

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A HUMÁN PAPILLOMAVÍRUS ÉS A CELLULÁRIS
SURVIVIN GÉN KAPCSOLATÁNAK VIZSGÁLATA**

Borbély Ágnes Anikó

Témavezető: Dr. Veress György

Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Orvosi Mikrobiológiai Intézet

2006

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
BEVEZETÉS	4
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
1. A humán papillomavírus szerkezete, genomi felépítése, fehérjék funkciói.....	5
2. A humán papillomavírusok osztályozása és patogenitása	9
3. A humán survivin fehérje.....	11
4. A HPV 16 onkoproteinek és a survivin kapcsolata	13
CÉLKITŰZÉSEK	15
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	16
Plazmidok.....	16
Sejtkultúrák	16
Tranziens transzfekció és luciferáz teszt.....	17
Sejtciklus-szinkronizálás.....	17
Áramlási citometria (FACS)	18
Reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakció (RT-PCR)	18
Northern blot hibridizáció	19
Vizsgálati csoportok, klinikai minták	19
DNS izolálás.....	20
Humán papillomavírus (HPV) kimutatása és tipizálása	20
PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)	21
PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism)	21
Szekvenálás	22
Statisztikai módszer.....	22
EREDMÉNYEK	23
I. A humán papillomavírus 16 onkoproteinjeinek hatása a survivin gén expressziójára (I. közlemény).....	23
A HPV 16 E6 gátolja a survivin promótert.....	23
Az E6 survivin promóterre kifejtett transzaktiváló hatása p53 függő	25
A HPV 16 onkogének gátolják az endogén survivin transzkripcióját.....	26
A HPV onkogének survivinre gyakorolt hatása független a sejtciklustól	27
II. Survivin promóter polimorfizmus és a méhnyak karcinogenezise (II. közlemény)	30
Survivin promóter CDE/CHR szakaszát érintő polimorfizmus megoszlása a vizsgálati csoportokban	30
MEGBESZÉLÉS.....	33
I. A humán papillomavírus 16 onkoproteinjeinek hatása a survivin gén expressziójára (I. közlemény).....	33
II. Survivin promóter polimorfizmus és a méhnyak karcinogenezise (II. közlemény)	35
ÖSSZEFOGLALÁS	37
SUMMARY	38
TÁRGYSZAVAK.....	39
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	40
IRODALOMJEGYZÉK	41
Az értekezésben felhasznált közlemények.....	47
Egyéb közlemények.....	47
Fontosabb előadások, posztterek.....	47
FÜGGELÉK	49

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

HPV	humán papillomavírus
IAP	apoptózis gátló (inhibitor of apoptosis)
bp	bázispár
kb	kilobázis
LCR	a HPV szabályozó régiója (long control region)
ORF	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
ATP	adenozin-trifoszfát
Sp1	sejt eredetű transzkripció faktor
EGF-R	epidermális növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor)
PDGF-R	vérlemezké eredetű növekedési faktor receptor (platelet derived growth factor receptor)
CSF1-R	kolónia stimuláló faktor 1 receptor (colony stimulating factor 1 receptor)
TGF- β 1	transzformáló növekedési faktor- β 1 (transforming growth factor- β 1)
LTR	hosszú ismétlődő végszekvenciák (long terminal repeat)
E6AP	E6 asszociált protein
CBP	CREB binding protein
CDK	ciklin-dependens kináz
CDI	ciklin-dependens kináz inhibitor
Rb	retinoblasztóma
NF1	transzkripció szabályozó faktor (nuclear factor 1)
AP-1	transzkripció szabályozó faktor (activator protein-1)
TEF-1	transzkripció szabályozó faktor (transcriptional enhancer factor-1)
GRE	glükokortikoid receptort kötő elem (glucocorticoid responsing element)
YY1	transzkripció szabályozó faktor (yin-yang 1)
EV	epidermodysplasia verruciformis
Bcl-2	apoptózis szabályozó (B-cell leukemia, B-sejtes leukémia)
BIR	baculovírus IAP repeat
CDE	sejtciklus függő elemcell (cycle-dependent element)
CHR	sejtciklus homológ régió (cell cycle homology region)
G	guanin
C	citozin
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat (phosphate-buffer saline)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz
PCR	polimeráz láncreakció (polimerase chain reaction)
RFLP	restriction fragment length polymorphism
SSCP	single strand conformation polymorphism
TBE	Tris Borát EDTA puffer
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etán-szulfonsav

BEVEZETÉS

A cervix carcinoma (méhnyakrák) a nők egyik leggyakoribb rosszindulatú daganatos megbetegedése világszerte. Számos onkogén vagy más néven magas kockázatú csoportba tartozó humán papillomavírusról (HPV) – 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 70 (Burd, 2003) – bebizonyosodott, hogy fontos etiológiai szerepe van a méhnyakrák kialakulásában. A betegekből vett tumoros szövetmintáknak több mint 90 %-ában tudták kimutatni a HPV különböző típusát, az esetek felében a HPV 16 vírusgenomot detektálták.

A vírusfertőzés önmagában nem tekinthető a betegség kiváltó okának, a fertőzések nagy része ugyanis tünetmentesen zajlik le, és csak egy kisebb hányadában jön létre rák megelőző állapot, illetve invazív carcinoma. A méhnyakrák kialakulásában a vírus jellemzői mellett számos egyéb tényező – a gazdaszervezet genetikai és immunológiai háttere, celluláris folyamatok, különböző kofaktorok, így a szexuális szokások, hormonális hatások, dohányzás, táplálkozás, más patogénnel történt koinfekció – is szerepet játszhat.

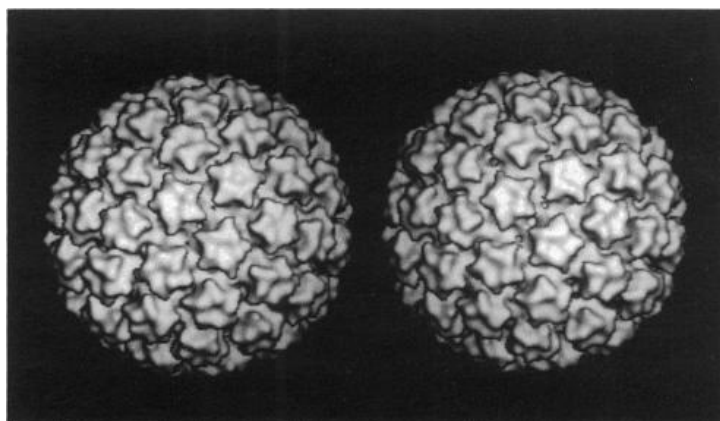
Celluláris tényező lehet egy nem régóta ismert fehérje a survivin, amely az apoptózis inhibitor (IAP) család egyik új tagja. Funkciója kettős – az apoptózis gátlása mellett a sejtciklus és a sejtosztódás szabályozásában is részt vesz. A survivin gén terméke terminálisan differenciálódott felnőtt szövetekben nem detektálható, de nagy mennyiségben fejeződik ki a fejlődés során az osztódó, embrionális szövetekben. Expressziója fokozott a legkülönbözőbb daganatban, így a méhnyakrákban is, különösen annak előrehaladottabb stádiumaiban. Szerepe a tumorok kialakulásában valószínű, azon mechanizmus azonban, amely a survivin expresszió szabályozásának sérüléséhez vezet, még kevésbé tisztázott.

Mivel a HPV szaporodásához szükséges, hogy a fertőzött gazdasejt osztódása fennmaradjon, ezért a vírus beavatkozik a sejtfolyamatokba, stimulálja a sejtproliferációt, az apoptózis ellen hat, mely folyamatok mutációk felhalmozódásához és rosszindulatú daganat kialakulásához vezethetnek. A karcinogenezis molekuláris eseményeiben feltételezhető a survivin fokozott átíródásának szerepe, amelyre a vírus is befolyással lehet. Egy nemrég megjelent tanulmányban (Nees et al., 2000) cDNS microarray kísérletekkel kimutatták, hogy primer keratinocitákban a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinje képes többek között a survivin átíródását is fokozni. Mindezek alapján a méhnyakrák kialakulásában a humán papillomavírus és a survivin szerepének vizsgálata érdekes kutatási témát ad.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. A humán papillomavírus szerkezete, genomi felépítése, fehérjék funkciói

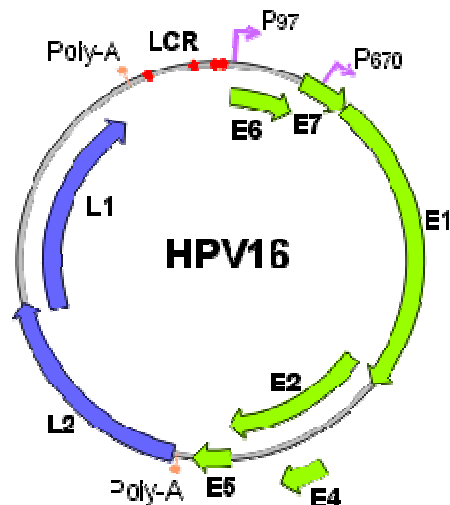
A papillomavírusok a Papillomaviridae családba tartozó kis méretű vírusok. A virionok ~ 55 nm átmérőjű, ikozahedrális szimmetriájú, burok nélküli partikulumok (1. ábra). 72 kapszomerből álló kapszidjuk duplaszálú, cirkuláris DNS-t vesz körül, amelyhez hisztonok kötődnek. A kettős szálnak csak az egyike tartalmaz fehérjét kódoló szekvenciákat (Howley, 1996; zur Hausen H., 1996).



