

EGYETEMI DOKTORI (Ph. D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**HUMÁN PAPILOMAVÍRUS GENOMI RÉGIÓK  
FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATA**

*Murvai Melinda*

Témavezető: Prof. Dr. Gergely Lajos

Dr. Veress György

Debreceni Egyetem  
Orvos-és Egészségtudományi Centrum  
Általános Orvostudományi Kar  
Orvosi Mikrobiológiai Intézet

2004



## Bevezetés

A cervix carcinoma a nők harmadik leggyakoribb daganatos megbetegedése, Magyarországon is a vezető halálokok közé tartozik. Az endocervix és az ectocervix találkozási helyéről kiinduló elváltozás több stádiumon megy keresztül, míg az invazív carcinoma kialakul. A betegség kialakulásában a humán papillomavírusoknak (HPV) van etiológiai szerepe: a méhnyakrákos betegek 90%-ában kimutatható az elváltozásokból papillomavírus genom, az esetek felében a HPV16 van jelen.

A HPV16 a Papillomaviridae családba tartozó, kis méretű, burok nélküli, ikozahedrális szimmetriájú DNS vírus. Genomja korai (early, E) és késői (late, L) fehérjék kódolásáért felelős szekvenciákat, illetve fehérjéket nem kódoló, szabályozó funkciójú (long control region, LCR) szakaszt tartalmaz.

A HPV16 replikációs ciklusa szoros összefüggésben áll a keratinociták differenciálódási folyamatával. A vírus az osztódó bazális sejteket fertőzi meg, és itt történik a korai gének expressziója is. A differenciálódott hámsejtekben lezajlik a vírusgenom replikációja, és a késői gének expressziója után létrejönnek az új virionok. Mivel a differenciálódott keratinocitákban már nincs celluláris DNS-szintézis, a HPV16 két legfontosabb transzformáló fehérjéje, az E6 és E7 protein teremti meg a virális DNS replikációjához szükséges feltételeket, azaz újra osztódásra készíti a gazdasejteket. Mindkét fehérje expressziója szükséges (és elégséges) a primer keratinociták hatékony immortalizációjához, melynek során fokozott proliferációjú, a terminális differenciációra rezisztens klónok alakulnak ki. Az E6 fehérje egy mediátor proteinen (E6-associated protein, E6AP) keresztül serkenti a celluláris p53 tumorszuppresszor fehérje ubiquitin-függő lebontását, így fejt ki transzformáló hatását. Az E7 onkoprotein a hypofoszforilált retinoblasztoma proteinhez (Rb) kapcsolódva megakadályozza annak az E2F transzkripció faktorhoz való kötődését, a szabad E2F1 hatására pedig a sejt beléphet az S fázisba, tehát képes immortalizálódni. A két fehérje expresszióját a P<sub>97</sub> fő korai promóter szabályozza, mely a HPV16 LCR régiójában helyezkedik el. Az LCR-ben található a vírus replikációs origója, virális E1 és E2 kötőhelyek, illetve különböző transzkripció faktorokra specifikus szekvenciák is.

A genitális hámot fertőző humán papillomavírusok onkogén kockázatuk alapján alacsony és magas kockázatú csoportba oszthatók. Az előbbi kategóriába tartozik a HPV6, HPV11, míg a magas onkológiai kockázatú csoportban található a HPV16 a HPV18, HPV31 és HPV45 mellett. Egy adott genotípuson belül különböző intratípusos variánsok létezhetnek.

A HPV16 európai (E) prototípusán kívül 2 afrikai (Af1 és Af2), egy ázsiai (As), egy ázsiai-amerikai (AA) és egy észak-amerikai (NA1) variáns ismeretes. Az intratípusos variánsok eltérő onkogén kockázattal rendelkeznek: az AA és NA1 gyakrabban társul magas kockázatú neopláziás elváltozásokhoz, mint a többi variáns. Ezért a jelenségért a P<sub>97</sub> fő korai promóter megnövekedett transzkripció aktivitása, és az E6 protein fokozottabb immortalizáló hatása lehet a felelős.

A különböző kórképekben a vírus fizikai állapota is eltérő. A benignus léziókban a HPV inkább episzómálisan van jelen, míg a malignus formákban általában a gazdasejt genetikai állományába ékelődött. Az integrációkor a cirkuláris vírusgenom felnyílik, és az E2 gén (esetleg az E1 is) felhasad. Így a P<sub>97</sub> promóter felszabadul az E2 protein gátlása alól, és megindíthatja a transzformáló fehérjék termelését. Ezzel együtt a vírusgenom immortalizáló képessége is növekszik. A HPV16-pozitív cervix carcinomákból gyakran izolálnak megnövekedett transzkripció aktivitású, az LCR-ben deléciókat tartalmazó variánsokat is. A különböző intratípusos, illetve természetes deléció variánsok részletesebb vizsgálata magyarázatot adhat a megnövekedett transzkripció aktivitásra, illetve a neopláziás elváltozások kimenetelét tekintve prognosztikai szerepe is lehet.

