

**HUMAN HERPESVIRUS 8 ÉS EGYÉB HERPESVÍRUSOK, VALAMINT ENZIMEIK
ÉRZÉKENYSÉGE KÜLÖNBÖZŐ KEMOTERAPEUTIKUMOKKAL SZEMBEN**

Ph. D. értekezés tézisei

dr. Gáspár Gábor

Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet
Általános Orvostudományi Kar
Szent-Györgyi Albert Orvos- és Gyógyszeréstudományi Centrum
Szegedi Tudományegyetem

2004

BEVEZETÉS

Human Herpesvirus 8 és a Herpesviridae család

A Kaposi-sarcoma (KS), melyet először Kaposi Mór magyar bőrgyógyász írt le 1872-ben, a vér- és nyirokerek mesenchymális eredetű daganata. Chang és munkatársai 1994-ben AIDS betegek Kaposi-sarcomás szövetmintáiból olyan DNS fragmentumokat izoláltak, melyek a Kaposi-sarcomához asszociált herpesvirusnak (KSHV) elnevezett új γ -herpesvírusból származtak. A vírus később a human herpesvirus 8 (HHV-8) nevet kapta. HHV-8 szekvenciákat találtak a Kaposi-sarcoma majdnem összes formájában /mind az AIDS-hez társuló, mind pedig az attól független léziókban/, erőteljesen sugallva azt, hogy ez a vírus etiológiai szerepet játszhat a Kaposi-sarcoma pathogenezisében, amely még mindig a leggyakoribb, HIV infekcióhoz társuló malignus megbetegedés.

A HHV-8 etiológiai szereppel bír a ritka testüregi B-sejtes lymphomákat illetve a multicentrikus Castleman-betegséget érintően, és feltételezhetőleg az angiosarcoma faciei valamint a bőr angiolymphoid hyperplasiája tekintetében is. A HHV-8, a herpesvírusok $\gamma 2$ csoportjának (rhadinovírusok) elsőként felfedezett emberi tagja, egy csoportba tartozik a rhesus rhadinovirussal (RRV) és a herpesvirus saimirivel (HVS). A HVS, melynek természetes gazdája a mókusmajom, emberi T-lymphocytákat is képes transzformálni.

Az emberi herpesvírusok közül a HHV-8 vonatkozásában a herpesvírusok $\gamma 1$ osztályába (lymphocryptovírusok) tartozó Epstein-Barr-vírus (EBV) mutatja a legnagyobb homológiát. A HHV-8 abban emlékeztet az Epstein-Barr-vírusra, hogy ugyanúgy sejttropizmussal rendelkezik a B-lymphocyták iránt, látens fázisban is képes túlélni, és sejt kultúrákban történő hosszabb idejű tenyésztése nehézségekbe ütközhet. A produktív EBV fertőzést követően akut mononucleosis infectiosa alakulhat ki, míg a nem-produktív forma olyan rosszindulatú kórképekkel függhet össze, mint például a Burkitt-lymphoma, nasopharyngealis carcinoma és immunkárosodott egyéneknél különféle vírus által indukált lymphoproliferatív megbetegedések.

A herpesvírusok nukleotid anyagcseréjében szerepet játszó enzimek

A HHV-8 genom számtalan olyan enzimet kódol, mely a nukleozidok és nukleotidok bioszintézisében vesz részt. Ezek közül kiemelendő a timidin kináz (TK), a ribonukleotid reduktáz (RR), a dihidrofolát reduktáz (DHFR) és a timidilát szintetáz (TS).

Ez utóbbi két enzim kulcsszerepet játszik jónéhány herpesvírus, így a HHV-8 nukleotidanyagcsere mechanizmusában is.

A **timidilát szintetáz** az 5,10-metiléntetrahidrofolát és dUMP dihidrofolát és dTMP vegyületekké történő átalakulásának reakcióját katalizálja. Mivel ez az anyagcsereút az egyetlen lehetőség a dTTP-szintézis *de novo* formájára, a timidin kináz segítségével történő dTMP képződés hiányában (elkerülő útvonal), a TS által katalizált reakció tekinthető a sebességmeghatározó lépésnek a DNS-szintézist illetően. Ezért akadályozható meg a sejtosztódás, ha gátoljuk a timidilát szintetázt. Számos tumorsejt típus mutat emelkedett TS aktivitást, ami az onkoterápiás szerek egyik fő csapásirányát jelenti.