1. ábra

A papillomavírus virion elektronmikroszkópos képe (Baker et al., 1991)

A hozzávetőleg 8000 bázispár (bp) hosszúságú vírusgenom három nagy részre tagolható, a mindegy 4 kilobázis (kb) nagyságú, a vírus életsiklusának korai szakaszában megjelenő – a DNS replikációban és celluláris transzformációban szerepet játszó – fehérjéket kódoló korai (early, E) régióra, egy megközelítőleg 3 kilobázisnyi, struktúrfehérjéket kódoló késői (late, L) régióra, és egy 500-1000 bázispár hosszúságú, fehérjéket nem kódoló, szabályozó szakaszra (long control region, LCR). A korai és késői régiókon belül úgynevezett nyitott olvasási keretek (open reading frame, ORF) találhatók, amelyek fehérjéket kódoló génszakaszok (zur Hausen H., 1996). Ezek átfedhetnek egymással, ilyenkor alternatív promóterek és az mRNS alternatív szerkesztődése (splicing) révén íródnak át. Az ORF-ekből nyolc (E1-E8) vagy kevesebb található a korai, és kettő (L1, L2) a késői régióban (Shah, 1996; Turek, 1994).



2. ábra

A HPV 16 genomjának szerveződése (<http://www.au.poznan.pl/~mschmidt/HPV16-htm>)

A HPV 16 genomjának szerveződése a 2. ábra látható. A vírus egyik legkonzervatívabb ORF-e az E1, a vírus DNS-ének replikációjában szerepet játszó, körülbelül 600-650 aminosavból álló, ATP-dependens helikáz aktivitású fehérjét kódol. A vírus replikációs origójához kapcsolódik, így nélkülözhetetlen a vírus DNS replikációjában. A celluláris DNS-polimeráz α -primáz kötésével a vírus DNS replikációjához szükséges celluláris faktorokat is biztosítja (Dell and Gaston, 2001; Park et al., 1994; zur Hausen H., 1996).

Az E2 fehérje egy C-terminális DNS kötő és egy N-terminális transzaktivátor doménből, valamint a kettőt összekötő kapocs régióból épül fel (Giri and Yaniv, 1988). Az LCR régióban több – általában négy – E2 kötő palindrom szekvencia található. Az E2 virális transzkripció faktor, amely attól függően, hogy a szabályozó régió belül mely helyekre kötődik be, képes aktiválni vagy represszálni a vírus korai P₉₇ promóterét. Az E2 represszor hatása a P₉₇ promóterre két proximális helyzetű E2 kötőhelyen keresztül valósul meg, amelyek a TATA szekvencia és egy Sp1 kötő hely közelében találhatók. Nagy mennyiségben az E2 képes leszorítani ezen helyekről a transzkripció faktorokat, ezáltal gátolva az átíródást (Tan et al., 1994). Az E2 további feladataként elősegítve az E1 kötődését a replikációs origóhoz, részt vesz a replikáció iniciálásában (Sakai et al., 1996).

Az E4 fehérjét kódoló ORF ugyan a korai régió belül található, de maga a fehérje a vírus életciklusának csak késői szakaszában expresszálódik. Elsősorban a fertőzött epitélium differenciálódott rétegeiben található. Sejten belül a citokeratin hálózathoz kapcsolódik, és annak összeomlását idézi elő, lehetővé téve a virionok sejtből való kiszabadulását. Ezáltal az

E4 szerepet játszik a vírus produktív infekciójában (Doorbar et al., 1991; Pfister and Fuchs, 1994).

A HPV 16-nak három transzformáló hatású onkoproteinje van, amelyek közül a legkisebb a Golgi készülékben és a sejtmembránban elhelyezkedő E5 fehérje. Az E5 képes kötődni a növekedési faktorok receptoraihoz (EGF-R, PDGF-R, CSF1-R), így azokat szubsztrátjuk nélkül is aktiválhatja. Szerepe valószínűleg a vírusfertőzés korai szakaszában lehet. HPV pozitív rosszindulatú daganatokban a fehérje nem fejeződik ki, közre játszhat azonban a jóindulatú elváltozások kialakításában (Turek, 1994; zur Hausen H., 1996).

A HPV 16 két fő transzformáló proteinje, az E6 és E7 hatékonyan vesz részt a fertőzött sejtek immortalizációjában és transzformálásában (Munger et al., 1989; zur Hausen and de Villiers, 1994). Mivel a vírus DNS replikációja az epitélium differenciált sejtrétegeiben zajlik, ahol a sejtciklus már leállt, valamint függ a gazdasejt celluláris faktoraitól (pl. DNS-polimeráz α) is, ezért a vírus arra készíti gazdasejtjeit, hogy azok újra belépjenek a sejtciklusba.

Az E6 gén terméke egy kb. 150 aminosavból álló, 18 kilodalton (kDa) molekulatömegű többfunkciós fehérje. Az E6 a sejtekben rendkívül kis mennyiségben van jelen, ezért in vivo analízise meglehetősen nehéz. A fehérje négy Cys-X-X-Cys motívumot tartalmaz, amelyek két Zn-ujj domén kialakításában vesznek részt. Ezen doméneknek szerepe van az E6 számos funkciójának kialakításában – DNS-kötés, transzaktiváló hatás, transzformálás és immortalizálás, celluláris fehérjék kötése. Transzkripciós aktiváló vagy represszáló funkciója számos celluláris (c-fos, c-myc, TGF- β 1) és virális (adenovírus E2 promóter, SV40 korai promóter, HIV LTR, herpes simplex vírus timidin-kináz gén, Moloney egér leukémia vírus LTR, citomegalovírus nagyon korai promótere) promóteren érvényesül (Rapp and Chen, 1998). Az E6 fehérje az E6AP-n (E6 asszociált protein) keresztül indukálja a celluláris p53 tumorsuppresszor fehérje ubiquitin-függő lebontását (Thomas et al., 1999b), illetve képes megakadályozni annak kötődését célgénjeihez, valamint a CBP/p300 koaktivátor proteinhez, amely a p53-dependens transzkripció gátlásához vezet. Számos káros környezeti hatás, például ionizáló sugárzás, mutagén anyagok, vírus fertőzés következményeként fellépő DNS károsodás esetén a p53 hatására megemelkedik a p21WAF1 ciklin-dependens kináz (CDK) inhibitor (CDI) szintje, ami gátolja a ciklin/ciklin-dependens kináz komplex aktivitását. Emiatt nem következik be a retinoblasztóma (Rb), és az Rb család két másik tagjának, a p107 és p130 fehérjéknek a foszforilálása. Hipofoszforilált állapotban ezek a fehérjék megkötik az E2F transzkripciós faktorokat, amelyek így nem lesznek képesek aktiválni azon géneket, amelyek szerepet játszanak a sejtciklus G1-S fázis átmenetében (May

and May, 1999). Ily módon a p53 leállítja a sejtciklust, időt hagyva a sejtekben a DNS repair mechanizmusoknak az esetleges DNS sérülések kijavítására, vagy ha a hiba olyan mértékű, hogy azt már nem lehet korrigálni, a sejteket az apoptózis irányába tereli. Mivel az E6 képes kötni és előidézni a p53 degradációját, az apoptózis gátlását is indukálhatja. Az E6-nak az apoptózisban betöltött szerepe még nem teljesen ismert, bizonyos sejtekben indukálja, míg másokban gátolja azt, azonban a pro-apoptotikus fehérjék (p53, Bax, Bak) kötése és gátlása valószínűleg szerepet játszhat anti-apoptotikus hatásában (Finzer et al., 2002; Thomas and Banks, 1999). A fehérjének telomeráz aktivitást befolyásoló hatását is említi az irodalom (Klingelhutz et al., 1996; Stoppler et al., 1997), ennek részletei azonban még szintén nem tisztázottak.

A humán papillomavírusok E7 fehérjéje egy 98 aminosavból felépülő nukleáris foszfoprotein. A fehérje C-terminálisán tartalmaz egy cink-kötő régiót, amelynek szerepe van a dimer és multimer képzésben. N-terminális szakaszán helyezkedik el egy konzervatív LXCXE motívum, amely nélkülözhetetlen ahhoz, hogy az úgynevezett „pocket” proteinekhez (Rb, p107, p130) kapcsolódjon (Barbosa et al., 1989; Dell and Gaston, 2001), továbbá itt található még a kazein-kináz II foszforilációs hely is (Barbosa et al., 1990). Az E7 szerepe a fertőzött sejtekben, hogy megzavarja a differenciálódás folyamatát és DNS szintézist indukáljon, megfelelő környezetet teremtve a vírus replikációjához. Az E7 fehérje képes hozzákapcsolódni a celluláris tumorsuppresszor retinoblasztóma protein hipofoszforilált formájához. Az Rb egy kulcsfontosságú fehérje, amelynek hatásában jelentős szerepe van a konzervatív „pocket” doménjának, ide kötődhetnek ugyanis az LXCXE motívummal rendelkező celluláris és virális fehérjék. Az Rb aktív hipofoszforilált formája a sejt G0, G1 fázisában köti az E2F transzkripció faktorokat, ezáltal gátolva az E2F-dependens gének átíródását. Ha a sejt osztódni kezd, elmozdul a S fázisba, a Rb fehérje hiperfoszforilálódik, kötésükből felszabadulnak az E2F transzkripció faktorok, és lehetővé válik számos az S fázisban szükséges gén transzkripciója. Mivel az E7 képes a hipofoszforilált Rb-hez kapcsolódni, meggátolja az E2F faktorok kötődését, így azok szabadon maradnak, és folyamatosan aktiválják a szabályozásuk alá eső géneket, ezáltal a sejtekben folyamatos lesz a proliferáció, hiszen újra és újra belépnek a sejtciklus S fázisába (Munger et al., 2001). A magas kockázati csoportba tarozó HPV-k E7 proteinjei mellett, hogy kötődnek az Rb-hez, képesek annak ubiquitin-függő degradációját is előidézni, amely szintén szerepet játszik a fehérje onkogén aktivitásában. Az E7 a retinoblasztóma útvonalba más módon is beavatkozik, képes ugyanis közvetlenül gátolni azokat a p21^{WAF1} és p16^{INK4} ciklin-dependens kináz inhibitorokat, amelyek az Rb hiperfoszforilálásában résztvevő CDK-kat gátolják (Dell

and Gaston, 2001). Szerepe van továbbá az abnormális centroszóma-duplikáció előidézésében, amely genom instabilitáshoz vezethet (Duensing et al., 2000; Duensing et al., 2001), bizonyos sejtekben pedig részt vesz az apoptózis indukálásában.

