

Egyetemi Doktori (Ph.D.) Értekezés Tézisei

**EGY ÚJ, HIV REPLIKÁCIÓT GÁTLÓ OLIGONUKLEOTID
SZINTÉZISE, KÉMIAI ÉS BIOLÓGIAI JELLEMZÉSE**

Horváth András



Témavezető:
Dr. Aradi János

Debreceni Egyetem
Orvos és Egészségtudományi Centrum
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet
Debrecen
2005

1 BEVEZETÉS

Az oligonukleotidok értékes eszközök a kutatók kezében, melyekkel gének expresszióját, vagy proteinek aktivitását lehet gátolni. Széleskörű terápiás alkalmazásuk bevezetése szintén várható a közeljövőben. Az oligonukleotidok mint kísérleti eszközök vagy potenciális terápiás ágensek, biológiai aktivitásukat két módon fejtik ki:

Szekvencia specifikus módon (antiszensz oligonukleotidok, triplahélix képző oligonukleotidok, aptamerek, ribozimok, decoy oligonukleotidok, illetve kis interferáló RNS-ek)

Nem szekvencia specifikus módon (interferon indukáló oligo- vagy polinukleotidok, antitemplátok, egyéb)

Meg kell jegyezni, hogy a két fenti típusú aktivitás nem mindig jelentkezik tisztán, kevert funkciójú biológiailag aktív oligonukleotidok is előfordulnak.

1.1. Oligonukleotidok nem szekvencia specifikus módon kifejtett lehetséges biológiai aktivitása

Interferon indukáló oligonukleotidok: A nem szekvencia specifikus módon ható biológiailag aktív oligonukleotidok skálája nem olyan széleskörű, mint a szekvencia specifikus módon ható oligonukleotidoké. A duplaszálú RNS [mint amilyen a poli(rI)·poli(rC)] interferon indukáló ágens, melynek terápiás felhasználására korábban már folytattak kísérleteket.

Antitemplát oligonukleotidok: A DNS-polimerázok működéséhez templát szükséges. Számos kémiaiailag módosított polinukleotid (pl. 5-merkaptopirimidin), elfoglalva a templát kötő helyet, erőteljesen gátolja a templát függő nukleinsav polimerázokat, a DNS-, RNS-polimerázt, vagy a reverz transzkriptázt. Ezeket a nukleinsav-polimeráz gátló, kémiaiailag módosított polinukleotidokat antitemplátoknak nevezzük.

A laboratóriumunkban kifejlesztett homo-oligomer, az (s⁴dU)₃₅ (Suligovir) szintén nem szekvencia specifikus módon fejt ki hatását.

1.2. Az AIDS és a retrovírusok

Az 1980-as évek elején került az érdeklődés középpontjába egy fertőző betegség, az AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome). 1983-ban izolálták a betegség kórokozóját, a Lentiviridae víruscsalád egyik tagját, az azóta HIV-nek (Human Immune deficiency Virus) nevezett retrovírust. A HIV vírusnak két típusát találták, a HIV-1 és HIV-2 vírusokat. A két típusnak 40-50%-ban hasonló az RNS szekvenciája és hasonló klinikai tünetegyüttest is okoznak. A vírusos megbetegedésektől eltérően a HIV fertőzés kezdetben észrevétlen marad,

a beteg évekig panaszmentes lehet. Ez alatt az idő alatt a fertőzöttek fertőzöttségükről nem tudva adják át másoknak a vírust.

A retrovírusok RNS genommal rendelkező vírusok. A Retroviridae családot három taxonómiai csoportra oszthatjuk. Az Oncoviridae vagy RNS tumor vírusok, a Spumaviridae vagy foamy vírusok tartoznak és a Lentiviridae vírusokra. A Lentiviridae tagjai, mint például a HIV, számos neurológiai és immunológiai betegségeket okoznak az emlősökben. A lentivírusokhoz a Visna/Maedi vírus, Caprine Arthritis-Encephalitis vírus (CAEV), Equine Infectious Anemia vírus (EIAV) és néhány immundeficiencia vírus [szarvasmarhában (BIV), macskákban (FIV), majmokban (SIV) és emberekben (HIV-1 és HIV-2)] tartozik.

1.3. A HIV-1 sejtbe jutása és gátlása:

Mivel a disszertációmban jellemzett Suligovir egy „entry” inhibitor, ezért részletesebben ismertetem a HIV-1 sejtbe jutásának folyamatát. A vírus sejtbe jutása alapvetően négy lépésből áll. Az első lépés a sejthez kapcsolódás, majd ezt követi a CD4 receptorhoz, majd a koreceptorhoz kötődés. Végül a negyedik lépés során a vírus a membránon keresztül fúzióval jut be a sejtbe. Jelenleg számos olyan gátlószer fejlesztésén dolgoznak, melyek a HIV-1 sejtbe való bejutásának egyes lépéseit gátolják.

A folyamat során a HIV-1 vírus burka közeledni kezd egy olyan gazdasejthez, amely CD4 receptort tartalmaz a sejt felszínén, bár CD4-től független kötődést is leírtak. A HIV-1 vírus burok fehérjéje a gazdasejt sejtmembránjából származik, melyet a vírus sarjadzása során szerez. A gp160 polipeptid prekursor a celluláris proteázok hatására gp120-ra és gp41-re hasad el. A proteinek a Golgi készülékben glikozilálódnak és gp120-gp41 heterodimerekből álló trimerekké állnak össze. A vírus részecskék sarjadzása a burok fehérjét tartalmazó plazmamembránon keresztül megy végbe, amiből aztán kialakulnak az érett vírus részecskék. A gp120 a burok fehérje külső részén helyezkedik el. A gp120 igen erőteljesen glikozilált, ami lehetséges, hogy a humorális immunválasz elleni pajzsként funkcionál. Bár a HIV-1 gp120 glikoproteinje jellemzően a CD4 receptorral rendelkező gazdasejtekhez tud kapcsolódni, de kis mennyiségben képes olyan sejteket is fertőzni a HIV-1, amelyek nem expresszálnak CD4-et. A gp120 alternatív receptoraként működhetnek a galaktozilceramidok vagy az összefüggő glikolipidek is.

1.4. A sejtfelszíni redox folyamatok szerepe a HIV belépésében

Az előzőekben bemutatott jól ismert konformáció változásokat a felvételben részt vevő proteinek egy részének redox változása kíséri. A CD4 négy immunglobulinszerű domént (D1-D4) tartalmaz. A D1, D2, és D4 domének tartalmaznak intramolekuláris diszulfidkötést. A CD4 receptor kettes doménjének (D2) diszulfid kötése redoxaktív. Ezt a folyamatot a T-

sejteken kiválasztott sejtfelszíni tioredoxin szabályozza. Az ok, amiért a D2 domén diszulfid kötésének redox aktivitása fontos a HIV-1 fertőzéshez, még ismeretlen; valószínű, hogy a CD4 konformáció változásáért lehet részben felelős. Egy másik, redox folyamatot katalizáló sejtfelszíni fehérje, a protein-diszulfid izomeráz (PDI) szintén felelős lehet a sejtfelszíni redox állapot változásáért. A gp120 CD4⁺ sejtekhez kötődése a gp120 glikoproteinben lévő kilenc diszulfid kötés közül kettőnek a hasításához vezet, mely a PDI-nek tulajdonítható. A tioredoxinnak és a PDI-nek jól elkülönülő szerepe van, ugyanis a tioredoxin a CD4-ben lévő diszulfidkötéseket hasítja, de a gp120-ban lévőket nem, míg a PDI a gp120-ban lévőket hasítja és a CD4-ben lévőket nem. A vírus-sejt fúzió a belépésért felelős sejtfelszíni proteinek diszulfid kötésének hasítását kísérő konformációváltozáson alapszik.