A cervix carcinoma kialakulásához a HPV-fertőzésen kívül celluláris események is hozzájárulnak. A betegség kifejlődésében jelentős szerepe van a gazdaszervezet immunológiai és genetikai hátterének, citokineknek, növekedési faktoroknak, illetve egyéb kofaktoroknak (szexuális szokások, dohányzás, hormonális hatások) is.

A TGF- $\beta$ 2 (transforming growth factor- $\beta$ 2) a TGF- $\beta$  citokincsalád tagja. A citokincsaládba több mint 40 fehérje tartozik. Biológiai funkciójuk sokrétű: részt vesznek az embrionális morfogenezisben és differenciálódásban, a sebgyógyulásban, az apoptózisban, stimulálják az angiogenezist, a sejtmigrációt és sejtadhéziót. A TGF- $\beta$  szignalizációs út szabályozásának megváltozása számos betegségben (arthritis, atherosclerosis, glomerulonephritis, öröklött telangiectasia) és a karcinogenezis során is megfigyelhető. A különböző TGF- $\beta$  izoformák szövetspecifikus módon expresszálódnak, és hatásuk eltérhet a sejtípustól és a sejtciklustól függően. A TGF- $\beta$ 1 főleg endotheliális, hematopoetikus és kötőszöveti sejtekben, a TGF- $\beta$ 2 epitheliális és neuronális, míg a TGF- $\beta$ 3 főleg a mesenchymális sejtekben van jelen. A TGF- $\beta$  karcinogenezisben betöltött szerepe kettős. Normál epithel sejtekben tumorszuppressorként funkcionál: gátolja a proliferációt, illetve serkenti a differenciálódást és az apoptózist azáltal, hogy sejtciklus-inhibitorokat (p15<sup>INK4B</sup>, p21<sup>CIP1/WAF1</sup>) indukál. Megnövekedett TGF- $\beta$  szint hatására viszont a tumorsejtek fokozott

inváziós és migrációs képességre tesznek szert, és fokozódik az angiogenezis is. A tumorképződés korai stádiumaiban az epithel sejtek még érzékenyek a TGF- $\beta$  sejtciklus-szabályozó hatására, míg a későbbi stádiumokban ez az érzékenység irreverzibilisen eltűnik. A TGF- $\beta$ 2 a keratinociták differenciálódása során indukálódik, és gátolja azok szaporodását. Mivel a humán papillomavírusok szaporodásához szükséges a fertőzött gazdasejtek osztódásának fenntartása, a TGF- $\beta$ 2 antagonisztikus hatása csökkenti a HPV szaporodásának esélyeit. Egy nemrég megjelent közleményben kimutatták, hogy a HPV16 E6 és E7 proteinje primer keratinocita sejt kultúrában csökkenti a TGF- $\beta$ 2 fehérje szintjét. Arról azonban, hogy milyen mechanizmus állhat a gátló hatás hátterében, nem volt adat.

## Célkitűzések

Vizsgálatainkkal az alábbi kérdésekre kívántunk válasz adni:

1. A HPV16 genom cervix carcinomából izolált, természetes deléciós variánsaiban bekövetkezett mutációk milyen hatással vannak a variánsok transzkripciós aktivitására? Eltér-e a különböző HPV16 intratípusok transzkripciós aktivitása? Milyen hatással van a HPV16 E2 proteinje a deléciós variánsok transzkripciós aktivitására?
2. Milyen hatása van a HPV16 E6 és E7 onkogénjének a TGF- $\beta$ 2 promóterére? Kapcsolódik-e a megfigyelt hatás a TGF- $\beta$ 2 promóter bizonyos szakaszához?
3. A HPV16 onkoproteinjeinek hatása a TGF- $\beta$ 2 promóterére összefügg-e a p53 vagy a retinoblasztoma tumorszupresszor protein jelenlétével? Milyen celluláris proteinek játszhatnak még szerepet a tapasztalt hatás létrejöttében?