A késői régió két ORF-e a produktív vírus fertőzés során expresszálódik. Az L1 az 55 kDa molekulásúlyú fő kapszidfehérje kódoló, igen konzervatív génszakasz. Az L2, amely a járulékos kapszidfehérjét kódolja, kevésbé konzervatív régió (Pfister and Fuchs, 1994; Pfister and Fuchs, 1994; Zhou et al., 1991).

A vírusgenom szabályozó régiója, az LCR a korai és késői génszakaszok között helyezkedik el. Nem tartalmaz ORF-eket, ezért nem kódoló régióknak is nevezik. Itt található a vírus replikációs origója, egyes gének promótere, illetve számos transzkripció enhancer régió (Desaintes and Demeret, 1996).

A vírus replikációs origójához kötődik az E1 fehérje, amely helikáz aktivitása révén képes a DNS szakasz széttekercsére, ami a vírusgenom replikációjának elindításához szükséges. Az E2 kapcsolódása a replikációs origóban lévő kötőhelyéhez fokozza az E1 fehérjék affinitását az E1 felismerési szekvenciákhoz. A vírusnek DNS-e szintéziséhez celluláris faktorokra is szükség van, amelyek szintén e területhez kapcsolódnak.

Az LCR 3' végén található a HPV 16 korai P₉₇ promótere. Ez a promóter irányítja az E6 és E7 vírusfehérjék átíródását (Doorbar et al., 1990).

A HPV 16 LCR-e számos transzkripció faktor felismerési szekvenciát tartalmaz. Ezen faktorok egy része pozitív (NF-1, AP1, TEF-1, GRE, Oct-1, Sp1), míg mások negatív vagy kettős (YY1) hatásúak a transzkripcióra (O'Connor et al., 1996; Shi et al., 1997). Az LCR központi része egy szövetspecifikus enhancer régió, amely csak epitél sejtekben, a vírus természetes gazdasejtjeiben aktív.

2. A humán papillomavírusok osztályozása és patogenitása

A papillomavírusok osztályozása gazdafajuk és a vírusgenom homológiája alapján történik. A legtöbb papillomavírus típust magasabbrendű gerincesekből, főleg emlősökből írták le, de madarakban és alacsonyabbrendű gerincesekben is előfordulnak. A vírusok erősen gazdaspecifikusak.

Egy humán papillomavírus akkor számít új típusnak, ha az E6, E7 és az L1 ORF-ek DNS szekvenciáiban 90 %-nál kisebb a hasonlóság a már ismert HPV típusokhoz képest

(Howley, 1996). Ha a vizsgált régiók bázissorrendjében kevesebb, mint 2 % az eltérés, akkor intratípusos variánsokról beszélünk (Yamada et al., 1997).

DNS szekvencia adatok alapján jelenleg több mint 200 humán papillomavírus típus ismert, amelyek között 85 jól karakterizált és 120 potenciálisan új genotípus található (Burd, 2003). Ezek egy része jóindulatú (benignus) elváltozásokat okoz, míg mások rosszindulatú (malignus) daganatokban találhatók meg. Tropizmusuk alapján a humán papillomavírusokat külön csoportokba sorolják. Az egyik csoportot a kután típusok alkotják. A csoport tagjai a bőr hámrétegeiben képesek szaporodni, általában benignus sejtburjánzást okoznak. A HPV 2, 4 és 7 típusok a közönséges szemölcs (verruca vulgaris) kialakulásához vezetnek, mások (HPV 1, 3, 6 stb.) ritkább szemölcsfajták képződését eredményezik. A szemölcsök egy része, valószínűleg a celluláris immunválasznak köszönhetően pár éven belül eltűnik (Leman and Benton, 2000). Az EV típusok – pl. a HPV 5 és HPV 8 – az epidermodysplasia verruciformis (EV) nevű betegségben szenvedők bőrén okoznak szemölcsszerű elváltozásokat, amelyek különösen a napfénynek kitett helyeken malignizálódhatnak. A harmadik csoportba a genitális-mukozális típusok, vagyis a nyálkahártyát fertőző HPV típusok tartoznak. Az anogenitális régió nyálkahártyáján kívül a felső légutak sejtjeiben is megjelenhetnek. Az úgynevezett alacsony kockázatú (low risk) típusok, mint amilyen a HPV 6 és HPV 11 a jóindulatú elváltozásokban – condyloma acuminatum, gégepapilloma – gyakoribbak, míg a magas kockázatú (high risk) típusokat (HPV 16, 18, 31, 33 stb.) többnyire az alsó genitális traktus rosszindulatú daganataiból, elsősorban a méhnyakrákból és annak rákmegelőző állapotaiból izolálták (Schneider, 1994).

A humán papillomavírusok életciklusa szorosan összefügg a hámsejtek differenciálódási folyamataival. A vírus a bőr és a nyálkahártya bazális keratinocitáit fertőzi – ezekben a sejtekben kimutathatók a vírus korai fehérjéi, – szaporodni azonban csak a differenciálódott hámsejtekben képes. Itt zajlik le a vírusgenom replikációja, a késői gének átíródása és a virionok összeszerelődése (Howley, 1996).

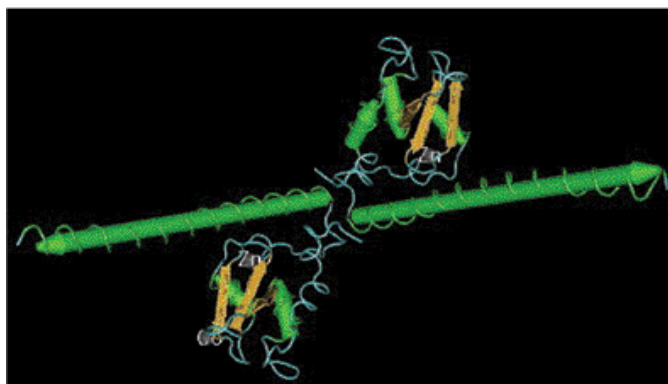
A vírus több évig, évtizedig perzisztálhat tünetmentesen a méhnyak nyálkahártyájában, vagyis a fertőzés és a daganat megjelenése között hosszú idő telhet el. Az invazív cervix carcinoma különböző rákmegelőző állapotokon keresztül alakul ki. A méhnyak atípusos laphámsejtes elváltozásait (atypical squamous cell, ASC) a 2001-es Bethesda Rendszer szerint tovább csoportosítják ASC-US (ASC undetermined significance) és ASC-H (ASC nem zárható ki HSIL – high grade squamous intraepithelial lesion) csoportokra (Solomon et al., 2002). A betegségnek egyik stádiumát az alacsony fokú SIL (LSIL, low grade SIL, squamous intraepithelial lesion, laphámsejtes intraepitheliális lézió)

megnevezéssel jellemzik, amelyre tranziens HPV fertőzés, enyhe diszplázia jellemző – ez a korábbi CIN1 (cervicalis intraepithelial neoplasia) kategóriának felel meg. Következő szakasz a magas fokú SIL (HSIL), amely a mérsékelt és súlyos diszpláziával, a perzisztens vírusfertőzéssel és a progresszió nagyobb esélyével karakterizálható – a korábbi CIN2 és CIN3 besorolással egyezik. A low grade SIL és a high grade SIL egymástól függetlenül is kialakulhatnak. A invazív rákot megelőző állapotok mindegyike visszatérhet egy korábbi állapotba – ezt nevezik regresszióknak, ennek valószínűsége fordítottan arányos a diszplázia mértékével.

A genitális humán papillomavírus fertőzések leginkább szexuális kontaktus révén terjednek, erre utal, hogy a szexuális élet kezdetén megnő a HPV fertőzöttség aránya, ami a szexuális partnerek számának növekedésével szintén emelkedik (Deacon et al., 2000). A vírus vertikálisan, anyáról gyermekére is átadódhat (Cason et al., 1995). A vírus részéről a méhnyakrák kimenetele szempontjából fontos a vírusgenom fizikai állapota, vagyis az, hogy a vírus DNS-e episzómálisan, vagy a gazdaszervezet genomjába integrálódva található meg. Az előbbi eset a benignus elváltozásokban és a rákmegelőző állapotokban jellemzőbb, míg az integrálódott alak a malignus léziókban. A HPV fertőzés és a betegség kialakulása közti hosszú időszak miatt feltételezhető, hogy a vírus jelenléte, típusa és jellemzői mellett számos egyéb tényező is szerepet játszik a tumor létrejöttében. Ilyenek a gazdaszervezet genetikai és immunológiai sajátosságai, illetve egyéb kofaktorok (hormonális hatások, dohányzás, táplálkozás, szexuális szokások) (Schneider, 1994).

3. A humán survivin fehérje

Az élő szervezetben a sejtosztódás és az apoptózis közti egészséges egyensúly fenntartása és kontrolálása rendkívül fontos a normális fejlődés szempontjából. Az apoptózis szabályozásában résztvevő fehérjék, a Bcl-2 és az apoptózis inhibitor (IAP) fehérjecsalád tagjainak nem megfelelő expressziója a sejtek kóros működéséhez és kontrolálatlan sejtosztódáshoz vezethetnek.