Számos vírusnak és baktériumnak koleszterinben gazdag membrán tutajokra („raft”-okra) van szüksége ahhoz, hogy be tudjon lépni a gazdasejtbe. A HIV-1 replikációs ciklus több helyén szerepet játszhatnak a lipid „raft”-ok. Az eredmények azt sugallják, hogy a koleszterol gazdag lipid „raft”-okban található CD4 receptorok vesznek részt a HIV sejtbe való jutásában, de ezzel ellentétes adatokat is publikáltak.

1.5. Exogén oligonukleotid inhibitorok

Az oligonukleotidok a virális replikáció lépéseinek gátlására is alkalmasak. Előállítottak olyan antiszensz dezoxioligonukleotidokat, melyek különböző HIV-1 RNS szekvenciákkal voltak komplementerek. Ezek sejt kultúrában antivirális aktivitást mutattak. Nagyon sok oligonukleotid esetében még nem határozták meg pontosan a gátlás molekuláris mechanizmusát. Mind az antiszensz, mind a tripla-hélix képző oligonukleotidok szekvencia-specifikus nukleinsav-nukleinsav kölcsönhatással fejtik ki hatásukat. *In vitro* a foszforotioát internukleotid kötést tartalmazó oligodezoxicitidilát a CD4-hez kötődik, ahol gátolja a gp120/CD4 kölcsönhatást és a tisztított reverz transzkriptáz enzim polimeráz aktivitását is. HIV ellenes aktivitással rendelkeznek a foszforotioát kötést tartalmazó, főleg guanilátokból felépülő oligonukleotidok, bár más működési mechanizmussal. Korábban munkacsoportunk már kimutatta, hogy az 5-merkaptopirimidint tartalmazó oligo- és polinukleotidok igen erőteljesen gátolják a reverz transzkriptázt és *in vitro* a HIV-1 replikációt.

1.6. Az oligonukleotidok kémiai szintézise

Az oligonukleotidok oldat- és szilárd fázisú kémiai szintézise egyaránt megvalósítható. A tíz nukleotidnál hosszabb oligonukleotidok előállítására a könnyű kezelhetőségű szilárd fázisú foszfit-triészter szintézis módszert használják. A módszer során dezoxiribonukleotid monomer egységek ismétlődő hozzáadásával (beépítésével) alakítható ki a kívánt oligonukleotid.

A szilárd fázisú foszfit-triészter szintézisnél az első dezoxiribonukleozid általában a monomer 3'-hidroxil csoportján keresztül egy oldhatatlan hordozóanyaghoz van kikötve, mely leggyakrabban ellenőrzött pórusú üveg (CPG). A folyamat első lépése során a hordozóra kikötött dezoxiribonukleozid 5'-hidroxil csoportjának védőcsoportja (dimetoxi-tritil csoport) lehasad, majd a kapcsolási lépésben a tetrazollal aktivált 5'-O-dimetoxitritil-dezoxiribonukleozid-3'-foszforamidittal összekapcsolódik. A reakció során kialakult 3'-5' internukleotid foszfit-triészter kötés oxidálásával a sokkal stabilisabb és természetes 3'-5' foszfát-triészter kötés alakul ki. A hibás szekvenciák elkerülése végett szükséges a nem reagált szabad 5'-hidroxil csoport acetilálása, majd kezdődik előről a szintetikus ciklus. A szintézis végén a szilárd hordozón kikötve található meg a védőcsoportokkal ellátott teljes hosszúságú dezoxioligonukleotid a rövidebb, de korrekt szekvenciájú oligomerekkel együtt.

1.7. Kéntartalmú nukleotidok és nukleinsavak szintézise

Bázison módosított kéntartalmú oligonukleotidok előállítása háromféle módszerrel lehetséges: 1. az elkészített oligonukleotid posztszintetikus módosításával, 2. a módosított monomer egység enzimatis beépítésével vagy 3. módosított dezoxiribonukleotid beépítésével az oligonukleotidba.

Miura és mtsai az 1. módszer szerint a dezoxicitidin átalakítását (nukleozidot, nukleotidot és nukleinsavat) folyékony kénhidrogénes kezeléssel végezték és így a bázis 4-es helyzetében lévő aminocsoportot tiokarbonil csoporttá alakították át. A tiokarbonil-csoport beépítése az uridin P_2S_5 kezelésével is megvalósítható. Enzimatisan, polinukleotid foszforilázzal Simuth és mtsai poli-4-tio-uridilátot állítottak elő. A 3. módszerhez előállították a 4-tio-dezoxitimidint, illetve 4-tio-uridin- és 2'-dezoxi-4-tio-uridin-foszforamiditet. Ez utóbbit az alábbiak szerint készítették el: 2'-dezoxiuridin 3' és 5' szabad hidroxil csoportját tercier-butil-dimetil-szilil csoporttal védték, az így kapott vegyületet O^4 -2,4,6-triisopropil-fenilszulfonáttá alakították. 3-merkaptó-propionitrillel K_2CO_3 jelenlétében a szulfonát észtert, majd ecetsavas kezeléssel a szilil védőcsoportot távolították el. Ezt követően kialakították az 5'-hidroxil csoporton a dimetoxi-tritil, míg a 3'-hidroxicsoponton a foszforamidit csoportot.

2 PROBLÉMAFELVETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Munkacsoportunk korábban már kimutatta, hogy a kizárólag 4-tio-dezoxiuridilátból felépülő 35-mer oligonukleotid, az $(s^4dU)_{35}$, potens inhibitora ($K_i = 3$ nM) a HIV-1 reverz transzkriptáznak. A munka logikus kiterjesztéseként ezután vizsgáltuk az oligonukleotid anti-HIV aktivitását, majd a biztató eredmények után két módszerrel a vegyület előállításának kémiáját, valamint antivirális hatásának mechanizmusát tanulmányoztuk. Céljainkat jelentősen segítette, és anyagilag is támogatta az Egyesült Államok Nemzeti Egészségügyi Intézete (NIH) és egy gyógyszerfejlesztő cég, az OmniPharm Research Inc. (Buffalo, New York, USA). Doktori munkám során a fentiekben vázolt témában dolgoztam, a következő célkitűzésekkel:

1. Az $(s^4dU)_{35}$ anti-HIV aktivitásának vizsgálata (kooperációban a DEOEC Mikrobiológiai Intézetével).
2. Az $(s^4dU)_{35}$ szintézis körülményeinek precíz kidolgozása két módszerrel: előre elkészített oligonukleotid tiolálásával és tiolált monomerek kémiai kapcsolásával.
3. Nagymennyiségű (grammnyi) tiolált oligonukleotid előállítása mindkét módszerrel.
4. Kromatográfiás módszer kidolgozása az $(s^4dU)_{35}$ tisztítására.
5. Az $(s^4dU)_{35}$ kémiai analízise.
6. Az $(s^4dU)_{35}$ biokémiai jellemzése.
7. Az $(s^4dU)_{35}$ anti-HIV mechanizmusának tanulmányozása.