## Anyagok és módszerek

### *Polimeráz láncreakció (PCR), plazmidok, klónozás*

A 33-as és 936-os, HPV16-pozitív minta teljes és 2-2 természetes deléciós variánsának LCR régióját (33LCR, 33LCRA1, 33LCRA2, illetve 936LCR, 936LCRA1 és 936LCRA2) cervix carcinomás mintából szaporítottuk fel ugyanazzal a primerpárral, amelyet a prototípus HPV16 LCR régiójának klónozásához is használtunk. A PCR reakciókhoz Pwo polimerázt használtunk, mert az enzim az 5'-3' DNS-polimeráz aktivitás mellett 3'-5' exonukleáz (proofreading) aktivitással is rendelkezik, ami magasabb másolási hűséget eredményez. Az amplimereket tisztítottuk, restrikciós enzimmel emésztettük, újra tisztítottuk, majd ugyanazokkal a restrikciós enzimekkel emésztett pUC19 vektorba klónoztuk, és szekvenáltuk. A szekvenált plazmidokat transzfekciós kísérleteinkhez pALuc reporter vektorba klónoztuk megfelelő restrikciós emésztés és tisztítás után. A pALuc-16P plazmid a HPV16 P<sub>97</sub> korai promóterét (14 - 104 bp), a pALuc-16PENH plazmid pedig a szövetspecifikus enhancer régiót (7527 - 7854 bp) tartalmazza a P<sub>97</sub> fő korai promóter elé klónozva. A pC18Sp1-Luc vektor négy E2 és két Sp1 kötőhelyet, illetve a szentjánosbogár luciferáz génjét kódolja az adenovírus fő késői promótere elé klónozva. A pCMV1-16E2 plazmid az EcoRI restrikciós enzimmel emésztett pCMV1 eukarióta expressziós vektorba klónozva tartalmazza a teljes hosszúságú HPV16 E2 gént (3854 - 3873 bp).

A TGF- $\beta$ 2 promóter különböző hosszúságú darabjait magába foglaló p $\beta$ 2-528 és p $\beta$ 2-77 vektorokat pGEM4-SV0CAT plazmidba klónozva kaptuk. Restrikciós enzimmel történő hasítás után a promóter darabokat a hasonló módon kezelt pALuc reporter vektorba klónoztuk. A pALuc-B2-445, pALuc-B2-352, pALuc-B2-251, és pALuc-B2-183 plazmidok létrehozásához templátként a pALuc-B2-528 plazmidot használtuk, és a PCR-rel kapott amplimereket megfelelő restrikciós enzimekkel történt hasítás után a pALuc reporter vektorba klónoztuk. A pGL2-Prom-B2-161 plazmid létrehozásához szintén a pALuc-B2-528 plazmidot alkalmaztuk templátként, és a kapott amplimert pGL2-Promoter vektorba klónoztuk restrikciós hasítás és tisztítás után. A HPV16 E6, illetve E7 fehérjét kódoló szekvenciát PCR-es amplifikáció, restrikciós emésztés és tisztítás után pcDNA3.1+ eukarióta expressziós vektorba klónoztuk. Az E6 és E7 expressziójának vizsgálatához pAdE2luc reporter vektort, a transzfekciós kísérletekhez pcDNA-E2F-1 nevű E2F-1 expressziós plazmidot, vad típusú és mutáns E7 fehérjéket expresszáló (pMo, p16E7Mo, p24Gly, p26Gly, p31Arg, p58Gly, és p91Gly) plazmidokat használtunk.

## *Szekvenálás*

Az LCR variánsok szekvenciáját T7 Sequencing kittel ellenőriztük. A templát DNS-hez NaOH-os denaturálás, Na-acetátos és etanos kicsapás után 65°C-on a pUC19 vektorra specifikus primert hibridizáltunk. A jelölő reakció T7 polimerázzal és  $\alpha^{32}\text{S}$  dATP-vel történt. A terminációs reakció után a mintákat 6% akrilamid / 7M urea / 1xTBE denaturáló poliakrilamid gélen futtattuk. A szekvenáló gélt szárítottuk, majd röntgenfilmet helyeztünk rá. 16-24 órás, 4°C-os hőmérsékleten történő exponálás után a képet előhívtuk, és fixáltuk.

A TGF- $\beta$ 2 promóter különböző hosszúságú darabjait tartalmazó plazmidok, illetve a pcDNA-16E6 és pcDNA-16E7 plazmidok szekvenciáját ABI PRISM BigDye Cycle Sequencing kit segítségével ellenőriztük. A szekvenáló PCR-hez 0,4  $\mu\text{g}$  templát DNS-t, 0,02  $\mu\text{g}$  primert és 8  $\mu\text{l}$  TRR-mixet (Terminator Ready Reaction) használtunk. A PCR terméket Dye-Ex Spin kittel tisztítottuk, vákuum-centrifugán liofilizáltuk, és TSR-ben (Template Suppression Reagent) visszaoldottuk. 92°C-os denaturálás után a szekvenálás ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer készülékkel történt.