A varicella-zoster vírusról (VZV) kimutatták, hogy működőképes TS-t kódol. A HVS genom szintén tartalmaz TS gént. A β -herpesvírusokhoz tartozó humán cytomegalovírus (HCMV) nem hordoz magában TS szekvenciát, viszont erőteljesen fokozza a vírussal fertőzött emberi embrionális tüdősejtek TS aktivitását. A HHV-8 genetikai állományában megtalálható a TS gén, s a HHV-8 TS gént hordozó expressziós vektorral transzfektált sejtek cytoplasmájában a TS protein meg is jelenik, ám az enzim funkcionalitására utaló bizonyíték vizsgálataink előtt nem került elő.

A **dihidrofolát reduktáz** ubiquiter enzim, mely a dihidrofolát (DHF) tetrahidrofoláttá történő redukcióját végzi el NADPH segítségével, s így nélkülözhetetlen szerepet vállal a *de novo* purin, glicin és methionin szintézisben, valamint a timidilát képződésében.

A DHFR ismert célpontja különböző anyagoknak. Néhány DHFR inhibitor, mint például a metotrexát (MTX) és aminopterín (AMT) sikerrel vizsgázott a daganatterápia területén is. A szintén a DHFR-t gátló trimetoprim (TMP) pedig hatékony antibiotikum, míg a pyrimethamin (PYR) a maláriaellenes kezelésben kulcsfontosságú szer.

A herpesvírusok közül a human herpesvírus 8, a herpesvírus saimiri, a herpesvírus ateles és a rhesus rhadinovírus kódol önállóan DHFR-t.

Az emberi illetve az egér cytomegalovírus nem rendelkezik DHFR génnel, viszont jelentősen növeli a DHFR aktivitását a nyugvó sejtekben. Az EBV egy viszonylagosan állandó DHFR

mRNS szintet tart fenn a vírus által transzformált sejtekben a sejtciklus valamennyi szakaszában, de ezt nem saját virális dihidrofolát reduktáza révén éri el, hisz ez az enzim a genomjában nem található meg.

Antivirális stratégiák a HHV-8 és az EBV elleni küzdelemben

A HHV-8 replikációját jónéhány herpesvírus ellenes szer gátolhatja szelektíven, mint például a ganciklovir és a cidofovir. A KS incidenciáját alacsonyabbnak találták azoknak az AIDS betegeknek a körében, akik ganciklovir kezelésben részesültek.

A széles spektrumú aciklikus nukleozid foszfonát analóg cidofovir, mely antivirális hatásának kifejtéséhez nem igényel virális eredetű kinázokat, Kaposi-sarcomában szenvedő betegeknek került beadásra. A szer öt héten keresztül történő injektálása után sem következett be azonban változás a klinikai, hisztológiai, immunhisztológiai avagy a virológiai képet illetően, a fiziológiás sóoldattal injektált léziókkal összehasonlítva.

Tekintve, hogy az epidemiológiai bizonyítékok is a KS virális pathogenezisét támasztják alá, az interferon alkalmazása logikus választásnak tűnhet a daganatellenes harcban. Több vizsgálatot végeztek az interferon ez irányú hatásával kapcsolatosan. Összegzőképpen elmondható, hogy ezen vizsgálatok mind dózisfüggő tumorcsökkenést mutattak ki. A HHV-8 azonban az interferon hatásával szemben védekező mechanizmussal is rendelkezik, mely az interferon szignál transzdukcióját befolyásolja.