Itt kell megjegyeznem, hogy az $(s^4dU)_{35}$ szabatos megnevezése (35-tagú 4-tio-dezoxiuridilátból álló dezoxioligonukleotid) bonyolult és körülményes, ezért a vegyületet a munka során elneveztük „SULIGOVIR”-nek. A tézisemben a továbbiakban ezt az elnevezést használom. Az $(s^4dU)_{35}$ elnevezése az NIH által irányított projektekből: NSC-722038.

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kémiai módszerek

3.1.1 A Suligovir A szintézise automata oligonukleotid szintetizáló készülékkel

A szintézist standard foszforamidit kémiával a 10 μmol -os oszlophoz való protokollt használva, a Pharmacia Gene Assembler Plus oligonukleotid szintetizáló készülékkel állítottuk elő. 330 mg 4-tio-dezoxiuridin-CPG szilárd hordozót használtunk minden egyes szintézis során. A foszforamidit koncentrációja 0,1 M és a tetrazol koncentrációja 0,45 M volt, összhangban a standard eljárással.

Minden egyes szintézisnél (10 μmol -os reaktor) 6 ml NaSH-NH₃ oldatot használtunk. 24 órás szobahőmérsékleten való állás után centrifugálással eltávolítottuk a szilárd hordozótól és a felülúszót összekevertük 600 μl 3 M nátrium-acetáttal (pH 5,2) és 30 μl 1 M MgCl₂-dal, majd az oligonukleotidot kicsaptuk 17 ml -20°C-os etanollal. 30 perc -20°C-os állás után a kicsapódott oligonukleotidot centrifugálással összegyűjtöttük, vákuumban szárítottuk és -20°C-on tároltuk. Az egyszer kicsapott Suligovir mintákat desztillált vízben feloldva egyesítettük, szűrtük és másodszor is kicsaptuk az előbb leírtak szerint, de most nem adtunk hozzá MgCl₂-ot. A végül megkapott csapadékot kétszer mostuk 80%-os -20°C-os etanollal és az alkohol maradékot vákuumban távolítottuk el. A kapott terméket desztillált vízben feloldottuk és liofilizáltuk.

3.1.2 A Suligovir B szintézise (dC)₃₅ H₂S-es kezeléssel

A (dC)₃₅ kémiai tiolálása: 80 mg (dC)₃₅-t 5 ml víz-piridin (50:50) elegyben oldottunk fel és egy teflon betétet tartalmazó rozsdamentes acél bombába helyeztük. A bombát -70°C-ra hűtöttük le és 8 ml folyékony H₂S-t adtunk hozzá. A nagy nyomású bombát óvatosan lezártuk, majd 10 napig 55°C-on inkubáltuk. Ezután a bombát 4°C-ra hűtöttük és kinyitottuk. Szilárd anyagot is tartalmazó sárga színű oldatot kaptunk, melyet desztillált vízzel mostunk ki a teflon betétből, 7-8 ml zavaros oldatot kapva. Az oldatot 4°C-on tartottuk 1 óráig, majd a kivált finom szemcseméretű ként szűréssel távolítottuk el és a filtert vízzel mostuk. A 8,5 ml tiszta sárga oldathoz 850 μl 3 M nátrium-acetátot és 42 μl 1 M MgCl₂-ot adtunk és 20 ml -20°C-os etanollal kicsaptuk. 30 perc -20°C-os állás után a kicsapódott oligonukleotidot centrifugálással (14000 rpm, 15 perc) összegyűjtöttük, vákuumban szárítottuk és -20°C-on tároltuk. Az egyszer kicsapott Suligovir mintákat desztillált vízben feloldva egyesítettük, szűrtük és másodszor is kicsaptuk az előbb leírtak szerint, de most nem adtunk hozzá MgCl₂-ot. A végül megkapott csapadékot kétszer mostuk 80%-os -20°C-os etanollal és az alkohol

maradékot vákuumban távolítottuk el. A kapott terméket desztillált vízben feloldottuk és liofilizáltuk.

3.1.3 A Suligovir A és B anioncserélő kromatográfiás tisztítása

A tiolált oligonukleotidot az Amersham-Pharmacia ÄKTA[®] PURIFIER kromatográfon RESOURCE[®] Q anion cserélő oszlopot (6 ml) használva tisztítottuk. 5 mM TrisClO₄-t (pH 8,2) tartalmazó NaClO₄ oldatot használtunk az elúcióra. 1 ml/perc áramlási sebességet és 1 mM/perc sókoncentráció növelést alkalmaztunk az elúció során. Egy tisztítás során 4 mg Suligovirt vittünk fel az oszlopra. A tisztítás után az oligonukleotid frakciókat liofilizáltuk, majd 100 µl desztillált vízben feloldottuk. 1 ml -20°C-os acetont adtunk az oligonukleotid oldathoz. 5 perc -20°C inkubálást követően az oldatot centrifugáltuk (14000 rpm, 10 perc, +4°C) és a keletkezett csapadékot mostuk kétszer 1 ml -20°C-os acetonnal.

3.1.4 Biotinált, Cy-5 és Cy-3 jelzett Suligovir szintézise

A jelzett oligonukleotidokat az A módszerrel állítottuk elő. Biotinnal a Suligovir 3' végét, míg a Cy-5 és Cy-3 jelzéssel az 5' végét láttuk el. A tisztítást a 3.1.5 pontban leírtak szerint végeztük.

3.1.5 A Suligovir A és B vizsgálata denaturáló poliakrilamid gél elektroforézissel

A Suligovir minták intaktságát denaturáló poliakrilamid gél elektroforézissel vizsgáltuk. Az oligonukleotidokat 15%-os denaturáló (7 M urea) poliakrilamid gélen választottuk el (500 V, 2 óra). Az oligonukleotid csíkokat ezüsfestéssel jelenítettük meg. Ez a festési eljárás különösen érzékeny kén tartalmú oligonukleotidok estében.

3.2. Biokémiai, sejtbioológiai és virológiai módszerek:

3.2.1 Sejtek

A Kit225 K6 human T lymphoma sejteket 10 % FCS, penicillin, sztreptomycin antibiotikumok és rekombináns humán IL-2 jelenlétében RPMI 1640 mediumban tenyésztettük. Az N87 gyomor karcinóma sejteket 10 % FCS-t tartalmazó RPMI 1640 tápfolyadékban tenyésztettük.