3. ábra

A survivin dimer röntgenkristallográfiás képe alapján készült szerkezeti modell

(http://www.assaydesigns.com/products/survivin_introduction.htm)

A survivin (Baculoviral IAP repeat-containing protein 5) az IAP fehérje család egyik új tagja. A 16,5 kDa nagyságú, 142 aminosavból álló intracelluláris fehérjét egy 14,7 kb méretű, a 17 kromoszómán található, 4 exont és 3 intront tartalmazó gén kódolja. Az apoptotikus útvonalak két fő típusa közül, az intrinsic (mitokondriális) és extrinsic (receptor-függő) útvonal közül az IAP család tagjai a receptor-függő út terminális effektorainak működését befolyásolják. A survivin, mint a legkisebb humán IAP protein, a család többi tagjával ellentétben a többnyire három helyett csak egy BIR-t (baculovírus IAP repeat) tartalmaz az N-terminális régióban, és nem rendelkezik a cink-kötő ún. RING finger doménnel – feltételezések szerint ezen motívumok vesznek részt a terminális effektor kaszpáz-3 és kaszpáz-7 direkt inaktiválásában, (Deveraux et al., 1997). C-terminális α -hélix kiterjedt és a fehérje felépítése dimer (3. ábra) (Ambrosini et al., 1997; LaCasse et al., 1998). A survivin gén terméke nagy mennyiségben expresszálódik az osztódó, embrionális szövetekben, de néhány kivételtől eltekintve – a thymus (Ambrosini et al., 1997), vastagbél hámszövet bazális rétegei (Gianani et al., 2001; Zhang et al., 2001) és a CD34+ csontvelő eredetű őssejtek (Carter et al., 2001; Fukuda and Pelus, 2001) – nem detektálható a terminálisan differenciálódott felnőtt szövetekben, nagy mennyiségben lehet azonban kimutatni a humán daganatok többségében (Altieri, 2001; Lee et al., 2005; Pizem et al., 2004).

A fehérje funkciója kettős, az apoptózis gátlása mellett a sejtciklus és a sejtosztódás szabályozásában is részt vesz. Tamm és munkatársai (Tamm et al., 1998) szerint a survivin közvetlenül kapcsolódik az effektor kaszpáz-3 és kaszpáz-7 fehérjékhez, azonban röntgenkristallográfiás elemzéssel nem tudtak olyan speciális helyet kimutatni a survivinen belül, amely más IAP-k esetén a kaszpáz kötését közvetíti (Verdecia et al., 2000). Egy

tanulmányban nemrégiben közzétették (Song et al., 2003), hogy a survivin képes kapcsolódni a Smac/DIABLO mitokondriális fehérjekomplexhez, megakadályozva, hogy az megkösse és hatástalanítsa az endogén IAP-kat például a XIAP-t, így ezek szabadon maradnak és blokkolhatják a kaspázokat.

A survivin a sejtekben legnagyobb mennyiségben a sejtciklus G2/M fázisában van jelen, ekkor lokalizációja a mitotikus apparátushoz, a mitotikus orsók mikrotubulusaihoz és a centroszómákhoz köthető (Fortugno et al., 2002). Szerepe a sejtosztódás korai szakaszában jelentős. G1 fázisban szintje gyorsan lecsökken (Li et al., 1998). Sejtciklus függő expressziója nagyrészt transzkripciós szinten szabályozott, és a promóter proximális szakaszán található sejtciklus homológ régió (CHR, cell cycle homology region) és sejtciklus-függő elemek (CDE, cell cycle dependent element) mediálják (Altieri et al., 1999). A CDE és CHR jelenléte G2/M fázisban expresszált gének jellemzője (Zwicker et al., 1995). Az interfázisban a survivin alacsony szintjét az ubiquitin-függő lebontás biztosítja (Zhao et al., 2000). A survivin expressziójának szabályozásában a celluláris tumorsuppresszor p53 fehérje is részt vesz, alacsony szinten tartva azt (Hoffman et al., 2002; Mirza et al., 2002).

A survivin promóterére jellemző a TATA-box hiánya és GC gazdag régió, amely számos lehetséges Sp1 kötő helyet tartalmaz. Itt található még három a már említett CDE-ből és egy CHR is (Li and Altieri, 1999). Xu és munkatársai (Ambrosini et al., 1997; Xu et al., 2004) a survivin promóterében számos egyedi nukleotidod érintő polimorfizmust (SNP, single nucleotide polymorphism) találtak, amelyek egyike (G/C polimorfizmus) a CDE/CHR represszor elemet érinti (az ATG start kodonhoz viszonyítva a -31 nukleotid pozícióban). A polimorfizmus megléte tumoros sejtvonalakban a survivin mRNS és fehérje mennyiségében is magasabb szintet eredményez, és módosítja a gén sejtciklus függő transzkripcióját, amely a CDE/CHR represszor elem és a hozzájuk kötődő faktorok kölcsönhatásbeli változásának következménye lehet.

4. A HPV 16 onkoproteinek és a survivin kapcsolata

A magas kockázati csoportba tarozó humán papillomavírusokra, így a HPV 16-ra is jellemző, hogy a bőr és a nyálkahártya még osztódó, bazális keratinocitáit fertőzik, de szaporodni csak a differenciált epitéliumban képesek, ahol azonban a sejtciklus már leállt, nincs DNS szintézis. A vírusnak ahhoz, hogy saját genetikai állományát létrehozhassa, szüksége van celluláris komponensekre, ezért beavatkozik a gazdasejt biokémiai

folymataiba, újbóli osztódásra készíti és gátolja a programozott sejthalált. A vírus onkoproteinjei számos ponton képesek befolyásolni a gazdasejt működését. Legszéleskörűbben tanulmányozott ezek közül az E6 p53-t, és az E7 Rb-t inaktiváló hatása, ezen túl azonban számos gén transzkripciójának, illetve az apoptózis folyamatainak módosításában is részt vesznek.

A survivin a tumorokban – így a méhnyakrákban is – a normális szövetektől eltérően újra expresszálódik és az apoptotikus folyamatok ellen hat, elősegítve a folyamatos sejtosztódást. A fehérje expresszióját a p53 celluláris tumorszuppresszor negatívan befolyásolja (Hoffman et al., 2002; Mirza et al., 2002). Mivel a HPV 16 E6 fehérje képes a p53 degradációjára, így elképzelhető, hogy valamilyen módon részt vesz a survivin gén transzkripciójában is. A survivin génre más virális (Punga and Akusjarvi, 2003) és celluláris fehérjék (Sommer et al., 2003) is hatással vannak, így nem lehetetlen, hogy a HPV onkoproteinjei is befolyásolják annak átíródását.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink során az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

- I. A HPV 16 E6 és E7 onkogénjének van-e valamilyen hatása a humán survivin gén expressziójára?

Ha igen, akkor ez a hatása függ-e valamilyen celluláris fehérje jelenlététől, és függ-e a sejtciklustól?

A HPV 16 onkogénjei befolyásolják-e az endogén survivin szintet, hatásuk érvényesül-e mRNS szinten?

- II. A survivin promóter CDE/CHR represszor kötő helyét (az ATG start kodontól számított –31 nukleotid) érintő polimorfizmus milyen arányban fordul elő méhnyakrákos betegekben, Papanicolaou osztályozás szerinti P3-as diagnózissal rendelkező páciensekben és a kontroll populációban?

Van-e valamilyen szerepe az említett survivin promóter polimorfizmusnak a HPV asszociált méhnyakrák kialakulásában?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Plazmidok

Az első közleményben használt, humán survivin promóter különböző hosszúságú szakaszait kódoló riporter plazmidokat – pLuc-230c, pLuc-441c, pLuc-1430c, pLuc-2840c – Dr Fengzhi Li-től kaptuk (Li et al., 1998; Li and Altieri, 1999). A pcDNA-16E6 és pcDNA-16E7 expressziós vektorok munkacsoportunk egy korábbi munkája során készültek (Murvai et al., 2004). A vad típusú HPV 16 E6 onkoproteint (pJ4 Ω -16E6), valamint ennek deléciós mutánsait (pJ4 Ω -16E6 Δ 106-110, -16E6 Δ 111-115 és -16E6 Δ 128-132) kifejező plazmidokat Dr Karen H. Vousden (Crook et al., 1991) bocsátotta rendelkezésünkre. A pGUP.PA.8 luciferáz riporter vektort, illetve az ezen vektorba klónozott konszenzus p53 kötő helyet tartalmazó p53CON-Luc riporter plazmidot Dr Jerry W. Shay-től (Funk et al., 1992), míg a humán p53 tumorsuppresszor fehérje 72. kodonján prolint tartalmazó izoformát kódoló pcDNA3-p53Pro expressziós vektort Dr Lawrence Banks-től (Thomas et al., 1999a) kaptuk.

Sejtkultúrák

A HeLa (ATCC, CCL-2) HPV 18 pozitív cervicalis adenocarcinoma, az MCF-7 (ATCC, HTB-22) humán mellrák eredetű és a Saos-2 (ATCC, HTB-85) humán osteosarcoma sejtvonalak a tranziens transzfekciós kísérleteinkben szerepeltek, míg a humán embrionális fibroblasztok (HEF) 4-10. passzázsát a stabil transzfekciók során alkalmaztuk. A HEF sejteket művi abortus során eltávolított három hónaposnál fiatalabb embriókból preparálták intézetünkben, és korábban rutinszerűen alkalmazták a humán citomegalovírusok tenyésztéséhez. A PA317-LXSN, -16E6, -16E7, -16E6E7 sejtek rekombináns retrovírus termelő sejtvonalak (ATCC) (Halbert et al., 1991). A munkánk során felhasznált valamennyi sejtvonalat 10 % FBS-sel (fetal bovine serum, Invitrogene), 2 mM L-glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel és 100 μ g/ml streptomycinnel kiegészített DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma) tápfolyadékban tartottuk fent.

A stabil transzfekcióban használt retrovírusokat HeLa sejteken titráltuk geneticin (G418) (Gibco) (500 μ g/ml) szelekciós ágens felhasználásával, metilénkék festést követően. HEF sejtvonalat fertőztünk a kontroll (LXSN), E6- (16E6), E7- (16E7) valamint E6E7

onkogéneket (16E6E7) tartalmazó retrovírus vektorokkal, majd 200 µg/ml G418 tartalmú DMEM tápfolyadékban szelektáltuk a stabilan transzfektált, ezáltal G418 szemben rezisztenssé vált sejteket. Az így létrehozott sejtvonalak elnevezése HEF-LXSN, HEF-16E6, HEF-16E7, HEF-16E6E7.