Az EBV okozta primer infekciót követően a gazdasejt eredetű immunválasz jelentős szerephez jut abban, hogy a vírus - akár életre szólóan is - látens módon perzisztáló állapotban maradjon a memória B-sejtekben. Az EBV szeropozitív immunkompetens egyénekben a vírussal fertőzött keringő B-sejtek száma csekély. A veleszületett avagy szerzett immundeficienciában szenvedő betegekben az EBV infekcióhoz társultan lymphoproliferatív kórképek alakulhatnak ki. A szervátültetések után fellépő lymphoproliferatív rendellenességek legalább 90%-a vezethető vissza az EBV kóroktani szerepére, amit mi sem jelez jobban, hogy a diagnózis felállításakor többnyire jelentősen emelkedett EBV szintet lehet tapasztalni.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Ismert, hogy a HHV-8, a RRV és a HVS genetikai állománya TS gént tartalmaz. Kutatási programunkban szerepelt ezeknek a génszekvenciáknak a vizsgálata a funkcionalitás tükrében, illetve az enzimkinetikai paraméterek leírása.

Számos enzimgátló szer képes kapcsolódni a TS pirimidin- illetve folát kofaktor kötő helyeihez. Kísérleteink alkalmával a dUMP-analógok hatékonyságát kívántuk feltárni a HHV-8, a HVS és a VZV eredetű timidilát szintetázok vonatkozásában.

2. A HVS, csakúgy mint a RRV dihidrofolát reduktáz gént hordoz a genomjában, ám ezen enzimek működőképességét ezidáig még nem sikerült tisztázni. Célként határoztuk el annak kiderítését, hogy ezek a vírusok vajon funkcionális enzimet kódolnak-e, s ha igen, akkor ezek milyen tulajdonságokkal jellemezhetők, beleértve az egyes inhibitorokkal szembeni érzékenységüket is.

3. Az antivirális szerek hatékonyságának eltérő kiértékelési módjait figyelembe véve, egy gyors, pontos és kényelmes valós idejű kvantitatív PCR (TaqMan) módszer kidolgozását tűztük ki célul egyes molekulák EBV és HHV-8 ellenes hatásának monitorizálására.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A sejtvonalak indukciója

A herpesvírus ellenes nukleozid analógok vírusreplikációt befolyásoló hatásának vizsgálata a HHV-8 esetében a BCBL-1 sejtvonalon, az EBV vonatkozásában pedig a P3HR-1 sejtvonalon valósult meg. A sejtek tenyésztése 10%-os inaktivált borjúsavót, valamint antibiotikumokat tartalmazó RPMI 1640 tápfolyadékban történt. Mindkét sejtvonala indukciója 12-O-tetradekanoil-phorbol-13-acetát segítségével került kivitelezésre. A sejt kultúrák a vizsgált anyagok hígítási sorával 7 napon keresztül lettek inkubálva, s ezt követően a teljes celluláris DNS tartalom kivonásra került.

A virális DNS extrakciója

A HHV-8 DNS izolálása HHV-8-t tartalmazó BC-3 és BCBL-1 sejtvonalakból, valamint egy-egy klasszikus Kaposi-sarcomában szenvedő magyar illetve belga betegtől származó

biopsziás anyagból történt. A VZV DNS (OKA törzs) vírussal fertőzött fibroblasztokból került kinyerésre. A DNS extrakciója 'QIAamp DNA Blood Mini Kit' segítségével történt valamennyi esetben. A HVS és RRV DNS-t liofilizált formában kaptuk ajándékba.

Enzimtisztítás

A megfelelő gének amplifikációja PCR segítségével ment végbe. A keletkezett amplikonok a pCR4-TOPO TA vektorba kerültek klónozásra, majd a klónozott fragmentumokat végigszekvenáltuk. A HHV-8 BC-3 és BCBL-1, valamint a HVS, VZV és RRV szekvenciák protein szinten 100%-osan megegyeztek a National Center for Biotechnology Information génbankjának adataival. A Kaposi-sarcomás belga betegből izolált DNS szakasz A-G szubsztitúciót mutatott a 21047. nukleotidnál és a 20824. nukleotidnál. A magyar betegből származó HHV-8 TS szakasz C-T szubsztitúciót hordozott a 21012. nukleotidnál, A-G szubsztitúciót a 20776. nukleotid esetében és T-A szubsztitúciót a 20177. sz. nukleotidpozíciót illetően (a fenti nukleotidpozíciók a génbank U75698 jelű szekvenciaállományánál alkalmazott számozásnak felelnek meg). A gének szubklónozását a pGEX4 nevű bakteriális expressziós vektorba végeztük el. Az így kapott plazmidokat kompetens *Escherichia coli* BL21 sejtek transzformálására használtuk fel. A sejtek indukciója 0,1 mM izopropil β -D-tiogalaktozid segítségével zajlott 6 órán át 25 °C-on. A sejteket 10000xg fordulattal centrifugáltuk 10 percig 4 °C-on, majd reszuszpendálást végeztünk. Ezután nukleáz hozzáadása következett 20 percre szobahőmérsékleten. A feltisztult lizátumokat 20 percig centrifugáltuk 15000xg fordulattal 4 °C-on, s végezetül a rekombináns enzimek kinyerésére szolgáló eljárás utolsó lépéseként a Gluthatione Sepharose 4B segítségével történő glutationos fehérjeelválási protokoll zárta a sort. A proteinkoncentráció meghatározását SDS-PAGE alkalmazásával oldottuk meg, ami az expresszált fehérje méretének és tisztaságának az ellenőrzését volt hivatott szolgálni.