3.2.2 A Suligovir A és B reverz transzkriptáz gátlásának vizsgálata

100 µl reakcióelegyet (100 mM TrisHCl (pH 8,0), 6 mM MgCl₂, 50 mM KCl 100 µg/ml BSA, 5mM DTT, 10 µM [³H]dTTP (specifikus aktivitás 46 Ci/mmol) és 0,1 µM templát-primer (a primer 3' végére számolva) és 0,1 U HIV-1 reverz transzkriptáz enzim) 1 órán keresztül 37°C-on tartottunk. A Suligovir koncentrációjának változtatásával vizsgáltuk az enzimaktivásra kifejtett gátló hatását. A reakciót leállítottuk 100 mM Na-PPi-ot tartalmazó 10 % 0°C-os TCA oldattal. A radioaktív terméket Whatman GF/C filterre szűrtük

és mostuk négyszer 1 ml 50 mM Na-PPi-t tartalmazó 5 % TCA oldattal, majd egyszer 96 %-os etanollal. A filtereket szárítottuk és a nukleotid beépülést szcintillációs technikával mértük.

3.2.3 A Suligovir A és B HIV-1 replikáció gátlásának vizsgálata

Ezen vizsgálatokhoz HIV-1(IIIB) vírustörzset használtunk, mely tartósan fertőzött H9 sejt kultúra sejtmentes felülszójából származott. Az MT-4 sejteket HIV-1(IIIB) vírus törzsszel fertőztük. A sejteket a fertőzés előtt 1 órával kezeltük oligonukleotid inhibitorral, majd 4 nap múlva meghatároztuk a felülszó reverz transzkriptáz aktivitását a már fentebb leírt assay-el.

3.2.4 A Suligovir A és B nukleázokkal szembeni stabilitása

A reakcióelegy összetétele: 100 mM TrisHCl (pH 8,0), 5 mM MgCl₂, 1250 µg/ml oligonukleotid (Suligovir A vagy B vagy (dC)₃₅), 50 µg/ml kígyóméreg nukleáz (*Crotalus durissus*), 25 µg/ml dezoxiribonukleáz I (3000 Kunitz U/mg protein) és 0,025% NaN₃ volt 500 µl össztérfogatban. A reakcióelegyet 37°C-on inkubáltuk és a jelzett időpontokban 40 µl térfogatokat vettünk ki. A nukleázos kezelést hőinaktiválással állítottuk le (5 perc, 95°C), és 2 µl (20 µg/µl) placenta foszfatáz oldatot adtunk hozzá. A reakcióelegyet 1 órán keresztül 37°C-on tartottuk. 5 perc 95°C-on való hőkezeléssel inaktiváltuk a foszfatáz enzimet és a reakcióelegyet 0°C-ra hűtöttük le. A denaturált proteint centrifugálással távolítottuk el. A szervesetlen foszfát mennyiségét 30 µl felülszóból a már fentebb leírt módszerrel határoztuk meg.

3.2.5 Toxicitási vizsgálat humán csontvelő granulocita makrofág progenitor sejtek kolónia képződésén keresztül

A Suligovir humán csontvelő granulocita makrofág progenitor sejtek kolónia képződésére kifejtett hatását egy már leírt módszer szerint végeztük el. Röviden: kolóniánként 10⁵ db csontvelő sejtet tartalmazó agar táptalajt 5-180 µg/ml koncentráció tartományban kezeltük Suligovirrel. A sejteket 14 napig inkubáltuk 37°C-on 3 v/v% CO₂ jelenlétében. A protokollt a Debreceni Egyetem Területi és Intézeti Etikai Bizottsága hagyta jóvá (DEOEC RKEB/IKEB-2055/2003).

3.2.6 Áramlási citometriai mérések, kompetíciós és fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) vizsgálatok

Az áramlási citometriai méréseket Becton Dickinson FACScalibur áramlási citométeren végeztük. A kompetíciós assay-ben fluoreszcensen jelölt monoklonális antitestet és jelöletlen Suligovirt tartalmazó eleggyel inkubáltuk a sejteket. A kompetíció mértékét a jelölt antitest fluoreszcenciájának részleges csökkenéséből számoltuk.

A FRET mérések során Cy-3-mal jelölt monoklonális antitesttel (donor) és Cy-5-tel jelölt Suligovirrel (akceptor) jelöltük egyidejűleg a sejteket. Négy fluoreszcencia intenzitást

detektáltunk. Hármát 488 nm-en gerjesztettünk és külön-külön 530 ± 30 nm-en, 585 ± 42 nm-en és 670 nm felett detektáltuk, míg a negyediket 635 nm-en gerjesztettük és 661 ± 16 nm-en detektáltuk. A különböző fluoreszcencia csatornák közötti spektrális átfedésre használt korrekciós faktorokat a jelöletlen és egyszeresen jelölt sejtekből származó mérési adatokból kaptuk meg. A számított energia transzfer hatékonyságot a következőképpen fejeztük ki: azon gerjesztett molekulák számát, melyek az acceptor molekuláknak átadták energiájukat, osztottuk az összes gerjesztett molekula számával.

3.2.7 Antitestek és sejtfelszíni molekulák jelölése, konfokális lézer szkennning mikroszkópiás (CLSM) vizsgálatok

A sejt felszíni antigének jelölésére 50 μ l össztérfogatú PBS-ben (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4 , 1,4 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA (pH=7,3) 10^6 sejtet fluoreszcensen jelölt molekulákkal 30 percig sötétben inkubáltunk. Az összes lehetséges kötőhelyet 50-100 μ g/ml antitest koncentrációt használva telítettük. A feleslegben maradt antitestet a sejtek kétszeri PBS-es mosásával eltávolítottuk.

3.2.8 A Suligovir és tioredoxin közötti kovalens kölcsönhatás kimutatása

4 μ g tioredoxint (Sigma) és 2 μ g biotinnal jelölt Suligovirt 12 μ l össztérfogatú 10 mM TrisHCl-t (pH 7,5 és 8,5) tartalmazó elegyben 30 percig 37°C-on inkubáltunk. Az inkubálást követően 3 μ l reakcióelegyet 7 M ureát tartalmazó 15%-os denaturáló poliakrilamid gélen elválasztottunk. A termékeket PVDF membránra blottoltuk (100 mA, 75 perc). A membrán szabad felületét 5 % tejport tartalmazó TBST-vel (137 mM NaCl, 1 % Tween 20, 20 mM TrisHCl (pH=7,6)) blokkoltuk, majd 1 órán keresztül 0,1 % tejport és 1:750 arányban hígított torma peroxidázhoz kötött streptavidint tartalmazó TBST-vel inkubáltuk. A membránt 4x15 percig 20 ml TBST-vel mostuk és a biotinnal jelölt termékeket ECLTM-el jelenítettük meg.

4 EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. *A 4-tio-dezoxiuridilát tartalmú oligomerek anti-HIV aktivitásának vizsgálata*

Különböző lánchosszúságú 4-tio-dezoxiuridilátot tartalmazó oligonukleotidok anti-HIV aktivitását vizsgáltuk. A lánchossz növekedésével nemlineáris módon növekedett a gátlás erőssége. Ebben a kísérletben a legmagasabb antivirális aktivitással a 35-tagú oligonukleotid, a Suligovir rendelkezett ($IC_{50}=0,5 \mu\text{g/ml}$). A Suligovirt alkotó 4-tio-dezoxiuridilát tiono-tiol tautomer átalakuláson mehet keresztül. A kialakuló tiol forma diszulfidkötéseket alakíthat ki más, -SH csoportokat tartalmazó anyagokkal, pl. ciszteint tartalmazó fehérjékkel. A tiolált oligonukleotid antivirális aktivitásának lánchosszfüggése azt mutatja, hogy a 4-tiono vagy 4-merkaptó csoport jelenléte egyedül nem elégséges a vírus belépésének megakadályozására. Ez a lánchosszfüggés egy aptamerszerű hatás vagy egy méretfüggő affinitás következménye lehet, ahol az antivirális célpont(ok)hoz kapcsolódás feltétele a hidrofób és/vagy az ionos kölcsönhatás.