Tranziens transzfekció és luciferáz teszt

A HeLa és MCF-7 sejteket Lipofectamine 2000-rel (Invitrogen) transzfektáltuk. Mindkét esetben 2 µg riporter vektort és 1 µg expressziós vektort juttatunk a sejtekbe, amelyeket ezután 3 cm átmérőjű sejtenyészítő platek-en tartottunk fenn. A Saos-2 sejt esetén 5 µg riporter vektort és 2 µg expressziós vektort kotranszfektáltunk (500 µl DMEM: 10 % FBS, 30 mM Hepes, pH 7.5; 950 µF, 300 V) elektroporációval (GenePulser II, Bio-Rad), majd a sejteket 6 cm átmérőjű sejtenyészítő platek-en tenyésztettük tovább. Mindhárom sejt esetén 48 órás inkubációt követően Reporter Lysis Buffer-rel (Promega) és egy fagyasztás-olvasztás ciklussal tártuk fel a sejteket, majd luciferáz tesztel (Luciferase Assay System, Promega), luminométeren (Digene Diagnostics DCR-1) mértük a sejtlizátum luciferáz aktivitását. A luciferáz egy kemilumineszcens reakciót katalizál, amelyben az enzim szubsztrátjával (luciferin) ATP vagy koenzim-A jelenlétében, foton-felszabadulással járó oxidációs reakcióban reagál. A kísérleteinkben használt riporter vektorok tartalmazzák a szentjánosbogár luciferáz enzimét kódoló génjét (*luc*). Ezen gén átíródása, így a képződött luciferáz enzim aktivitása is függ az elé épített promóter szekvenciák aktivitásától, így ez a rendszer alkalmas annak megállapítására is, hogy a kotranszfekció során az expressziós vektoraink által kódolt fehérjék hatnak-e, és ha igen, akkor hogyan a *luc* gén elé épített promóter szakaszra. A sejtextraktum fehérjetartalmának standardizálására Bradford protein assay-t használtunk. A transzfekciós kísérleteket három független sorozatban végeztük el, az így kapott eredményeket átlagoltuk és a standard error értékekkel együtt ábrázoltuk.

Sejtciklus-szinkronizálás

A HeLa sejteket 24 óráig kezeltük 10 µM aphidicolinnal (G1), 2 mM thymidinnel (S), illetve 0,2 µg/ml nocodazole-lal (G2/M), annak érdekében, hogy azokat a sejtciklus adott szakaszában leállítsuk.

A stabilan transzfektált HEF sejtvonalak szinkronizálása G1 fázisban 18 + 24 óráig tartó 10 μ M aphidicolinos kezeléssel történt, míg a G2/M fázis blokkot 18 órás aphidicolinos kezelést követő 24 órás 0,2 μ g/ml nocodazole kezeléssel érték el.

Áramlási citometria (FACS)

Annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy milyen arányban vannak a sejtek a sejtciklus különböző szakaszaiban, tripszines kezelést végeztünk, majd PBS-es mosást követően 70 %-os etanollal fixáltuk a sejteket. Ezt követően 30 percig 20 μ g/ml propidium-jodid, 200 μ g/ml RNase A és 0,1 % Triton-X 100 tartalmú PBS oldattal festettünk, majd FACScan (Beckton Dickinson) citométerrel (a DNS tartalom mérésével) határoztuk meg a sejtek arányát az adott fázisokban. A kapott eredményeket ModFit LT software-rel (Beckton Dickinson) analizáltuk.

Reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakció (RT-PCR)

Sejtvonalainkból TRI Reagent-tel (Sigma) vontuk ki az RNS-t. A reverz-transzkriptáz lépésekben a survivin, HPV 16 E6, E7 és a GAPDH cDNS amplifikációja során használt antisense primereket (1. táblázat) mértük a reakciós elegyekhez (DuraScript RT-PCR kit, Sigma), amelyeket 50 percig 50 °C-on tartottunk. Az első cDNS szál további felszaporítása 50 μ l végtérfogatban (5 μ l cDNS, 2,5 U RedTaq polimeráz (Sigma), 1 x PCR puffer, 200 μ M az egyes dNTP-ből, 20-20 pmol a primerekből) az alábbi hőmérsékleti profillal, Applied Biosystems 2700 Thermal Cycler készüléken történt:

	95 °C	2 perc	1 ciklus
Ta survivin Ta E6, E7, GAPDH	95 °C	30 s	} 23 ciklus
	60 °C	90 s	
	55 °C	90 s	
	72 °C	90 s	
	72 °C	3 perc	1 ciklus

Ta: anellációs hőmérséklet

Sense és antisense primerek szekvenciái		
survivin	5'-GGCAGCCCTTTCTCAAGGACCACC-3' 5'-GATGGCACGGCGCACTTTCTTCGC-3'	(Lohr et al., 2003)
HPV 16 E6	5'-TGTTTCAGGACCCACAGGAG-3' 5'-TTCTTCAGGACACAGTGGCT-3'	
HPV 16 E7	5'-GCAACCAGA-GACAACCTGATCTCTAC-3' 5'-GGTCTTCCAAAGTACGAATGTCTACG-3'	
GAPDH	5'-AATCCCATCACCATCTTCCAG-3' 5'-TCATGAGTCCTTCCACGATACC-3'	
survivin promóter	5'-GTTCTTTGAAAGCAGTCGAG-3' 5'-GCCAGTTCTTGAATGTAGAG-3'	
MY09-MY11	5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3' 5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3' M = A/C, W = A/T, Y = C/T, R = A/G	(Ambrosini et al., 1997; Gravitt et al., 2000)
GP5+-GP6+	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3' 5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'	(Ambrosini et al., 1997; Roda Husman et al., 1995)

1. táblázat Az első és második közleményben felhasznált primerek szekvenciái

Northern blot hibridizáció

Az RNS mintáinkat formaldehides agar gélen is megfuttattuk, majd Hybond-N⁺ nylon membránra (Amersham) blottoltuk és radioaktívan jelölt survivin, illetve GAPDH próbákkal hibridizáltattuk. A DNS próbák jelölése Primer-a-Gene labelling system (Promega) segítségével, 50 µCi (1,85 kBq) [α -³²P]dATP (3000 Ci/mmol specifikus aktivitás) felhasználásával történt. A jelölt próbákat DyeEx spin oszlopokon (Qiagen) tisztítottuk, majd denaturálást követően a hibridizációs oldathoz (5 x SSC, 50 % formamid, 1 % SDS, 5 x Dernhardt's oldat, 100 µg denaturált lazac sperma DNS) adtuk és 42 °C-on inkubáltuk éjszakán át. Ezt követően a membránt kétszer mostuk 5 percig, 42 °C-on, 2 x SSC és 0,1 % SDS elegyével, majd kétszer 15 percig, 42 °C-on, 0,2 x SSC és 0,1 % SDS elegyével. A hibridizáció helyén a radioaktív jel detektálása Bio-Rad phosphorimagerrel (Personal Molecular Imager FX) zajlott.

Vizsgálati csoportok, klinikai minták

A survivin promóter polimorfizmus esetleges hatását epidemiológiai vonatkozásban az alábbi csoportokon vizsgáltuk. 81 radikális histerectomián és lymphadenectomián átesett méhnyakrákos beteg szövetmintája alkotta a tumoros vizsgálati csoportot. 122 páciens tartozott a Papanicolaou osztályozás szerinti P3 csoportba (átmeneti citológiai eredmény –

enyhe-súlyos diszkariózis, – ahol nem zárható ki premalignus elváltozás). A P3 citológiai diagnózis megfelel a 2001-es Bethesda rendszerben (Solomon et al., 2002) megállapított ASC (atypical squamous cells) kategóriának, amely magába foglalja az ASC-US (ASC of undetermined significance) és az ASC-H (ASC, nem zárható ki a high-grade squamous intraepithelial lesion) diagnózist is. A kontroll minták közé 180 véradó perifériás vérmintája tartozott.

DNS izolálás

A méhnyakrákos szövetekből a DNS-t proteináz K emésztést követően fenol-kloroform-izoamilalkohol 25:24:1 arányú elegyével vontuk ki. A P3 minták DNS tartalmát a méhnyak laphámsejtjeiből nyertük ki a Kónya és munkatársai közleményében (Konya et al., 2000) leírtak alapján. A kontroll DNS-t a véradók fehérvérsejtjeiből izoláltuk azok lizálását követő fenol-kloroform-izoamilalkohol 25:24:1 arányú elegyének felhasználásával.

Humán papillomavírus (HPV) kimutatása és tipizálása

A méhnyakrákos és P3 mintákból standard nested MY/GP-PCR-rel, MY09-MY11/GP5+-GP6+ primerek (1. táblázat) (Ambrosini et al., 1997; Gravitt et al., 2000; Roda Husman et al., 1995) felhasználásával mutattuk ki a HPV DNS-t. Az első PCR körben a 2. táblázatban látható hőmérsékleti profillal (2x REDTaqTM ReadyMixTM PCR Reaction Mix (Sigma), 20-20 pmol a primerekből és 0,1-0,2 µg DNS) (2. táblázat) történt az amplifikáció. A második körben az első kör termékéből 2-2 µl mértünk a 25 µl végtérfogató reakcióközegbe (2x REDTaqTM ReadyMixTM PCR Reaction Mix (Sigma), 20-20 pmol a primerekből) és a 2. táblázatban látható hőmérsékleti profillal végeztük a PCR reakciót. A HPV típusok meghatározása érdekében a PCR termékeket *Mse*I és *Rsa*I (New England Biolabs) restriktációs enzimekkel emésztettük, majd az emésztések során kapott fragment mintázat alapján azonosítottuk a HPV típusokat.