## *Sejtkultúrák, tranziens transzfekeció és luciferáz teszt*

A tranziens transzfekeciós kísérletekhez HeLa (ATCC CCL-2) HPV18-pozitív adenocarcinoma sejtvonalat, NIH/3T3 (ATCC CRL-1658) egér embrionális fibroblasztokat, és C-33A (ATCC HTB-31) HPV-negatív cervix carcinoma sejtvonalat használtunk. Átlagosan 70 % lefedettség elérése után a sejtekbe 2  $\mu\text{g}$  reporter vektort és 1 vagy 2  $\mu\text{g}$  expressziós plazmidot juttattunk. A transzfekeció a C-33A sejtek esetében kalcium-foszfát precipitációs módszerrel, a HeLa és a NIH/3T3 esetében Lipofectamine 2000-rel történt. Az I. közlemény kísérleteiben a HeLa sejteket Lipofectamine-nal transzfekektáltuk. A sejteket 48 órával a transzfekeció után Reporter Lysis Buffer-rel, majd 1 fagyasztás-olvasztás ciklussal lizáltuk, és luciferáz tesztben, luminométerrel mértük a sejt-extraktumok luciferáz aktivitását. A luciferáz enzim szubsztrátjaival ATP vagy koenzim-A jelenlétében oxidációs reakcióban foton-felszabadulást indukál. A reporter vektorok a szentjánobogár luciferáz fehérjéjét kifejező luc gén előtt különböző, a transzkripciót befolyásoló szekvenciát tartalmaznak. A luciferáz gén aktivitásában (azaz a fotonok mennyiségében) bekövetkező változások ezeknek a szakaszoknak a transzkripcióra kifejtett hatásáról informálnak bennünket. A luciferáz teszt standardizálásához az I. közleményben  $\beta$ -galaktozidáz tesztet használtunk. A  $\beta$ -galaktozidáz



tesztet a II. közleményben Bradford teszttel helyettesítettük, mert a HPV16 E6 proteinje a pRSV- $\beta$ Gal és a pCMV- $\beta$ Gal plazmidokra is transzaktiváló hatással volt. Minden transzfekeiós kísérletet legalább 3, független sorozatban végeztünk el. Az eredményeket átlagoltuk, és a megfelelő szórásértékekkel együtt ábrázoltuk.

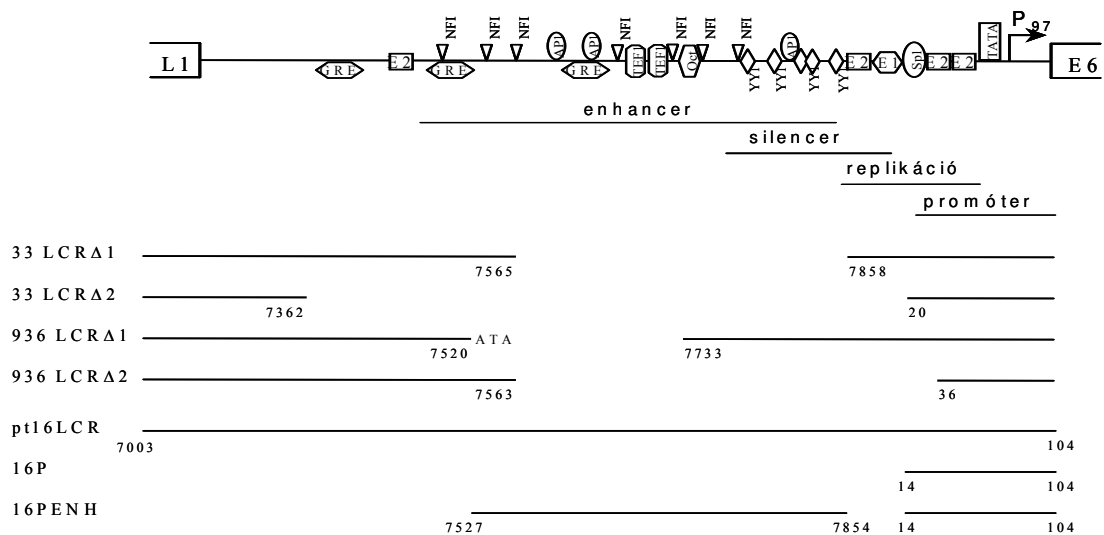
## Eredmények és következtetések

### *A HPV16 természetes deléciós variánsainak transzkripciós aktivitása*

Korábbi vizsgálataink során HPV16 variánsokat izoláltunk cervix carcinomás mintákból. Az LCR régió amplifikációja után a teljes hosszúságú szabályozó régió mellett néhány mintából (33, 936) rövidebb amplimereket is kimutattunk (33LCR $\Delta$ 1 és 33LCR $\Delta$ 2, illetve 936LCR $\Delta$ 1 és 936LCR $\Delta$ 2). A HPV16 a szekvenencia-analízis alapján a 33-as mintában az ázsiai intratípusba sorolható, míg a 936-os minta HPV16 szekvenciája az európai prototípus képét mutatja.