Az antivirális aktivitás vizsgálatára ezért a továbbiakban már csak a 35-tagú molekulát, a Suligovirt használtuk. Ha a vírus infekcióval megegyező időben vagy a fertőzést megelőzően kezeltük a sejteket $1 \mu\text{g/ml}$ koncentrációjú Suligovirrel, akkor a vírus replikációt mintegy 90-98 %-kal gátolta. Azonban ha a vírusfertőzés után adtunk az MT4 sejtekhez Suligovirt, akkor a gátlás hatékonysága jelentősen lecsökkent. Eredményeink azt mutatják, hogy a Suligovir a vírus replikációs ciklusát már egy korai fázisban, valószínűleg a vírus sejtbe való belépésekor gátolja. Későbbi biológiai vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy ez a vírusfertőzés korai szakaszára gyakorolt gátlás milyen mechanizmus szerint játszódik le.

4.2. *A Suligovir szintézise*

A további vizsgálatok elvégzéséhez szükséges volt olyan módszer(ek) kidolgozása, amely(ek) során a Suligovirt megfelelően nagy mennyiségben, kémiaiilag egységesen, tiszta állapotban tudjuk előállítani.

Kétféle módszert dolgoztunk ki a Suligovir előállítására: A) Automata oligonukleotid szintetizálással, mely védett 4-tio-dezoxiuridin-foszforamidit épít be (A módszer). B) $(dC)_{35}$ kémiai tiolálásával (B módszer)

4.2.1 *A 4-tio-dezoxiuridin foszforamidit szintézise*

A Suligovirt az A módszernél standard foszforamidit kémiával állítottuk elő. Ezen módszer kulcsvegyülete az 5'-dimetoxitritil-2'-dezoxi-4-(2-cianoetil-tio)-uridin-3'-[(2-

cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-foszforamidit (röviden: 4-tio-dezoxiuridin foszforamidit). A kereskedelmi forgalomban ugyan kapható a 4-tio-dezoxiuridin foszforamidit, de magas ára miatt (2700 \$/g) célszerűnek tűnt a vegyület laboratóriumi előállítása. Bár az irodalomban a vegyület előállítását már leírták, mi egy módosított, előnyösebb előállítási módszert dolgoztunk ki.

2'-dezoxiuridint piridinben dimetoxitritil-kloriddal kezeltünk, majd a kapott 5'-dimetoxitritil-2'-dezoxiuridint ecetsavanhidriddel acetileztük. Az acetyl védőcsoport előnye az irodalomban leírt savérzékeny terc-butyl-szilil védőcsoporttal szemben, hogy gyenge lúgos közegben (pH=7,5) könnyen lehasad, de a későbbiekben kialakított ciano-etil csoport ezen a pH-n stabilis. Így a 4-tio-dezoxiuridilát foszforamidit szintézisnek már az elején kialakíthattuk a savlabilis dimetoxitritil védőcsoportot. Az ezt követő „one-pot” reakcióban előállítottuk a számunkra fontos 2-cianoetil-tio funkciós csoportot tartalmazó vegyületet, melynek Zemlén szerinti dezacetilezését követően 2-cianoetil-N,N-diizopropil-klór-foszforamidit reagenssel a megfelelő 4-tio-dezoxiuridin foszforamiditet kaptuk.

4.2.2 A Suligovir A és B szintézise

A Suligovir A előállításánál 4-tio-dezoxiuridin-foszforamiditet és supportot használtunk fel. 10 óra alatt 30 mg mennyiségű Suligovirt szintetizáltunk. A módszer hátránya, hogy a felhasznált anyagokat bonyolult kémiai szintézissel kaphatjuk csak meg és az előállítási költségük magas. A módszer előnye, hogy különböző kémiai módosítással (Cy-5, Cy-3, biotin, stb.) láthatjuk el a Suligovirt.

A Suligovir előállítását a B módszer során a már készen lévő (dC)₃₅ folyékony kénhidrogénnel történő kémiai átalakítással végeztük. Munkacsoportunk korábban már meghatározta, hogy a (dC)₃₅ teljes tiolálálására 10 napos reakcióidőre van szükség. A módszer előnye, hogy az előállítási költség tizedakkora, illetve az, hogy a H₂S-es kezelés után csaknem teljesen tiolálódott Suligovir B-t kaptunk (lásd később), így nagymennyiségű előállításra ez a módszer kiválóan alkalmas.

4.3. A két módszerrel előállított Suligovir jellemzése

A szintézis módszerek különbözőségéből adódóan meg kellett vizsgálnunk, hogy az előállítások során kapott termékek (Suligovir A és B) kémiai és biokémiai tulajdonságai között van-e valamilyen különbség.

4.3.1 A Suligovir kémiai jellemzése

Összehasonlítottuk a két módszerrel kapott Suligovir A és B UV spektrumát, vizsgálva a 247 nm, 270 nm és 327 nm hullámhosszokon mért abszorpció arányukat. A dezoxicitidilátnak 270 nm-en, a 4-tio-dezoxiuridilátnak pedig 327 nm-en van abszorpciós

maximuma. Ha a tiolálás hatékonysága nem megfelelő, akkor 270 nm-es hullámhosszon a spektrum „völgye” kiegyenesedik az el nem reagált citidilát jelenléte miatt. A Suligovir A és B UV spektruma és az egyes hullámhosszakon mért abszorbanciák aránya lényegesen nem tért el egymástól, ezáltal a tioláltság mértékét is hasonlóra becsülhettük.

Az elkészült Suligovir A és B minták tisztaságát 15%-os denaturáló poliakrilamid gél elektroforézissel ellenőriztük. A kapott termékek nagy mennyiségben tartalmaztak rövidebb lánchosszúságú oligonukleotidot is. Szükséges volt ezért egy milligrammos léptékű oligonukleotid tisztítási eljárás kidolgozására, mert a poliakrilamid gél elektroforézis nem használható preparatív méretekben a limitált mennyiség (kb. 500 µg), az alacsony hozam (20-30%) és a gél szennyeződés miatt. Az anioncserélő kromatográfiás módszerrel nagy mennyiségű, kémiaiilag módosított oligonukleotidot is lehet tisztítani. A tisztítható mennyiséget csak az oszlop mérete limitálja. E módszer során a kívánt tisztított terméket magas sókoncentrációjú oldatban kaphattuk volna meg. A nagy mennyiségű sótól intenzív tisztítási eljárással lehetne megszabadulni, mint amilyen pl. a dialízis. A bonyolult sómentesítési lépést elkerülendő kidolgoztunk egy új eljárást, amelynél nagy ionaktivitással rendelkező nátrium-perklorát oldatot használtunk. Az anioncserélő kromatográfia során a tiszta oligonukleotidokat egy részleges bepárlást követően, az oligonukleotid acetonos kicsapásával kaphattuk meg, mivel a nátrium-perklorát acetonban jól oldódik. A Suligovir A és B-t így tisztán, milligrammos mennyiségben nyerhettük ki. A homogenitásukat 15%-os denaturáló poliakrilamid gél elektroforézissel ellenőriztük.

