimutatása klasszikus Kaposi szarkómás mintákban

Tekintettel arra, hogy az általunk elérhető klasszikus Kaposi szarkóma gyakorisága hazánkban is igen alacsony, a Bőrgyógyászati Klinikán 1991 és 1996 között kezelt szövettanilag is megerősített 13 Kaposi szarkómás beteg 28 archivált mintáját dolgoztuk fel. Minden esetben a léziók lokalizációja, a kórlefolyás, a betegek életkora és a HIV szeronegativitás alapján a betegség a Kaposi szarkóma klasszikus típusának bizonyult. A formalinban fixált, paraffinba ágyazott blokkok metszeteiből preparált DNS nagymértékben fragmentálódott. A HHV-8 kimutatására ezen archivált mintákból csak a nested-PCR módszer volt sikeres. A 28 mintából 25 esetben tudtuk a HHV-8-ra specifikus PCR terméket kimutatni. A kontrollként alkalmazott más betegektől származó ugyancsak archivált benignus haemangiómából (2), pyogén granulómából (2), melanomából (2) és bazaliomából (2) a vírust nem tudtuk kimutatni. A HHV-8-at a Kaposi léziók minden stádiumában tudtunk kimutatni, bár az archivált minták esetében a folt stádiumú korai Kaposi léziókban a víruskimutató eredménye gyakrabban volt negatív. Minden bizonnyal a korai, folt típusú Kaposi léziókban a vírussal fertőzött endothelsejtek egyébként is alacsony száma és a mintákból származó fragmentálódott DNS tette sikertelenné a HHV-8 detektálását.

Hat beteg esetében, betegenként több mint egy minta állt rendelkezésre. Összesen 21 minta esetén további összehasonlító szekvenciavizsgálatot végeztünk. Négy beteg esetében a Kaposi szarkóma multiplex lokalizációjából származó egyidejűleg jelenlevő és azonos időben sebészileg eltávolított mintáit vizsgáltunk. Két beteg esetében pedig különböző időpontokban, különböző lokalizációban kifejlődött léziók terápiás célú kimetszéséből származó minták álltak a rendelkezésünkre. Ezen 21 minta esetében a PCR-rel nyert termékek egyszálú DNS konformációs polimorfizmusának (SSCP) vizsgálatát végeztük el. Az ugyanazon beteghez tartozó különböző minták következetesen azonos SSCP mintázatot adtak. A szekvenálással ellenőrzött minták esetében is azt az eredményt kaptuk, hogy az egy beteghez tartozó minták ugyanabba a szekvenciavariánsba tartozó HHV-8-at tartalmazták.

Szerológiai eredmények

A Kaposi szarkómás betegek (n=16) szérummintáit megvizsgáltuk LANA, sVCA és gp35-37 antigének elleni IgG típusú ellenanyagok jelenlétére. Az egészséges véradók körében az anti-LANA IgG ellenanyagok kimutatását összesen 1089 véradó szérum mintáiból határoztuk meg. Az struktúrantigének elleni IgG ellenanyagokat ugyanezen 1089 véradó egy kisebb, véletlenszerűen kiválasztott 482-fős csoportjában határoztuk meg. Továbbá 29 gyermek (1-14 év) savómintáit is megvizsgáltuk HHV-8 specifikus IgG típusú antitestek jelenlétére.

A könnyebb áttekinthetőség kedvéért a különböző csoportokban, különböző antigénekkel kapott szerológiai eredmények egy közös táblázatban szerepelnek.

HHV-8 szeroprevalenciája magyarországi szérum mintákban

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

Az általunk vizsgált Kaposi szarkómás betegek mindegyike szeropozitív volt legalább egy HHV-8 antigénre. A Kaposi szarkómás betegcsoportban az ellenanyagok előrordulása az alábbiakban alakult: 93,7% (15/16) az anti-LANA, 87,5% (14/16) a K8.1 antigén elleni és 68,7% (11/16) az orf65 karboxiterminális antigénre specifikus ellenanyagok esetében. A két különböző orf65 antigén ELISA a Kaposi szarkómás betegcsoportban azonos eredményt adott. Az anti-LANA ellenanyagok titere a Kaposi szarkómás páciensek esetében 640 és 10240 között, átlagosan 2560 volt.

Az anti-LANA specifikus IgG ellenanyag prevalenciája az egészséges véradó csoportban 1,56%-nak (17/1089) adódott. Az anti-LANA ellenanyagok titere a véradók esetében 40-1280 közötti tartományban fordult elő, átlagosan 120 és szignifikánsan

alacsonyabb volt a KS betegek titereinél (Mann-Whitney, $p < 0,001$). A rekombináns K8.1 antigén ellen 1,24%-ban (6/482) detektáltunk IgG ellenanyagot a véradók szérum mintáiban. A rekombináns orf65 kapszid antigén esetében 1,45%-ban (7/482) kaptunk pozitivitást. Az orf65 peptid ELISA-ával csak 0,83%-ban (4/482) kaptunk Western-blottal is megerősíthető pozitivitást. Ugyanennek a 482 betegnek az esetében, amelyeknél az ELISA méréseket elvégeztük az anti-LANA szeroprevalencia 1,87%-nek adódott (9/482). Az egészséges véradók esetében a HHV-8 specifikus ellenanyagok prevalenciája a növekvő életkorral fokozatosan emelkedő tendenciát mutat függetlenül a vizsgálatban használt antigéntől.