A TS enzimaktivitásának mérése

A szükséges enzimmennyiséget az [5-³H] dUMP szubsztráttal a kofaktor 5,10-metilén-5,6,7,8-tetrahidrofolát jelenlétében 5.0 mM formaldehidet, 15 mM β -merkaptotetanolt és 0.1 mM NaF-t is tartalmazó 50 mM Tris-HCl pufferben (pH 7.5) inkubáltuk. Az adott kísérleti körülményeknek megfelelően váltakozó koncentrációban használtuk a dUMP-t, az 5,10-

metilén-5,6,7,8-tetrahidrofolátot illetve adott esetben a vizsgálandó inhibitort. Az enzimreakciókat a TS enzim hozzáadásával indítottuk el, majd hagytuk lezajlani a kellő ideig 37 °C-on. A reakció leállítását 1 ml aktív szén (100 mg/ml 2%-os triklórecetsavban) hozzáadásával, majd a reakcióelegyet tartalmazó csövek jégre helyezésével hajtottuk végre. Ezt egy 3000 rpm fordulatszámon történő 10 perces (4 °C) centrifugálás követte. A trícium felszabadulás meghatározása a radioaktivitás nagyságának mérésén alapult. A háromszor egymásután megismételt kísérletsorozatok eredményeinek kiértékeléséhez a Graphpad Prism program 3.02 verzióját vettük igénybe.

A DHFR enzimaktivitásának mérése

A reakcióelegy, melynek alapját 50 mM 2-morpholinetánszulfonsavat, 25 mM Tris-t, 25 mM etanolamint és 100 mM NaCl-t tartalmazó puffer alkotta (pH 7.8), adott koncentrációjú DHF-ból és NADPH-ból, valamint 14 µM β-merkaptóetanolból állt össze. A reakció az enzim hozzáadásakor indult el. Az abszorbanciacsökkenést 340 nm-es hullámhosszon 25 °C-on detektáltuk a Spectramax 190 műszer segítségével. A K_m és K_i értékek meghatározására különböző koncentrációjú szubsztrátot, illetve inhibitort alkalmaztunk. Az enzimkinetikai jellemzők kiszámításához a Graphpad Prism program 3.02 verzióját használtuk fel.

Blothibridizációs vizsgálat

A vizsgált anyaggal kezelt sejtvonalakból, valamint a kontrollsejtekből származó teljes celluláris DNS 10 µg-nyi mennyisége denaturált formában nylon membránra lett rögzítve UV-fénnyel létrehozott keresztkötések révén, majd egy előhibridizáció került végrehajtásra 1 órán át 42 °C-on. A próba jelölése digoxenin-dUTP segítségével történt adekvát PCR körülményeket biztosítása mellett. A próba ezután géltisztításon ment át, s egy 18 órán át tartó hibridizáció következett 42 °C-on a digoxigenin-11-dUTP jelzett próba 30 ng/ml mennyiségével. A membránt 10 percig mostuk szobahőmérsékleten nagy erővel, majd 2 x 15 percig 0.1x SSC-0.1% nátrium dodecil szulfáttal 65 °C-on. A filter blokkoló pufferben történő áztatása után a digoxigenin ellenes antitesttel történő inkubálás került sorra. A konjugált alkalikus foszfát aktivitásának mérése standard kemolumineszcenciás eljárás keretében zajlott.