A 33LCR $\Delta$ 1 deléciós variánsban a 292 bp-os deléció következtében pozitív hatású elemek estek ki a silencer régió egy részével együtt. A 33LCR $\Delta$ 2-ben az 563 bp-os deléció a teljes ismert ehancert, illetve a represszor hatású YY1 (yin-yang 1) és CDP/Cut (CCAAT-displacement protein) faktorokra specifikus szekvenciákat is érintette. A 936LCR $\Delta$ 1 minta a 211 bp-os mutációt a szövet-specifikus enhancerben tartalmazta, a 936LCR $\Delta$ 2 klónban ezen kívül az YY1-dependens és a CDP/Cut-dependens silencer rész is elveszett az LCR régió 378 bázispár hosszúságú szakaszának kiesése miatt (1. ábra).

A szekvenálás során a deléciók mellett GRE, TEF-1 és NF1 kötőhelyeket érintő mutációkat is kimutattunk (a HPV16 referencia-szekvenciájához viszonyítva), ezek azonban mind a teljes, mind a rövidebb LCR-t tartalmazó variánsokban megjelentek. A 33LCR-ben az egyedi nukleotidot érintő mutációk között kiemelt fontosságú a 7729 A/C: ez a báziscsere gyakran előfordul a magasabb onkogén kockázatú ázsiai-amerikai variánsban, és egyes szerzők feltételezik, hogy - bár nem érinti egyetlen ismert transzkripciós faktor kötőhelyét sem - ez a mutáció felel az ázsiai-amerikai variáns LCR régiójának megnövekedett transzkripciós aktivitásáért.



1. ábra  
Az LCR régiót érintő mutációk helyzete, illetve az I. közleményben használt reporter vektorok sematikus ábrázolása

Transzfekeciós kísérleteinkben mások eredményeivel összhangban az ázsiai-amerikai variáns teljes hosszúságú LCR régiója nagyobb transzkripciós aktivitással rendelkezett, mint az európai variánsok (prototípus HPV16, 936LCR) LCR régiója. A 33LCRA1 és 33LCRA2 plazmidok a 33LCR-hez képest csökkent, de a HPV16 P<sub>97</sub> promóteréhez képest viszonylag magas aktivitással rendelkeztek. Ez különösen a 33LCRA2 esetében volt meglepő, hiszen ez a mutáns tartalmazta a legnagyobb deléciót: az LCR régióból csak 210 bp maradt meg 5' helyzetben, az L1 3' vége mellett.

A 33LCRA2 deléciós variánssal végzett transzfekeciós kísérletek adatai alapján feltételezhető, hogy a HPV16 LCR régió 5' vége a HPV11-hez és HPV18-hoz hasonlóan egy transzkripciós enhancer szakaszt tartalmaz. Ez az enhancer biztosíthatja az E6/E7 onkogének transzkripcióját a centrális, szövetspecifikus enhancer hiánya esetén. Ebben az LCR-részben egy 'matrix attachment' régió (MAR) található, mely a virális DNS fizikai állapotától függően pozitívan vagy negatívan befolyásolja a P<sub>97</sub> promóter transzkripciós aktivitását: episzómális forma esetén represszorként, míg integrált állapotban aktivátorként működik. Bár a mi esetünkben a transzfekeciált plazmidok episzómálisan voltak jelen, ez az 5' LCR régió mégis enhancerként funkcionált. A látszólagos ellentmondás hátterében az állhat, hogy míg mások kísérleteiben az 5' LCR mellett jelen volt a centrális enhancer is, a 33LCRA2 variánsban ez deléció következtében teljesen kiesett. Az 5' LCR szakaszban található néhány AP1 kötőhely, amelyek felelősek lehetnek a tapasztalt aktiváló hatásért. Az is lehetséges, hogy a 33LCRA2 variánsban bekövetkezett deléció az LCR nukleoszómális organizációját érinti, s csökkenti a

CDP és a HDAC1 (hiszton deacetyláz 1) represszálo hatását. Érdeemes megemlíteni, hogy a HPV16 virális replikációs origójának a CDP/Cut-dependens silencer régiójával átfedő területe két deléciós variánsból is kiesett. Elméletileg lehetséges, hogy ezek a deléciós variánsok kis kópiaszámban vannak jelen a teljes hosszúságú LCR-t tartalmazó episzómális variánsok mellett, és a daganatos sejtekbe integrálódva replikálódnak. Az is elképzelhető, hogy az LCR-en kívüli szekvenciák is funkcionálhatnak replikációs origóként az episzómális vírusgenom számára.