2. táblázat Az nested MY/GP-PCR hőmérsékleti profilja

MY-PCR, 1. kör			GP-PCR, 2. kör		
95 °C	2 perc	1 ciklus	94 °C	2 perc	1 ciklus
96 °C	20 s	40 ciklus	95 °C	60 s	35 ciklus
50 °C	5 s		48 °C	90 s	
52 °C	15 s		72 °C	90 s	
72 °C	90 s				
72 °C	2 perc	1 ciklus	72 °C	4 perc	1 ciklus

PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*)

A survivin promóter polimorfizmus vizsgálatához a promóter megfelelő szakaszának felszaporítása a következő hőmérsékleti profil mellett az 1. táblázatban feltüntetett survivin promóter specifikus primerekkel, 40 µl reakcióelegyben (20 µl REDTaqTM ReadyMixTM PCR Reaction Mix (Sigma), 20-20 pmol a primerpárból és 0,1-0,2 µg DNS) történt:

95 °C	5 perc	1 ciklus
95 °C	30 s	35 ciklus
57 °C	90 s	
72 °C	90 s	
72 °C	5 perc	1 ciklus

A PCR terméket *EcoO109I* (New England Biolabs) restrikciós enzimmal emésztettük, majd a kapott fragment mintázatokból megállapítottuk, hogy adott mintában melyik allél található a polimorf nukleotid helyén. Kontrollként különböző sejtvonalból (A549, Caski, HeLa) izolált DNS szolgált.

PCR-SSCP (*single strand conformation polymorphism*)

A survivin promóter specifikus PCR során kapott terméket SSCP analízissel is megvizsgáltuk. *HaeIII* (Promega) restrikciós enzimmal történő emésztést követően – amely során az SSCP analízishez szükséges rövid fragmenteket kaptunk – az emésztett mintákat SSCP töltő pufferben (95 % formamid, 0,05 % brómfenolkék, 0,05 % xilén-cianol) 5 percig

95 °C-on denaturáltuk, majd 10 %-os poliakriamid gélen megfuttattuk (1 x TBE puffer, 350 V, 4 °C, 4-5 óra), végül a gélen ezüsfestéssel tettük láthatóvá az eredményt. Az ezüsfestés első lépéseként a gél 2x 5 percig áztattuk rázatva ecetsavas fixálóban (10 % etanol, 0,5 % ecetsav), majd 5 percig 0,1 %-os AgNO₃ oldatban, ezt követően 5 percig előhívóba (1,5 % NaOH) tettük, végül 5 percig 0,1 % formaldehidet tartalmazó előhívóban ráztuk. Az SSCP módszerrel már egyetlen nukleotid eltérést is kimutathatunk, így megfelelő kontrollok mellett – A549, Caski, HeLa DNS – az általunk vizsgált polimorfizmus meghatározására is alkalmas.

Szekvenálás

A survivin promóter specifikus PCR-ből származó terméket Microcon YM-100-as oszlopon tisztítottuk és BigDye Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA) felhasználásával – a gyártó leírása szerint – a promóter specifikus primerekkel (1. táblázat) mindkét irányban megszekvenáltuk. A nukleotid szekvenciákat az ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, UK) készülékkel olvastuk le.

A szekvenáló PCR hőmérsékleti profilja:

95 °C	2 perc	1 ciklus
95 °C	30 s	} 25 ciklus
57 °C	15 s	
60 °C	4 perc	

Statisztikai módszer

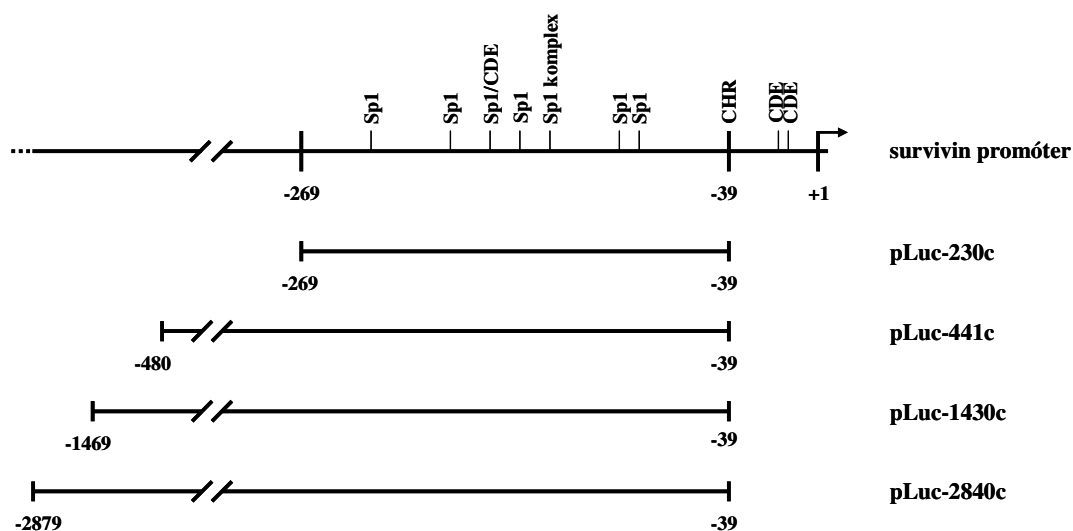
A survivin promóter polimorfizmus vizsgálat során a genotípus megoszlások elemzése a három vizsgálati csoportban chi-négyzet teszttel történt. A $p < 0,05$ esetben tekintettük az eredményeket statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

I. A humán papillomavírus 16 onkoproteinjeinek hatása a survivin gén expressziójára (I. közlemény)

A HPV 16 E6 gátolja a survivin promótert

A HPV 16 E6 és E7 onkogénjének hatását a survivin génre tranziens transzfekciós kísérletekben teszteltük. A kísérletekben használt riporter plazmidok a humán survivin gén promóterének különböző hosszúságú szakaszait tartalmazzák a pLuc vektorba, a luciferáz gén elé klónozva (4. ábra).

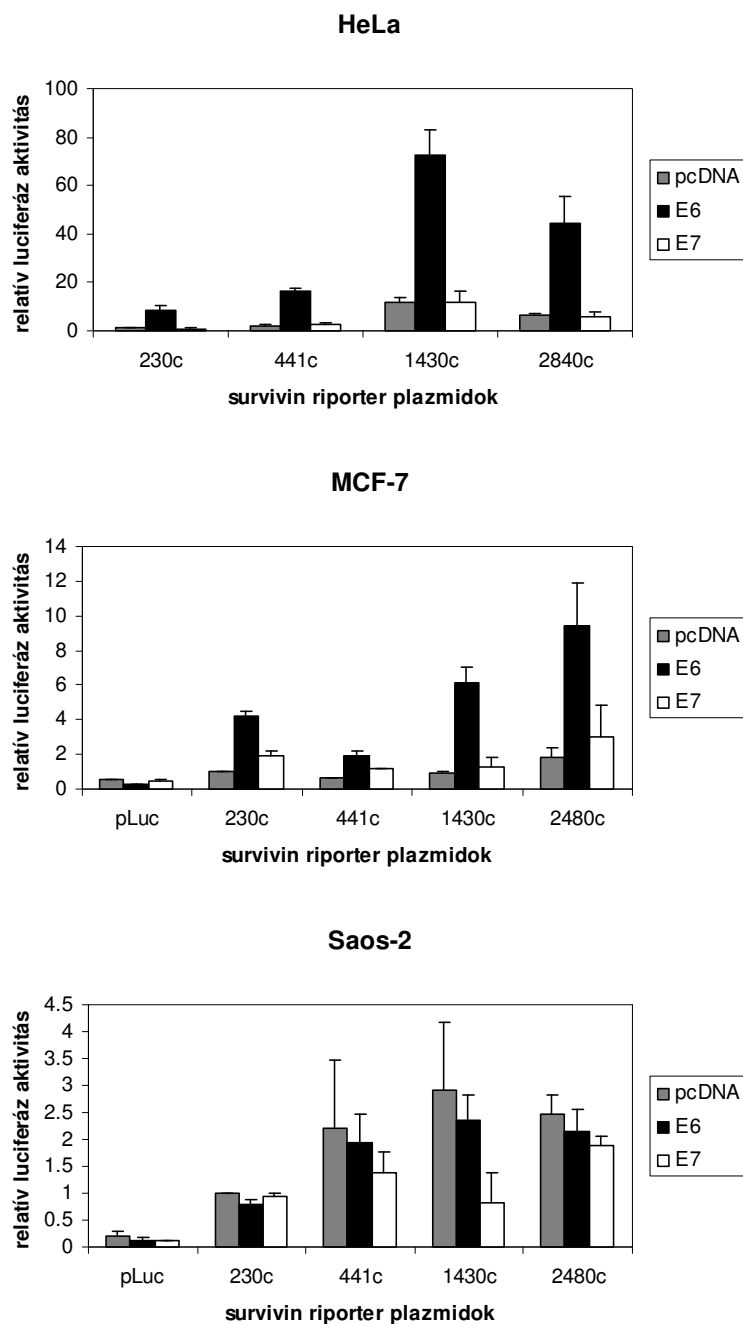


4. ábra

A humán survivin promóter riporter plazmidok sematikus ábrája

HeLa és MCF-7 sejtekben a különböző survivin riporter plazmidokat együtt transzfektálva a HPV 16 E6 (pcDNA-16E6), E7 (pcDNA-16E7) onkoproteint kódoló plazmidokkal, valamint az üres expressziós vektorokkal azt tapasztaltuk, hogy az E7-nek szemben az E6-tal nem volt szignifikáns hatása a survivin promóter aktivitására. A HeLa és az MCF-7 mindegyike p53 pozitív sejtvonal, vagyis képesek vad típusú p53 tumorsuppresszor fehérje expressziójára. Mivel a magas kockázati csoportba tartozó HPV-k, így a 16-os típus E6 onkoproteinje is képes a p53 fehérje degradációjára, ezért kísérletünket p53 negatív Saos-2 sejteken is elvégeztük. Ebben a kísérletben az E6-nak egyik survivin

riporter plazmidra sem volt transzaktiváló hatása, ami felvetette annak lehetőségét, hogy az E6 ezen hatásában a p53 jelenlétének szerepe lehet. Mindhárom sejtvonal esetén a pLuc230c – pcDNA3.1 kotranszfekcióból nyert luciferáz aktivitást tekintettük 1-nek és ehhez viszonyítottuk a többi párosításból kapott aktivitásokat (5. ábra).