Kvantitatív PCR teszt

TaqMan technológián alapuló valós idejű vizsgálati módszer került kifejlesztésre mindkét vírus vonatkozásában. Az EBV mennyiségi nyomon követése a BNRF1 gén kimutatását célozta meg. A kísérleteink során alkalmazott PCR primerek az alábbiak voltak: 5'-CGGCCGTGATGGAGGCTATG-3' (forward primer), 5'-AGACAGAGGCCACCACGG-3' (reverz primer), és 5'-TGACCTTTGGCTCGGCCTCCTGC-3' (TaqMan próba, mely az 5' végen 6-karboxifluoreszcein (FAM) nevű jelző festéket, a 3' végen pedig 6-karboxitetrametilrhodamin (TAMRA) nevű fluoreszcenciát csillapító festéket tartalmazott). A HHV-8 kvantifikálására szolgáló PCR primerek esetében az ORF73 gén szekvenciája nyújtotta a kiindulási alapot: 5'-CCGAGGACGAAATGGAAGTG-3' (forward primer), 5'-GGTGATGTTCTGAGTACATAGCGG-3' (reverz primer) és 5'-FAM-ACAAATTGCCAGTAGCCCCACCAGGAGA-TAMRA-3' (TaqMan próba). A PCR reakciók színteréül 96-lyukú optikai reakciótálcák szolgáltak. A TaqMan vizsgálati módszer tesztelése egy ABI Prism 7700 szekvenciadetektáló rendszer közreműködésével történt. Az egyes kis üregekben 25 µl végtérfogatnyi PCR-elegy szerepelt, mely 12.5 µl TaqMan egyetemes PCR mesterkeveréket, 2.5 µl templát DNS-t, 100 nM TaqMan próbát és az egyes primerekre vonatkozóan pedig 300 nM oligonukleotidot tartalmazott. A PCR kivitelezési kondíciói az alábbiak voltak: 2 perc 50 °C-on, azután 10 perc 95 °C-on, s ezt 55 ciklus követte, mely egyenként 15 másodpercnyi 95 °C-os és 1 percnyi 60 °C-os részből tevődött össze. Valamennyi vizsgálati felállás két negatív kontrollt és a plazmidmintából egy hígítási sort is magában foglalt. A küszöbérték ciklusok (C_T) értékeinek megállapítására minden egyes PCR-teszt alkalmával standard görbe került felvételre. A PCR kapcsán tett mérések az összes esetben még egy alkalommal ismétlést nyertek.

EREDMÉNYEK

Timidilát szintetáz

Klónoztuk és expresszáltuk a HHV-8, RRV, HVS és VZV timidilát szintetázokat. Megállapítottuk továbbá, hogy úgy a HHV-8 pozitív BC-3 lymphoma sejtvonalból, mint a HHV-8 pozitív (egy-egy belga illetve magyar betegből vett) KS biopsziás mintából származó

virális TS gének enzimatikusan egyaránt aktív proteint kódolnak. Ezen túlmenően a HVS és a VZV eredetű timidilát szintetázok is manifeszt enzimátikus aktivitással bírtak. A RRV TS enzimhez köthető funkcionalitást azonban nem tudtunk kimutatni, noha több különféle alternatív klónozási stratégiát is bevetettünk és a megfelelő méretű fehérjét is sikerült kifejeznünk. A kérdés így tehát az marad, hogy a RRV TS vajon tényleg funkcionálisan aktív-e avagy az általunk használt speciális RRV törzs történetesen defektív TS-t kódol. Ezt követően a HHV-8, HVS és VZV timidilát szintetázok kinetikai sajátosságait tanulmányoztuk és hasonlítottuk össze. A két szubsztrátra (dUMP és CH_2H_4 -folát) vonatkozó K_m értékek és a k_{cat} jelzőszámok mindhárom herpesvírus vonatkozásában nagyon hasonlóak voltak és egyazon tartományba estek, mint az emberi TS kapcsán közölt jellemzők. Ezt követően három nagyon jól ismert TS inhibitor, az 5-fluoro-2'-deoxyuridin-5'-monofoszfát (FdUMP), az 5-jód-2'-deoxyuridin-5'-monofoszfát (IdUMP) és az (E)-5-(2-bromovinil)-2'-deoxyuridin-monofoszfát (BVdUMP), valamint a termékgátlást kifejtő dTMP hatását vettük górcső alá a különböző virális TS enzimek vonatkozásában. A gátlás típusa kompetitív volt a dUMP tekintetében mindhárom vizsgált vegyületet illetően. A HHV-8, HVS és VZV által termelt timidilát szintetáz hatóanyagokkal szembeni érzékenysége egyformának bizonyult az emberi, egér és *Lactobacillus* timidilát szintetázéval. A HHV-8 által kódolt TS enzim épp ezért nem tűnik a célzott antivirális terápia megfelelő alanyának.