Szükséges volt eldönteni, hogy a kétféle módon készített Suligovir kémiai szerkezetében található-e különbség. Ezért Bruker Avance 360 NMR készülékkel ^{31}P -NMR, ^{13}C -NMR és ^1H -NMR spektrumokat vettünk fel. A ^1H -NMR spektrumban szobahőmérsékleten nyolc jel volt látható. A jelek azonosítását kétdimenziós ^1H - ^1H korrelációs spektroszkópiával végeztük (2D ^1H - ^1H COSY). A Suligovir A ^1H NMR spektrumában plusz jeleket detektáltunk, ami valamilyen melléktermék jelenlétét mutatta. A melléktermék egyes jelei (6,05 ppm; 6,27 ppm és 7,79 ppm), melyeket az 5_{O} , $1'_{\text{O}}$ és 6_{O} hidrogének ^1H jeleiként azonosítottunk, jól láthatóan elkülönülnek a többi jeltől. Az egyes jelek integráljainak arányából megállapíthattuk, hogy a melléktermék és a kívánt vegyület aránya 1:10. A melléktermék többi jele átfedésben volt a főtermék jeleivel. A Suligovir B esetében ilyen, melléktermék jelenlétére utaló plusz jeleket nem detektáltunk a ^1H NMR spektrumban.

A Suligovir A és B ^1H NMR spektrumában talált különbséget kiváltó okot közelebbről is tanulmányozni kívántuk, ezért tömegspektrometriás vizsgálatot végeztünk mindkét mintára.

Tisztított Suligovir mintákat használtunk. A Suligovir A esetében részlegesen tiolált 35mer oligonukleotidokat nagy arányban detektáltunk, jelezve azt, hogy a „deprotection” lépés alatt „kénvesztés” történt. A megfelelő jelek között 16 tömegegységnyi különbségek voltak, ami azzal magyarázható, hogy a bázis 4-es helyzetében lévő kén jelentős része oxigénre cserélődött ki. Így molekulánként átlagosan 31-32 ként tartalmazott a 35 tagú oligonukleotid. A tömegspektrometriai vizsgálatok alátámasztották az NMR eredményeket és magyarázatot nyújtottak a melléktermék kialakulására és szerkezetére. A Suligovir A 11,7% deoxiuridint tartalmazott (az NMR-rel kapott arány 1:10), míg a (dC)₃₅ tiolálása gyakorlatilag teljesnek tekinthető, hiszen az így kapott Suligovir B mindössze 1,34 %-ban tartalmazott deoxiuridint (NMR-rel nem volt detektálható a melléktermék jelenléte). A Suligovir molekulatömege: $M=10649$ g/mol. A Suligovir A és B tiolálása közötti kvantitatív különbséget az UV analízissel nem tudtuk kimutatni. Az NMR és MS vizsgálatok azonban rávilágítottak arra, hogy a két molekula kénezettségében számottevő különbség van.

4.3.2 A Suligovir biokémiai jellemzése

A kémiai jellemzés során kapott különbségek miatt meg kívántuk vizsgálni, hogy az eltérés mennyiben befolyásolja a Suligovir A és B biológiai aktivitását. Ezért összehasonlítottuk a HIV-1 reverz transzkriptázra, a HIV-1 replikációra és nukleázokra kifejtett hatásukat.

HIV-1 Reverz Transzkriptáz gátlás: Laboratóriumunkban korábban már kimutattuk, hogy a Suligovir potens gátlószere a HIV-1 RT-nak. Ezért meghatároztuk az anioncserélő kromatográfiával tisztított Suligovir A és B minták HIV-1 RT enzim gátló aktivitását. A két Suligovir minta $IC_{50}=6,2$ nM koncentrációban, egyenlő mértékben gátolta a HIV-1 RT enzim aktivitását.

HIV-1 replikáció gátlás: A Suligovir A vagy B mintákkal végzett HIV-1 replikáció gátlási vizsgálatainkra HIV-1(IIIB) vírus törzset használtunk. MT-4 sejtek HIV-1(IIIB)-vel fertőzését megelőzően 1 órával kezeltük a sejteket Suligovir A-val vagy B-vel, majd meghatároztuk a reverz transzkriptáz aktivitást. Mindkét minta a HIV-1 replikációt $IC_{50}=0,3$ µg/ml koncentrációban gátolta.

A HIV-1 RT és HIV replikáció gátlásának vizsgálata azt mutatta, hogy a teljes tioláltság, ellentétben a lánchosszal, nem szükségszerűen fontos ahhoz, hogy a Suligovir kifejtse erős gátló hatását.

Ahhoz, hogy a Suligovir sikeresen használható legyen egy esetleges antivirális terápia során, két fontos követelmény szükséges: az oligonukleotid nagy stabilitással rendelkezzen és kicsi legyen a sejtekre kifejtett toxicitása.

Nukleáz stabilitás: Célzott stabilitás vizsgálatokat végeztünk a Suligovir A-ra és B-re és a (dC)₃₅-re. A tiolált oligonukleotid (Suligovir A és B) hozzávetőlegesen negyvenszer stabilabbnak bizonyult, mint a nem tiolált (dC)₃₅. A Suligovir A és B stabilitása nem tért el egymástól. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a 4-tiono csoportot tartalmazó oligonukleotidok, a természetes oligonukleotidokkal ellentétben, igen nagy stabilitással rendelkeznek nukleázokkal szemben.

Toxicitás: Bár az *in vitro* antivirális assay eredményei alapján már megállapítottuk, hogy a Suligovir nem toxikus, megvizsgáltuk az emberi csontvelőből származó humán granulocita progenitor sejtek kolónia képződésére kifejtett toxicitását. Az oligonukleotid a kolóniaképződést nem gátolta jelentősen még 180 µg/ml koncentrációban sem.

4.4. A Suligovir gátló hatásának mechanizmusa

4.4.1 A Suligovir gátló hatása a vírus-sejt kölcsönhatásra

A Suligovir gátló mechanizmusának tanulmányozása során első kérdés volt, hogy a vírus-sejt kapcsolat kialakulását („attachment”) és/vagy a vírus belépését gátolja-e a Suligovir. Erre jól kidolgozott virológiai módszerek vannak, melyeket laboratóriumunkban nem tudtunk elvégezni. Ezért egy Egyesült Államokban működő cégnek megbízást adtunk a munka elvégzésére, saját terveink alapján. A vírus sejthez kötődésének gátlása során a sejthez kapcsolódott p24 mennyiségét mérték ELISA módszerrel, a vírus belépésének gátlását pedig 48 órával később, a β-galaktozidáz reporter expressziójának mérésével követték. Mind a vírus kötődésének, mind a belépésnek Suligovirrel való gátlása azonos mértékű volt (IC₅₀: 0.003 és 0.002 µg/ml). Meghatározták a Suligovir hatását a sejtfúzióra is, ahol CD4 és LTR-β-galaktozidáz reportert tartalmazó HeLa CD4 LTR β-gal és HIV tat és env proteint expresszáló HL2/3 sejteket használtak. A két sejtvonalat együtt tenyésztették 48 óráig, folyamatos Suligovir jelenlét mellett és meghatározták a β-galaktozidáz aktivitását. A Suligovir a gp120-CD4 fúziót IC₅₀=8,75 µg/ml koncentrációban gátolta. Az eredmények azt mutatják, hogy a Suligovir antivirális aktivitását a vírus életsiklusának egy korai szakaszában fejtí ki, feltehetőleg az adszorpció vagy a belépés során.