Az LCR régióban található 4 virális E2 kötőhelyből a 33LCR $\Delta$ 2 variánsban csak kettő található, ezért megvizsgáltuk, hogyan hat a HPV16 E2 fehérjéje a különböző deléciós variánsok transzkripció aktivitására. Az E2 protein alacsony koncentrációban transz-aktivátorként a P<sub>97</sub>-es promóteren keresztül növeli az E6 és E7 mRNS-ének mennyiségét, míg magasabb koncentrációban ugyanezekre a génekre gátló hatást fejt ki. Az E2 protein represszor hatása a korai promóterre az LCR két proximális helyzetű E2 kötőhelyén keresztül valósul meg azáltal, hogy eltávolítja a promóter mellől a pozitív hatású Sp-1 transzkripció faktort. A HPV16 E2 fehérjéjének szerepe függ a virális DNS fizikai állapotától is, mivel az integrációkor a cirkuláris vírusgenom felnyílik, és az E2 gén felhasad. Így a P<sub>97</sub> promóter felszabadul az E2 protein gátlása alól, és megindíthatja a transzformáló fehérjék termelését. Mivel a 33-as és a 936-os minta episzómálisan tartalmazta a HPV16-ot, az E2 fehérjék így biológiailag aktívak maradhattak a HPV genomban. A 33LCR és a 33LCR $\Delta$ 1 plazmidok transzkripció aktivitása kis mértékben csökkent a virális E2 hatására, míg a 33LCR $\Delta$ 2 aktivitása szignifikáns csökkenést mutatott. Ez utóbbinak az lehet a magyarázata, hogy ebből a variánsból a két disztális, a P<sub>97</sub> promóterre pozitív hatású E2-kötőhely esett ki a deléció következtében, míg a két proximális, negatívan szabályozó E2 kötőhely megmaradt.

#### *A HPV 16 E6 és E7 proteinjének hatása a TGF- $\beta$ 2 promóter transzkripció aktivitására*

Egy nemrég megjelent közleményben kimutatták, hogy a HPV16 E6 és E7 fehérjéje csökkenti a TGF- $\beta$ 2 mRNS és a biológiailag aktív fehérje szintjét primer keratinocitákban. Mivel a gátló mechanizmus részletesebb molekuláris hátterét nem vizsgálták, kotranszfekció kísérleteket végeztünk annak tanulmányozására, hogy a virális onkogének hogyan hatnak a TGF- $\beta$ 2 promóterére. Mivel a TGF- $\beta$ 2 szekréciójának csökkentésében a p53, illetve a retinoblasztoma protein által mediált folyamatoknak is lehet szerepe, ezért kísérleteinkhez 3

különböző sejtvonalat használtunk. A C-33A kultúrában nincs jelen HPV szekvencia, de a sejtek a p53-at és a retinoblasztoma proteint is mutáns formában tartalmazzák. A HeLa sejtekben a p53 és az Rb a HPV18 genom jelenléte miatt funkcionálisan inaktív. A NIH/3T3 kultúra egér eredetű embrionális fibroblaszt, és biológiailag aktív p53 és retinoblasztoma fehérjét tartalmaz.

Első kísérleteinkben a TGF- $\beta$ 2 promóter 77, illetve 528 bp méretű darabját tartalmazó plazmid (pB2-77, pB2-528) transzkripció aktivitását vizsgáltuk a virális E6 és E7 jelenlétében. A C-33A sejtekben a HPV16 E6 és E7 fehérjéje kis mértékben aktiválta a TGF- $\beta$ 2 promóterének mindkét darabját tartalmazó plazmidot. A HeLa kultúrában az E6 erős transzaktiváló hatást mutatott mind a rövidebb, mind a hosszabb promóter-darab esetében, míg az E7 fehérje csak a pB2-528 jelű plazmid transzkripció aktivitását emelte. A NIH/3T3 sejtekben a HPV16 E7 fehérjéje mérsékelten növelte a pB2-77 plazmid aktivitását, míg a pB2-528 aktivitását szignifikánsan (3-4-szeresen) gátolta. Abban az esetben, ha az E7 fehérjét kifejező expressziós plazmidot növekvő mennyiségben adtuk kísérleti rendszerünkhöz, már kis koncentráció esetén tapasztaltuk ezt a gátló hatást. Mivel az E7 csak nagyobb koncentrációban (2  $\mu$ g) növelte a pB2-77 transzkripció aktivitását, a promóter eme szakaszára kifejtett aktiváló hatása nem tűnik biológiailag szignifikánsnak.