A véradók csoportjában a négy módszerrel összességében 3,52% (17/482) volt a HHV-8 specifikus IgG ellenanyagok prevalenciája. A 17/482 HHV-8 szeropozitív egyénből 14 férfi és 3 nő, átlagos életkoruk 39,6 év. A szintén 17 anti-LANA pozitív egyénből 13 férfi és 4 nő, átlagos életkoruk 42,7 év. Ez a nemi megoszlás kísértetiesen hasonló volt a vizsgált klasszikus KS betegcsoportéval, ahol 16 betegből 13 férfi volt.

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

MEGBESZÉLÉS

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

Annak ellenére, hogy a kimutatott orf26 fragmentum a genomon belül a konzervatív régiók közé tartozik, más szerzők is mutattak ki ezen belül variabilitást. Mivel a KS tumor legtöbb sejtjében a HHV-8 látens episzomális formában van jelen, a vírus DNS replikációja alacsonyabb szintű és egyébként is más mechanizmusú, mint a produktív ciklust jellemző lineáris vírusgenom replikációja. Ugyanazon beteg KS tumorából és lítikus vírusciklussal jellemzett PBMC frakciójából a vírusgenom ezen szakaszának pontmutációnyi különbségére van publikált adat. Az ugyanazon beteghez tartozó különböző tumorokban talált orf26 szekvencia következetes identikussága felvetette bennünk a klasszikus Kaposi-tumor klonális eredetét. A víusról rendelkezésre álló mai ismereteink birtokában az általunk talált következetes identikusság, csupán annyit jelent, hogy egy adott páciensen belül ugyanaz a variánsa fordul elő a vírusnak, amit mások a hipervariábilis orfK1 analízisével meg is erősítettek. A Kaposi szarkóma mono- vagy poliklonálisának a megítélése a celluláris DNS vizsgálatának a szintjén, az X kromoszóma inaktivációjának vizsgálatával ellentmondásos adatokat eredményezett a tumorban jelenlévő többféle sejttypusnak köszönhetően. A klonalitás kérdésének végleges eldöntéséhez döntően hozzájárult a virális pathomechanizmus egyre pontosabb megismerése is. A mai elgondolás szerint a Kaposi lézió kialakulásának korai szakaszát a HHV-8 fertőzés következtében kialakuló atipusos érújdonsképződéssel járó poliklonális endothelproliferáció eredményének tartják, mely alapjául szolgál egy vagy több valódi transzformált klón kisselektálódásának és végső soron, tumor kialakulásához vezet az incipiens Kaposi lézióból. A Kaposi szarkóma tumor mono- és oligoklonális eredetét támasztja alá a látens cirkuláris vírusgenom TR hosszának analízise.

A véradók csoportjában dokumentált 3,52%-os magyarországi HHV-8 szeroprevalencia érték jól beleillik abba a geográfiai gradiensbe, ami a Közép-Afrika 30-70% - mediterrán országok 10-30%- Nyugat-Európa 1-2% - vonalon tapasztalható a HHV-8 szeroprevalenciáját illetően. Mindazonáltal ez a jelenlegi adat is valószínűleg alacsonyabb a teljes lakosságot jellemző átfertőzöttségi szinttől. Ha figyelembe vesszük azt, hogy esetünkben a véradók koreloszlása a fiatal-középkorú csoportok tekintetében túlreprezentált

az idősebb korosztály rovására, akkor az egész lakosságra vonatkoztatva a valós átfertőzöttséget 5% körülire becsülhetjük.

A véradók anti-LANA szeroprevalenciájának regressziós analízise szerint a növekvő életkor alacsony mértékben, de statisztikailag szignifikánsan pozitív hatással van a szeroprevalenciára (OR=1.05/év, CI:1.0005-1.1069, $p=0.048$). A szeropozitív véradók átlagos életkora statisztikailag jelentősen alacsonyabb a klasszikus KS csoport átlagos életkoránál (t-próba, $p<0,05$). A véradók és a KS csoport szeroprevalenciája közötti szignifikáns különbség (Fischer egzakt próba, $p<0,01$) azonban nem a két csoport különböző kormegoszlásában keresendő, ugyanis a regressziós modell szerint a klasszikus KS tipikus korának megfelelő 60-80 éves korosztály becsült anti-LANA szeropozitivitása 4,8-13% közé tehető. Ezzel ellentétben a klasszikus KS-nak az 50 évnél idősebb kor jelentős rizikótényezője (OR=56,7, CI: 4,67-687,7, $p<0,0016$). A statisztikai eredmények, hovatovább úgy értelmezhetők, hogy a klasszikus KS kialakulása a HHV-8 fertőzés hosszú inkubációs idejű, ritka főként időskori következménye. Ez egybevág a klasszikus Kaposi szarkómáról ismert képpel és rávilágít a betegség kialakulásához szükséges egyéb nem virális faktorok jelentőségére, valamint a HHV-8 opportunistá pathogén jellegére.

Az értekezésben felhasznált közlemények:

1.

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

2.

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

3.

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

4.

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

Egyéb közlemények:

1.

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

2.

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

3.

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

4.

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