Dihidrofolát reduktáz

HHV-8, RRV és HVS eredetű dihidrofolát reduktázokat klónoztunk és fejeztünk ki megfelelő mennyiségben *E. coli*-ban. Mindhárom forrásból nyert rekombináns protein enzimatikusan aktívnak bizonyult. A HHV-8, HVS és RRV DHFR enzimek egyedi sajátosságai is leírásra kerültek. A DHF és NADPH szubsztrátvegyületekre vonatkozó K_m értékek, valamint az átviteli számaik is (k_{cat}) eléggé közel estek egymáshoz a három herpesvírus enzim egymással történő összehasonlításában. A DHF molekulára vonatkozó K_m értékeket mindhárom virális enzim tekintetében következetesen 5-15-ször magasabbnak mértük annál az értéknél, mint ami az emberi enzimre vonatkozóan a szakirodalomból ismert, míg a NADPH koenzimre vonatkozó K_m értékek elég közeli hasonlóságot mutattak az emberi DHFR enziméhez. A három herpesvírus k_{cat} paraméterei 1,5-2-szer kisebbnek bizonyultak az emberi enzimre karakterisztikus értéknél. Következő lépésben öt folát antagonistát /MTX, AMT, TMP, PYR

és N(α)-(4-amino-4-deoxypteroyl)-N(δ)-hemiphtaloyl-L-ornithine (PT523)/ gátló hatását teszteltük le a különböző virális DHFR enzimeken. Mindhárom virális enzim hasonlóképpen viselkedett az inhibitorokkal szembeni érzékenységet érintően, jóllehet a molekulák szenzitivitási sorrendje az alábbiak szerint alakult: TMP<<PYR<AMT<MTX<PT523. A virális DHFR enzimek máskülönben sokkal kevésbé voltak érzékenyek ezekre a gátlószerekre, mint azt az emberi DHFR esetében tapasztalni lehetett. Ez azt jelezheti, hogy a herpesvírusok DHFR enzime feltételezhetően nem ideális célterület a szelektív antivirális terápiában.

Különböző molekulák HHV-8 és EBV ellenes hatásának vizsgálata

A HHV-8 esetében a ganciklovir, cidofovir és brivudin megközelítően egyforma gátló hatást fejtek ki kvantitatív PCR (Q-PCR) módszerrel vizsgálva (EC_{50} értékek 1-2 μ g/ml körül alakultak). Ezek az értékek ugyanazon, sőt lényegében megegyező tartományba estek a hibridizáció során nyert adatokkal. Az adefovir és az aciklovir valamivel kevésbé volt hatásos; bár az ezen vegyületekre számított EC_{50} értékek alapvető hasonlóságról tettek tanúbizonyságot mindkét módszerrel nézve.

A kiválasztott vegyületek hatásosságának EBV replikációt érintő tanulmányozása a P3HR1 sejteken zajlott. A cidofovir bizonyult a leghatásosabb inhibitornak az EBV replikációt illetően. Az adefovir és a ganciklovir egyforma hatáserősséggel bírtak, ami nagyjából 3-10-szer haladta meg az aciklovir hatásspektrumát. A brivudin volt jellemezhető a leggyengébb antivirális potenciállal. A Q-PCR módszer segítségével kapott EC_{50} értékek az EBV vonatkozásában is nagy hasonlóságot mutattak a hibridizációs vizsgálat révén szerzett eredményekkel.