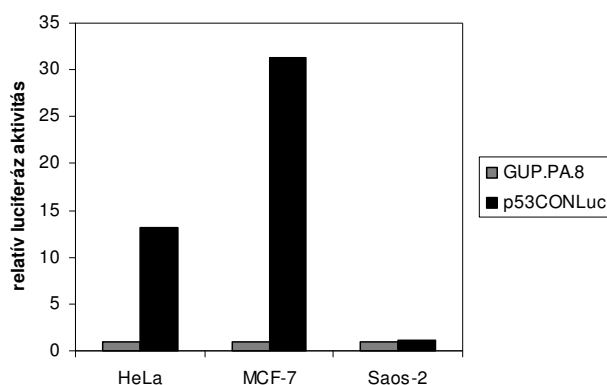


5. ábra
A HPV 16 E6 és E7 fehérjék hatása a survivin riporter plazmidok transzkripció aktivitására
HeLa, MCF-7 és Saos-2 sejtvonalakban

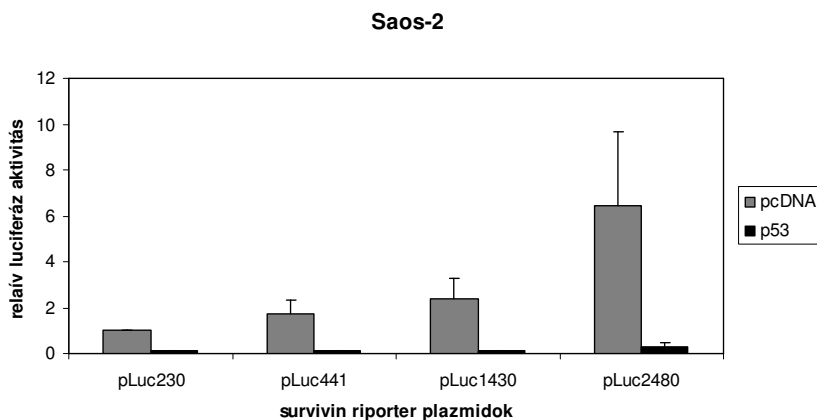
Az E6 survivin promóterre kifejtett transzaktiváló hatása p53 függő

Annak érdekében, hogy tisztázzuk a p53 szerepét az E6 survivin promóterre kifejtett hatásában, először megvizsgáltuk a HeLa, MCF-7 és Saos-2 sejtvonalainkban a működőképes, endogén p53 fehérjék jelenlétét. Ehhez a transzfekció során konszenzus p53 kötőhelyet kódoló luciferáz riporter plazmidot (p53CON-Luc), illetve üres kontroll vektort (pGUP-PA.8) használtunk, majd mértük a luciferáz aktivitást (6.a ábra). A HeLa és MCF-7 sejtekben a p53 fehérjék funkcionálisan aktívak voltak, míg a Saos-2 sejtvonalban nem mértünk luciferáz aktivitást, ami a p53 hiányát jelzi. A p53 fehérje hatását a survivin promóter plazmidokra önmagában is megvizsgáltuk, és összhangban korábbi tanulmányokkal (Hoffman et al., 2002; Mirza et al., 2002) azt találtuk, hogy a p53 gátolta a survivin promóter plazmidjainkat (6.b ábra). Mindezek arra utalnak, hogy az E6 p53 degradáló képességének szerepe lehet az onkogén survivinre kifejtett hatásában.

a)



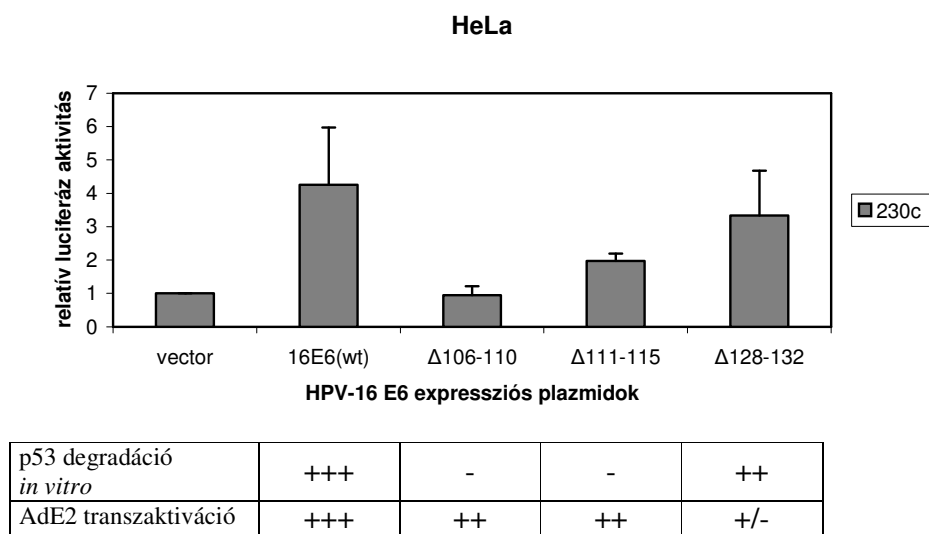
b)



6. ábra

a) Funkcionálisan aktív p53 jelenléte HeLa, MCF-7 és Saos-2 sejtekben
b) A p53 fehérje hatása a survivin riporter plazmidokra Saos-2 sejtvonalban

Tovább vizsgálva a kérdéskört, olyan deléciós HPV 16 E6 mutánsokat teszteltünk, amelyeknek p53 kötő és *in vitro* p53 degradáló képességüket, valamint transzaktiváló hatásukat korábban már meghatározták (Crook et al., 1991). A HeLa sejteken elvégzett transzekcióban pLuc-230c plazmidot juttatunk vad típusú HPV 16 E6-ot (pJ4Ω-16E6) kódoló, valamint a különböző deléciós mutánsokat kódoló plazmidokkal (pJ4Ω-16E6Δ106-110, -16E6Δ111-115 és -16E6Δ128-132) együtt a sejtekbe. Azon két mutáns (16E6Δ106-110, 16E6Δ111-115), amely elvesztette p53 degradáló képességét, de az adenovírus (Ad) E2 promóter transzaktiváló képességében nem sérült, nem vagy alig befolyásolta a survivin promóterét. Az 16E6Δ128-132 mutáns azonban – amelynek p53 degradáló képessége a vad típuséhoz közelít, de az AdE2 transzaktiváló hatása nagyon alacsony – megtartotta a survivin promóter transzaktiváló hatását (7. ábra). Ezek az eredmények tovább erősítik azon feltételezésünket, mely szerint az E6 p53 kötő képessége fontos lehet az E6 survivin promóterére kifejtett transzaktiváló hatásában.



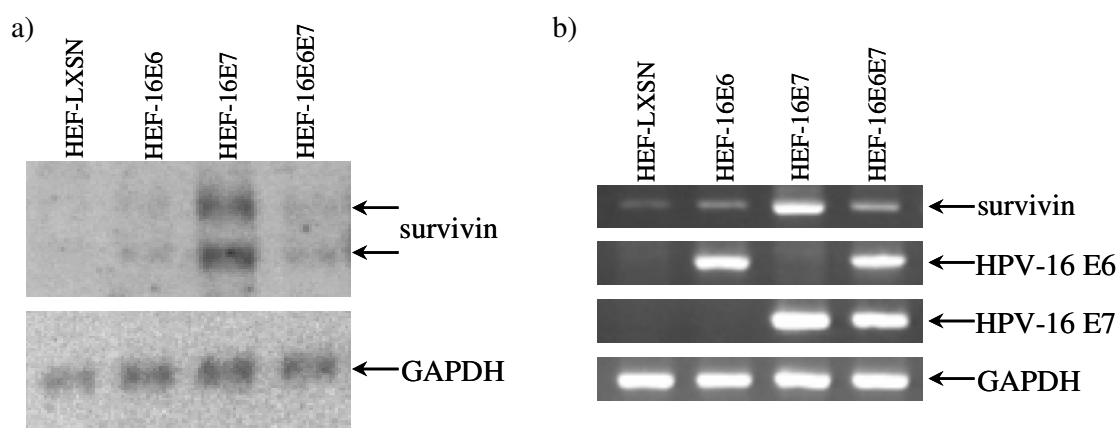
7. ábra

A mutáns HPV 16 E6 fehérjék hatása a p230c survivin riporter plazmidra HeLa sejtekben
A pLuc230c riporter plazmiddal és üres vektorral transzfektált sejtek luciferáz aktivitását tekintettük 1-nek, a többi transzekcióban mért aktivitást ehhez viszonyítottuk.
A táblázatban feltüntetett adatok Crook és munkatársaitól (1991) származnak.

A HPV 16 onkogének gátolják az endogén survivin transzkripcióját

Mivel a transzformált sejtvonalakban, a HeLa-ban, C-33A-ban vagy az A549 sejtekben magas survivin mRNS szintet találtunk, ezért olyan sejteket kerestünk az E6 endogén survivinre kifejtett hatásának vizsgálatához, amelyekben várhatóan alacsony a

bazális survivin mRNS szint. A HEF sejteket választottuk, amelyeket stabilan transzfektáltunk kontroll (LXSN), HPV 16 E6, E7 vagy E6E7 onkogéneket hordozó retrovírus vektorokkal. G418 szelekciót követően a transzfektált sejteknek kinyertük az RNS tartalmát. Northern blot hibridizációt és szemikvantitatív RT-PCR-t végeztünk (8. ábra). A kontroll (HEF-LXSN) sejtvonalban mindkét módszerrel alacsony mRNS szintet kaptunk, míg az E6, E7 és E6E7 onkogént tartalmazó HEF sejtekben (HEF-16E6, -16E7, -16E6E7) az endogén survivin mRNS szint jelentősen megemelkedett. Érdekes módon legnagyobb mértékben az E7 növelte meg a survivin mRNS szintet, holott korábbi kísérleteinkben az E7 közvetlen hatását a survivin promóterére nem tapasztaltuk.