Bár irodalmi adatok szerint a bioaktív p53-at és retinoblasztoma proteint kifejező keratinocitákban az E6 fehérje is csökkenti a TGF- $\beta$ 2 fehérje szintjét, a mi kotranszfekciós kísérletünkben az aktív p53-at tartalmazó NIH/3T3 sejtekben az E6 protein enyhén növelte a TGF- $\beta$ 2 promóter transzkripció aktivitását mind a pB2-77, mind a pB2-528 plazmid esetében. Az ellentmondás hátterében az állhat, hogy a TGF- $\beta$ 2 protein pillanatnyi szintje nemcsak promóter-szinten szabályozott, hanem más mechanizmusok által is.

Az E7 gátló hatásáért felelős TGF- $\beta$ 2 promóter-régió lokalizációjának pontosabb meghatározásához különböző hosszúságú, de azonos 3' véggel rendelkező promóter-darabokat klónoztunk a pALuc reporter vektorba, és NIH/3T3 sejtekben vizsgáltuk, hogy hogyan változik transzkripció aktivitásuk a papillomavírus E7 proteinjének hatására. Transzfekciós kísérleteink szerint az E7 gátló hatásáért felelős régió a TGF- $\beta$ 2 promóterében a transzkripció kezdőhelyétől számított -528 és -251 bp között található. Kimutattuk azt is, hogy ez a szakasz nem csak homológ, hanem heterológ (SV40) promóter elé klónozva is érzékeny az E7 represszálo hatására.

Következő kísérleteinkben mutáns E7 fehérjéket expresszálo plazmidok segítségével kívántuk meghatározni, hogy ez a gátló hatás csak a retinoblasztoma fehérje kötésétől függ,

vagy más pocket proteinek (p107, p130) által is létrejöhet. Eredményeink szerint az az E7 mutáns (p26Gly), amely nem képes kapcsolódni az Rb-hez, de a p107 és p130 proteinekhez igen, elvesztette a TGF- $\beta$ 2 promótert gátló képességét, ugyanúgy, ahogy az Rb-hez és a másik két pocket proteinhez kötödni képtelen E7 mutáns (p24Gly) is. Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy a HPV16 E7 TGF- $\beta$ 2 promótert gátló hatásához szükséges az E7 és az Rb kapcsolódása. A p31Arg, p58Gly és p91Gly mutáns megőrizte represszálo hatását (bár itt a pB2-528 aktivitás nem volt olyan alacsony, mint a vad típusú E7 esetében), tehát a kazein kináz II foszforilációs hely és a Cys-X-X-Cys motívum nem játszik döntő szerepet a gátló hatás létrejöttében.

A HPV16 E7 fehérjéje a hypofoszforilált retinoblasztoma proteinhez kapcsolódva megakadályozza annak az E2F transzkripciós faktorhoz való kötődését, a szabad E2F1 pedig számos, a sejtciklus S-fázisában közreműködő gén transzkripcióját befolyásolja. Megvizsgáltuk tehát, hogyan hat az E2F1 transzkripciós faktor a TGF- $\beta$ 2 promóterére. Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy az E2F1 az E7 proteinhez hasonlóan gátolta a TGF- $\beta$ 2 promóterének transzkripciós aktivitását. Mindezekből az eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a HPV16 E7 fehérjéje valószínűleg az E2F1 Rb/E2F komplexből történő felszabadítása révén fejt ki gátló hatását a TGF- $\beta$ 2 promóterére. Mivel a TGF- $\beta$ 2 promóterében nem található konszenzus E2F-kötőhely, az E2F1 hatása indirekt lehet.

Irodalmi adatok szerint a nagy mennyiségben expresszáladó E2F1 képes felülmúlni a TGF- $\beta$  által létrehozott G<sub>1</sub>-blokkot. Az E2F1 fokozza a ciklin E aktivitását, melynek hatására a cdk2 foszforilálja a TGF- $\beta$ 2 szignalizációs útvonalában fontos szerepet játszó Smad3 molekulát. A foszforilálódás hatására a Smad3 transzkripciós aktivitása csökken, csökken a p15 ciklin-dependens inhibitor szintje, ez pedig az S-fázis irányába tolja el sejtciklust. Ebbe az irányba mutatnak a mi eredményeink is. Ha ugyanis az Rb/E2F komplexből a papillomavírus E7 proteinje hatására felszabaduló E2F1 csökkenti a TGF- $\beta$ 2 szintjét, a Smad3-célgének átírása gátlódik, illetve emelkedik a cdk2- és cdk4-szint, mindezek hatására pedig a sejtek beléphetnek a sejtciklus S-fázisába.