4.4.2 A Suligovir kölcsönhatása a sejtfelszínnel

Vizsgáltuk a Suligovir specifikus kötődését a sejtekhez. Ezért CD4⁺ és CD4⁻ sejtvonalakat Suligovirrel titráltunk. A Suligovir a CD4⁺ sejtekhez kb. tízszer jobban kötődött, mint a CD4⁻ sejtekhez. A CD4⁺ sejtek 20 000 CD4 molekulát tartalmaznak és sejtenként 170 000-350 000 Cy-5 jelölt Suligovir kötődik hozzájuk.

A HIV-1 gp120 glikoproteinjének elsődleges receptora a CD4 molekula. Ezért kompetíciós és fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) vizsgálatokat végeztünk, hogy meghatározzuk a Suligovir kötődési helyét a CD4 lokalizációjára vonatkoztatva. Amikor jelöletlen Suligovirrel egyidejűleg fluoreszcensen jelölt CD4-ellenes mAt-et (MEM115) adtunk a sejtekhez, a Suligovir versengett a kötőhelyért az antitesttel. A CD48-ellenes mAt (MEM102) kötődött a sejtekhez, de a jelöletlen Suligovir hozzáadására sokkal kisebb kompetíciót figyeltünk meg, annak ellenére, hogy a CD48 receptorok száma közel azonos a CD4 receptorok számával. A Suligovir és a CD4 között specifikus kölcsönhatás bizonyításának érdekében FRET analízist végeztünk a Cy-3 jelzett CD48-ellenes mAt és a Cy-5 jelölt Suligovir között. A CD48-ellenes mAt és a Suligovir között kialakult alacsony (1-5%) energia transzfer hatékonyság azt mutatja, hogy a molekulák nagy része nincs közel (10 nm-en belül) egymáshoz. A megfigyeléseink és a kapott kompetíciós adatok alapján azt mondhatjuk, hogy nagyszámú Suligovir molekula kerül kölcsönhatásba a CD4-gyel, de a CD48-cal nem, vagy sokkal kisebb mértékben. Ez azonban nem jelenti azt, hogy esetleg nem kötődhet más, itt nem azonosított, sejtfelszíni molekulához.

4.4.3 A Suligovir sejtfelszíni lokalizációjának vizsgálata konfokális lézermikroszkópia alkalmazásával (CLSM)

CLSM vizsgálatokat végezve azt találtuk, hogy a Suligovir a sejtfelszínnek jól definiált helyeihez kötődik és az oligonukleotid kötődését nem befolyásolja a jelölés típusa (Cy-3, Cy-5). Igen nagy az átfedés a Suligovir, a CD4 és a lipid „raft”-ok sejtfelszíni elhelyezkedésében. Továbbá a Suligovir és a sejtfelszíni tioredoxin szinte teljesen azonos helyen található meg a sejt felszínén. Hasonlóan a CD4-Suligovir kölcsönhatás vizsgálata során kapott eredményekhez, a tioredoxin és a Suligovir ebben az esetben is a lipid „raft”-tal azonos helyen jelenik meg a sejt felszínén. A Suligovir mennyisége CLSM-mel nem detektálható intracellulárisan, hanem a sejt felszínén, a sejtmembránhoz kapcsolódik. Így igen valószínűtlen az, hogy a reverz transzkripció gátlásával fejtené ki antivirális aktivitását a molekula. CLSM-mel kapott eredményünk szerint a sejtfelszíni tioredoxin a lipid „raft”-okban lokalizált és a Suligovir is ezekben a pontokban dúsul fel. Másik kísérletünk szerint a Suligovir a lipid „raft”-okban található CD4 receptorral azonos helyen dúsul fel. Figyelembe véve a Suligovir potens HIV belépést gátló hatását (0,003 µg/ml), CLSM eredményeink amellet szólnak, hogy a vírus lipid raftokban lokalizált CD4 receptorokon keresztül kerül felvételre. További hangsúlyozandó és fentebb megjegyzett eredményünk az, hogy a tioredoxin a sejt felszínén elhelyezkedő lipid „raft”-okban fordul elő. Ezt eddig nem írták le. Ha azt az irodalmi eredményt elfogadjuk, hogy a tioredoxin feltétlen kell a CD4 vírus belépés

során bekövetkező konformációs változáshoz, akkor egy újabb megerősítést kapjuk annak, hogy a HIV a lipid „raft”-okban lokalizált CD4 molekulákat hasznosítja a bejutáshoz.

4.4.4 A Suligovir kölcsönhatása a tioredoxinnal

Korábban már bemutattuk, hogy a Suligovir és a sejtfelszíni tioredoxin elhelyezkedése azonos, ezért vizsgáltuk a Suligovir *in vitro* kovalens kötődésének lehetőségét a tioredoxinhoz. A HIV-1 belépéséhez szükséges a CD4 receptor D2 doménjében levő diszulfid híd oxidoredukciós változása, melyet tioredoxin mediál. Így a tioredoxin a Suligovir egy lehetséges célpontja lehet. A reakció elegyben megjelent 2 újabb termék. A Suligovir és a tioredoxin között valószínűleg kovalens kötés alakult ki, hiszen az elektroforézis során a denaturáló gélben nagy valószínűséggel minden másodlagos kölcsönhatás megszűnik. Hogy az egyes sávok összetétele mi lehet, jelenleg még nem tudjuk.

Eredményeink szerint a Suligovir egy nem toxikus HIV ellenes anyag, mely a vírus belépésénél fejt ki gátló hatását.

A Suligovirnak három, az antivirális hatás szempontjából fontos jellegzetessége van, melyek a kémiai módosításnak köszönhetőek, ezek:

1. a 4-tiono csoport megnöveli a bázis hidrofób jellegét.
2. a 4-tiono csoport tautomer átrendeződésével a bázis 4-es helyén reaktív -SH csoport alakulhat ki.
3. a bázison történő tiolálás a foszfodiészter kötések módosítása nélkül is egy a nukleázokkal szemben igen ellenálló oligonukleotidot eredményez.

A Suligovir nem jut át a sejtmembránon, hanem a sejt felszínén helyezkedik el. Ez egy igen jelentős különbség a Suligovir és sok más, HIV-ellenes aktivitással rendelkező oligonukleotid között. Valószínűleg ez a tulajdonság lehet részben felelős az alacsony toxicitásért. Másrésről, a Suligovir nem toxikus természete azzal is magyarázható, hogy a sejtfelszíni kölcsönhatás specifikus, a Suligovir csak bizonyos sejtfelszíni célpontokat támad.