MEGBESZÉLÉS

Timidilát szintetáz és dihidrofolát reduktáz

A HHV-8 DHFR (ORF 2) és TS (ORF 70) gének a korai szakaszban expresszálandó gének családjába tartoznak. A HHV-8 genom citokineket kódoló szegmensében helyezkednek el, s nem a HVS ORF 2 illetve ORF 70 géneknek megfelelő locusokban. A HVS DHFR gén elrendeződése viszont a RRV DHFR gén lokalizációjával mutat párhuzamot. A HVS DHFR

külön gyökerekre vezethető vissza és sokkal kisebb átalakuláson ment keresztül, mint a HHV-8 DHFR. A HHV-8 DHFR filogenetikailag sokkal távolabb esik az emberi DHFR proteintól, mint a HVS enzimvariáns, azt sejtetve, hogy a DHFR gén gazdasejt eredetű cDNS formájában független evolúciós történések révén juthatott be a vírus örökítőanyagába. A HVS DHFR gén az onkogén szerepkörrel bíró saimiri transforming protein (STP) mögött található, míg a RRV DHFR amögött az R1 protein mögött lelhető fel, mely úgyszintén onkogén sajátságokkal rendelkezik. Ezzel ellentétben a HHV-8 DHFR kilenc olvasási kerettel lentebb húzódik meg, mint az onkogénként jellemzett K1 gén. Az a tény, hogy ezek a vírusok a TS/DHFR komplex mindkét tagját összegyűjtötték genetikai állományukban, arra utalhat, hogy e két enzim fontos szerepet játszhat a vírussal fertőzött sejtek elegendő mennyiségű timidiláttal való ellátásában a virális DNS-szintézise során. Azt viszont homály fedi, hogy egyes herpesvírusok miért hordoznak magukkal saját TS és DHFR enzimeket, mialatt más herpesvírusok ezt nem teszik. Valószínűsíthető, hogy a dihidrofolát reduktáz és a timidilát szintetáz úgy vesz részt a malignus folyamat kialakulásában, hogy a transzformált sejteket bőséges mennyiségű timidilátban részesíti. A daganatképző hatással nem rendelkező VZV is működőképes TS enzimet kódol, ám ez nem feltétlenül mond a fenti hipotézisnek ellent, mivel a VZV nem rendelkezik saját DHFR génnel, sőt még a virális timidilát szintetáz sem esszenciális a replikációhoz in vitro. A γ -herpesvírusok által kódolt TS és DHFR fehérjék megnövelhetik a vírus sokszorozódásának effektivitását és elősegíthetik a perzisztens vírusreplikációt a nyugalmi állapotban lévő sejtekben, mint például a lymphocytákban, melyek celluláris DHFR tartalma alacsony.