## Összefoglalás

1. HPV16 LCR cervix carcinomából izolált, természetes deléciós variánsaiban a deléciók mellett GRE, TEF-1 és NF1 kötőhelyeket érintő pontmutációkat is találtunk (a HPV16 referencia-szekvenciájához viszonyítva), ezek a báziscserék azonban a teljes LCR-t tartalmazó klónokban is megjelentek. A deléciók az LCR-ben a szövetspecifikus enhancert és az YY1-, illetve a CDP/Cut-dependens silencer régiót érintették. Az ázsiai-amerikai variáns szabályozó régiójának transzkripciós aktivitása (33LCR) magasabbnak bizonyult, mint az európai variánsoké (pt16LCR, 936LCR). A deléciós variánsok transzkripciós aktivitása általában alacsonyabb volt, mint a teljes LCR-t tartalmazó variánsé. Egy deléciós variánsnál (33LCR $\Delta$ 2) viszont nem várt, viszonylag magas transzkripciós aktivitást tapasztaltunk annak ellenére, hogy a mutáció a teljes ismert enhancert, illetve a represszor hatású YY1 és CDP/Cut faktorokra specifikus szekvenciákat is érintette. Ezek alapján feltételezhető, hogy a HPV16 LCR 5' végén egy eddig nem definiált enhancer elem helyezkedik el.
2. A HPV16 E7 fehérje a NIH/3T3 egér embrionális fibroblaszt-kultúrában gátolta a TGF- $\beta$ 2 promóter transzkripciós aktivitását. A gátló hatásért felelős régió a TGF- $\beta$ 2 promóterében -528 és -251 bp között helyezkedik el.
3. A HPV16 E6 proteinje enyhén aktiválta a TGF- $\beta$ 2 promóterét. Ez a hatás független volt a p53 tumorszupresszor protein jelenlététől, illetve hiányától, és valószínűleg a TGF- $\beta$ 2 promóterében jelenlévő TATA boxon keresztül valósul meg. Az E7 gátló hatása csak a retinoblasztoma fehérjétől függ, a p107 és p130 proteintól nem, és nem befolyásolja szignifikánsan az E7 kazein kináz II foszforilációs helyének és cink-ujj struktúrájának épsége sem. Mivel az E2F1 transzkripciós faktor hasonló mértékben gátolta a TGF- $\beta$ 2 promóterét, mint az E7 onkoprotein, feltételezhető, hogy a HPV16 E7 fehérjéje az E2F1 Rb/E2F komplexből történő felszabadítása révén fejt ki gátló hatását.

## Közlemények

### *Az értekezésben felhasznált közlemények*

- I.** G. Veress, **M. Murvai**, K. Szarka, A. Juhász, J. Kónya, L. Gergely  
Transcriptional activity of human papillomavirus type 16 variants having deletions in the long control region  
*Eur. J. Cancer.*, **37**: 1946-1952 (2001) IF: 3,694
- II.** **M. Murvai**, A. A. Borbély, J. Kónya, L. Gergely, and G. Veress  
Effect of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes on the activity of the transforming growth factor- $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2) promoter  
*Arch. Virol.*, **149**: 2379-2392 (2004) IF: 1,876

### *Egyéb közlemények*

G. Szládek, A. Juhász, L. Asztalos, K. Szőke, **M. Murvai**, K. Szarka, G. Veress, L. Gergely, J. Kónya  
Persisting TT virus (TTV) genogroup 1 variants in renal transplant recipients.  
*Arch. Virol.*, **148**: 841-51. (2003) IF: 1,876



### **Fontosabb előadások, poszterek**

Veress G., Szarka K., **Murvai M.**, Kónya J., Gergely L.: Humán papillomavírus 16 deléció variánsok transzkripció aktivitásának vizsgálata

First Joint Meeting of the Slovenian Society for Microbiology and the Hungarian Society for Microbiology, 2000. augusztus 24-26., Keszthely

**Murvai M.**, Veress Gy., Borbély Á., Gergely L.: A humán papillomavírus 16 (HPV16) E6 és E7 onkogénjeinek hatása a transzformáló növekedési faktor- $\beta$ 2 (transforming growth factor- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 2) promóterének aktivitására

Magyar Mikrobiológiai Társaság Jubileumi Nagygyűlése, 2001. október 10-12., Balatonfüred

**M. Murvai**, Á. A. Borbély, K. Szarka, L. Gergely, G. Veress: Effect of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes on the activity of the transforming growth factor- $\beta$ 2 promoter

20th International Papillomavirus Conference, October 4-9. 2002., Paris, Franciaország

**Murvai M.**, Borbély Á. A., Gergely L., Veress Gy.: A humán papillomavírus (HPV), a cervix carcinoma és az E-cadherin polimorfizmus kapcsolata

A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium, 2004. október 7-9., Keszthely