5 ÖSSZEFOGLALÁS

Munkacsoportunk biológiailag aktív oligonukleotidok tanulmányozása és fejlesztése során egy potens anti-HIV aktivitással rendelkező oligonukleotidot állított elő, melyet Suligovirnak neveztünk el, kémiai szerkezete: $(s^4dU)_{35}$. Doktori disszertációmban az $(s^4dU)_{35}$ kémiai szintézisének optimalizálása, kémiai, biokémiai karakterizálása, valamint anti-HIV aktivitásának tanulmányozása során végzett munkámat mutatom be.

1. Kidolgoztunk két módszert a Suligovir előállítására:

A módszer: előállítottuk a 4-tio-dezoxiuridin foszforamidit és CPG származékát és ezek felhasználásával a Suligovirt automata oligonukleotid szintetizálóban

B módszer: előállítottuk $(dC)_{35}$ -ből folyékony H_2S kezeléssel a Suligovirt

2. 1H -, ^{13}C -, ^{31}P -NMR spektroszkópiás és tömegspektrometriás módszerekkel meghatároztuk a két módon előállított Suligovir kémiai szerkezetét. Megállapítottuk, hogy a Suligovir A nem teljesen tiolált (31-32 kénatomot tartalmaz), míg a Suligovir B tiolása gyakorlatilag teljes (35 kénatomot tartalmaz molekulánként).
3. A két módszerrel előállított Suligovir biológiai aktivitásában nem találtunk lényeges eltérést. Megállapítottuk, hogy szerkezeti inhomogenitása és magas előállítási költsége miatt az A módszerrel nem célszerű nagyobb mennyiségben előállítani a Suligovirt, de kísérleti rendszerekben a Suligovir B-vel azonos biológiai aktivitása miatt fel lehet használni.
4. Kimutattuk, hogy a Suligovir nukleázokkal szemben a kiindulási, módosítatlan $(dC)_{35}$ oligonukleotidhoz képest negyvenszer stabilabb és a celluláris toxicitása nagyon alacsony.
5. A Suligovir a $CD4^+$ sejtekhez tízszer nagyobb mértékben kötődött, mint a $CD4^-$ sejtekhez.
6. CLSM vizsgálataink szerint a Suligovir a sejt belsejébe nem jut be, hanem a sejt felszínén a koleszterin gazdag lipid „raft”-okban elhelyezkedő $CD4$ molekulákhoz kötődik. A sejtfelszínen jelentősen kolokalizál a tioredoxinnal is és vele kovalens kölcsönhatást is kialakíthat.

Összefoglalva: a Suligovir egy ígéretes terápiás ágens a HIV fertőzés vagy az AIDS kezelésére, egy a vírus bejutását gátló inhibitor. A folyamatban lévő *in vivo* kísérletek döntik majd el, hogy a Suligovir csupán egy elméleti szempontból érdekes molekula vagy további fejlesztés után esetleg gyógyszerként jelenhet meg egy súlyos, halálos kimenetelű betegség, az AIDS kezelésében.

6 KÖZLEMÉNYEK

Az értekezést megalapozó in extenso közlemények:

1. Horváth A. and Aradi J. (2005): Advantages of sodium-perchlorate solution as mobile phase for purification of synthetic oligonucleotides by anionexchange chromatography *Analitical Biochemistry* **338**(2), 341-343. IF: 2,174
2. Horváth, A., Tőkés S., Hartman, T., Watson, K., Turpin, J.A., Buckheit, R.W., Jr., Sebestyén, Z., Szöllősi, J., Benkő, I., Bardos, T.J., Dunn, J.A., Tóth, F.D., Fésüs, L., and Aradi, J. (2005): Potent inhibition of HIV-1 entry by (s⁴dU)₃₅ *Virology* **334**(2), 214-223 IF: 3,391
3. Horváth, A., Tőkés S., Beck, Z., and Aradi, J. (2005) Inhibition of HIV-1 replication by 4-thio-oligodeoxyuridylates (*közlésre beküldve*)

A disszertációhoz nem kapcsolódó egyéb in extenso közlemények:

1. Sztaricskai, F., Csorvási, A., Horváth, A., Batta, Gy. and Dinya, Z. (2000) Synthesis and conformational studies of unnatural pyrimidine nucleosides. *J. Carbohydrate Chemistry* **19**(9), 1223-1233. IF: 0,974
2. Tarkanyi, I., Horváth, A., Szatmari, I., Eizert, H., Vámosi, Gy., Damjanovich, S., Segal-Bendirdjian, E., Aradi, J., (2005) Inhibition of human telomerase by oligonucleotide chimeras, composed of an antisense moiety and a chemically modified homo-oligonucleotide *FEBS Lett.* **579**(6), 1411-1416. IF: 3,609

Konferenciák:

1. Magyar Kemoterápiai Társaság Konferenciája, Hajdúszoboszló, 2001, május 24. Horváth A., Szatmári I., Aradi J., Telomeráz ellenes kiméra oligonukleotidok szintézise és vizsgálata
2. Magyar Kemoterápiai Társaság Konferenciája, Hajdúszoboszló, 2001, május 24. Tárkányi I., Horváth A., Aradi J., Telomeráz protein mRNS és telomeráz RNS komponens ellenes antiszensz oligonukleotidok hatása A431 sejteken
3. Magyar Tudományos Akadémia Nukleotid Kémiai Csoportjának Konferenciája, Szeged, 2002, június 6. Horváth A., Tőkés Sz., Aradi J., A 4-tio-dezoxiuridin szubsztrátja és gátlószere a reverz transzkriptáznak
4. Magyar Tudományos Akadémia Nukleotid Kémiai Csoportjának Konferenciája, Balatonszemes, 2003, június 6. május 27.. Horváth A., Kovács L., Kupihár Z., Hornyák M., Kovács Gy., Pádár P., Bárdos T., Aradi J., Új eredmények a Suligovir, (s⁴dU)₃₅ szintézisében és antivirális aktivitásában

Poszterek:

1. Magyar Biokémiai Társaság Konferenciája, Sopron, 2000, Szatmári, I., Horváth A., Aradi J., Humán telomeráz gátlása kémiaileg módosított oligonukleotidokkal
2. Magyar Biokémiai Társaság Konferenciája, Sárospatak, 2001, Katona K., Tőkés Sz., Horváth A., Tárkányi I., Aradi J. Apoptózist indukáló lipofil dAMP származékok szintézise és biológiai karakterizálása
3. „Tavaszi Szél” Ph. D. Hallgatók Konferenciája, Gödöllő, 2001 Horváth A., Aradi J. Telomeráz gátló hatású 4-tio-dezoxiuridilátot tartalmazó oligonukleotidok szintézise és biológiai vizsgálata
4. *HIV DART 2004*, St. James, Jamaica, West Indies, J. Aradi, A. Horváth, T.J. Bardos, J.A. Turpin, R.W. Buckheit, Jr. J.A. Dunn Potent inhibition of HIV-1 replication by Suligovir [(s⁴dU)₃₅].