HHV-8 és EBV ellenes antivirális kemoterápia

A HHV-8 és EBV elleni antivirális stratégia különböző kutatási módszereket sorakoztathat fel, beleértve a tumorsejtek közvetlen vizsgálatát és állatvírus modellrendszerek igénybe vételét is; azonban a valós idejű kvantitatív PCR lehetővé teszi különböző molekulák HHV-8 és EBV ellenes hatásának vizsgálatát gyors, ám mégis kényelmes és pontos módon. Az aciklovir, ganciklovir, cidofovir, adefovir és brivudin referenciamolekulák ez utóbbi módszerrel feltérképezett vírusellenes hatásprofilja nagymértékben emlékeztetett arra, amit a DNS-DNS hibridizációs metódus segítségével határoztunk meg.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. Kimutattuk, hogy mind a BC-3 lymphocytá sejtvonalból, mind pedig a Kaposi-sarcoma elváltozásokból származó HHV-8 olyan gént kódol, mely funkcionális timidilát szintetáz határoz meg. Leírtuk ezen enzim kinetikai jellemzőit és összehasonlítottuk azokat más organizmusok által kódolt timidilát szintetázok enzimatikai paramétereivel.
2. HHV-8, HVS és RRV eredetű dihidrofolát reduktázokat fejeztünk ki és izoláltunk *E. coli*-ből. Mindhárom fehérje katalitikusan aktívnak bizonyult. Ezen enzimek részletes jellemzőit feltártuk, majd összevetettük egymással valamint emberi megfelelőjükkel.
3. Valós idejű kvantitatív PCR módszert fejlesztettünk ki különböző molekulák HHV-8 és EBV ellenes hatásának vizsgálatára. Az aciklovir, ganciklovir, cidofovir, adefovir és brivudin referenciamolekulák e módszerrel feltérképezett vírusellenes hatásprofilja nagymértékben emlékeztetett arra, mint amit a DNS-DNS hibridizációs módszer segítségével nyertünk.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Legőszintébb és legmélyebb köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, **Prof. Dr. Prágai Béla**, akadémiai doktornak (Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet, Szegedi Tudományegyetem) és **Prof. Dr. Kemény Lajos**, akadémiai doktornak (Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika, Szegedi Tudományegyetem). Tudomány iránti lelkesedésük, valamint a logikus gondolkodásra irányuló kivételes képességük nagymértékben ösztönözték érdeklődésemet a kísérletes kutatómunka felé. Külön köszönöm Prof. Dr. Prágai Béla szakmai biztatását, mely a SZOTE Mikrobiológiai Intézetben történő felbukkanásomtól kezdődően végigkísért a tudomány világának ösvényein. Nagyon nagy hálával tartozom **Dr. Johan Neyts**, Ph.D. és **Dr. Erik De Clercq**, Ph.D. professzor uraknak (Virológiai és Kemoterápiai Intézet, Leuveni Katolikus Egyetem), akik megtanítottak arra, hogy a tudományos gondolkodás mennyire szorosan együttjárhat a kreativitással. Nagyon sokat köszönhetek kiváló irányításuknak és értékes javaslataiknak, melyekben leuveni ösztöndíjas éveim alatt részesítettek. Tudományos tevékenységem sikerességéhez való hozzájárulásuk pótolhatatlan volt.

Meg szeretném köszönni **Prof. Dr. Gönczöl Évának** és **Prof. Dr. Mándi Yvettenek** (Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet, Szegedi Tudományegyetem), valamint **Prof. Dr. Dobozy Attilának** (Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika, Szegedi Tudományegyetem) az intézményi kutatási háttér biztosítását.

Hálás vagyok **Dr. Nagy Ferenc** akadémiai doktornak (MTA SZBK, Szeged) és **Dr. Thomas Deckernek** (Molekulárbiológiai és Genetikai Intézet, Bécsi Tudományegyetem), amiért lehetőséget teremtettek kísérleti tapasztalataim bővítésére.

Köszönet illeti ezen túlmenően valamennyi olyan intézeti kollegát és laboratóriumi munkatársat, akik bármilyen módon segítséget nyújtottak kutatásaim során.

Szeretném megköszönni a **Magyar Soros Alapítványnak** és a **Leuveni Katolikus Egyetemnek**, hogy posztgraduális tanulmányok végzése céljából anyagi támogatásban részesített. Köszönet jár családomnak, menyasszonyomnak és barátaimnak is, akik folyamatos szeretete és kitartó türelme mindvégig energiával töltött fel.

A PhD TÉZISHEZ KAPCSOLÓDÓ CIKKEK:

1. Gáspár G, De Clercq E, Neyts J. 2002. Human Herpesvirus 8 Gene Encodes a Functional Thymidylate Synthase. Journal of Virology. 76: 10530-32 IF: 5.241

2. Gáspár G, De Clercq E, Neyts J. 2002. Gammaherpesviruses encode functional dihydrofolate reductase activity. Biochemical and Biophysical Research Communications. 297: 756-59 IF: 2.935

3. Friedrichs C, Neyts J, Gáspár G, De Clercq E, Wutzler P. 2004. Evaluation of antiviral activity against human herpesvirus 8 (HHV-8) and Epstein-Barr virus (EBV) by a quantitative real-time PCR assay. Antiviral Research. 62: 121-23 IF: 2.911

A PhD TÉZISHEZ KAPCSOLÓDÓ ABSZTRAKT:

1. G. Gáspár, F. Nagy, L. Kemény, B. Prágai, A. Dobozy. 1999. The effect of viral interferon regulatory factor of human herpesvirus 8 in human epithelial cells following interferon treatment. *Journal of Investigative Dermatology*. 113: 501 **IF: 4.903**