8. ábra

Az HPV 16 E6/E7 hatásának kimutatása az endogén survivin transzkripciójára HEF sejtekben
a) Northern blot, b) és semikvantitatív RT-PCR-rel

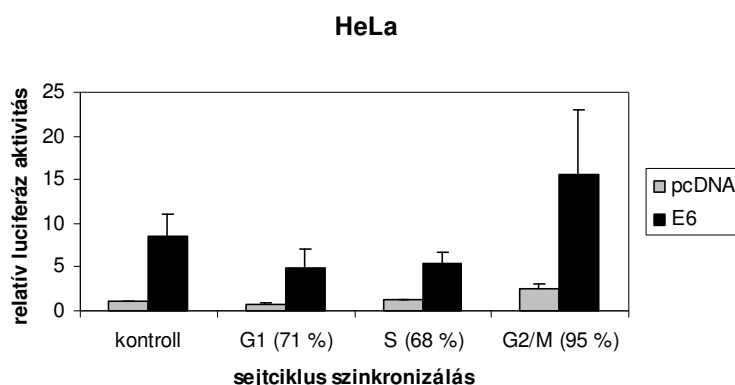
A HPV onkogének survivinre gyakorolt hatása független a sejtciklustól

A survivin expressziója sejtciklus által erősen szabályozott folyamat, ezért feltételeztük, hogy az E6 és az E7 a sejtciklus befolyásolásán keresztül fejtik ki hatásukat. Azonban FACS analízissel megvizsgálva a kontroll (HEF-LXSN) és az E6E7 expresszáló (HEF-16E6E7) sejtek megoszlását a sejtciklus különböző fázisaiban, nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést.

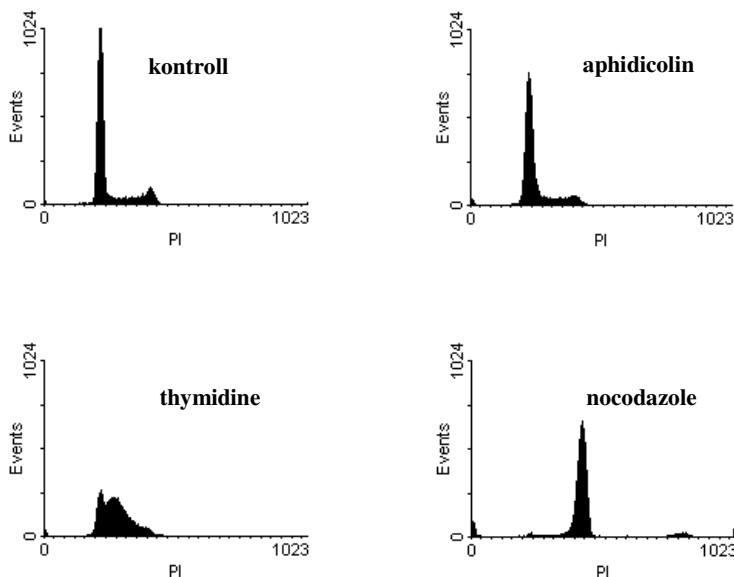
Ezt követően megnéztük, hogy a sejtciklus adott szakaszaiban hogyan alakul a HPV 16 E6 hatása a survivin promóterére. HeLa sejtekbe juttattuk a pLuc-230c survivin riporter plazmidot a kontroll (pcDNA3.1) vagy a HPV 16 E6 (pcDNA-16E6) expressziós vektorral együtt, majd a transzfektált sejteket aphidicolinos, thymidines vagy nocodazole-os kezeléssel

leállítottuk a sejtciklus G1, S és G2/M fázisában (9.b ábra). A sejt-szinkronizálást követően a survivin promóter aktivitást luciferáz teszttel mértük, és megállapítottuk, hogy az E6 a sejtciklus valamennyi szakaszában képes volt transzaktiválni a survivin promóterét, ami arra utal, hogy az E6 transzaktiváló hatása a survivin promóterre függetlenül alakul a sejtciklustól. Ezen transzfekciós kísérletekben is a pLuc230c- és az üres pcDNA3.1 vektorral együtt transzfektált sejtek luciferáz aktivitását tekintettük 1-nek, és ehhez viszonyítottuk a többi transzfekcióban kapott aktivitást (9.a ábra).

a)



b)

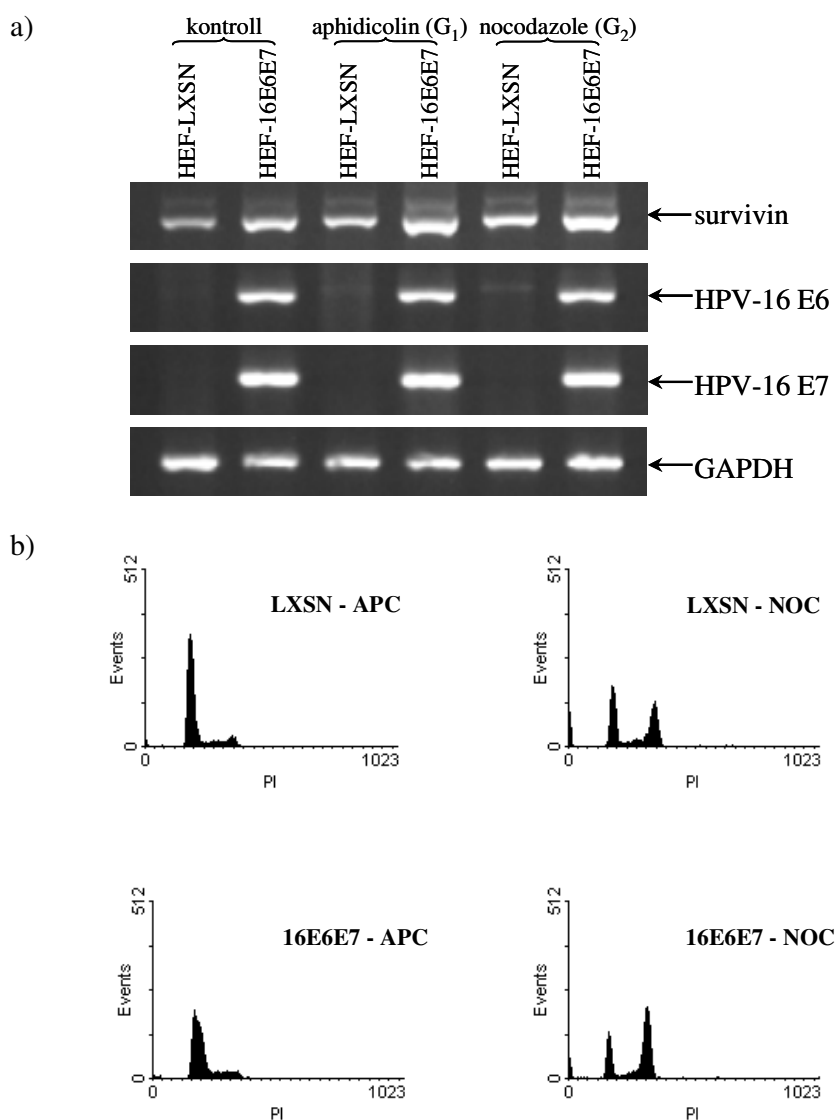


9. ábra

A HPV 16 E6 survivin promóterre gyakorolt hatásának sejtciklus függése HeLa sejtekben

- a) A HPV 16 E6 hatása a survivin promóterre sejtciklustól függetlenül alakult HeLa sejtekben
b) FACS analízis: HeLa sejtek aránya G1 (aphidicolin), S (thymidine) és G2/M (nocodazole) fázisban.

Annak érdekében, hogy meg tudjuk, hogy az E6/E7 onkogének hatását az endogén survivin transzkripcióra befolyásolja-e a sejtciklus, G1 és G2/M fázisban leállítottuk a HEF-LXSN és HEF-16E6E7 sejteket, kivontuk RNS tartalmukat és szemikvantitatív RT-PCR-rel megvizsgáltuk a survivin mRNS szintet (10. ábra). A HEF sejteket nem tudtuk megbízhatóan szinkronizálni az S fázisban. Az eredmények arra utaltak, hogy a HPV 16 E6 és E7 mindkét sejt fázisban fokozta az endogén survivin transzkripciójának mértékét, mely alapján feltételezhető, hogy az E6 és E7 hatása az endogén survivin transzkripciójára szintén független a sejtciklustól.



10. ábra

A HPV 16 E6 survivin promóterre gyakorolt hatásának sejtciklus függése HEF sejtekben

- a) A HPV 16 E6/E7 endogén survivin génre gyakorolt hatása HEF sejtekben független a sejtciklustól
b) FACS analízis: HEF-LXSN (kontroll) és HEF-16E6E7 sejtek aránya G1 (aphidicolon kezelés) és G2/M (nocodazole kezelés) fázisban

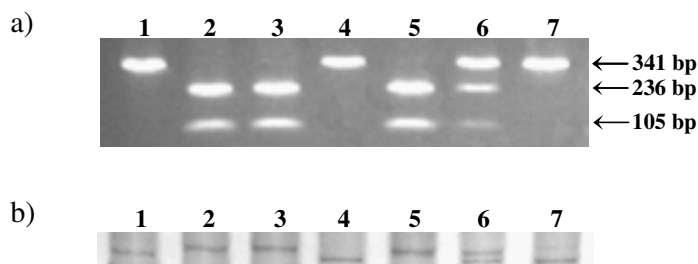
II. Survivin promóter polimorfizmus és a méhnyak karcinogenezise (II. közlemény)

Survivin promóter CDE/CHR szakaszát érintő polimorfizmus megoszlása a vizsgálati csoportokban

A survivin promóter specifikus PCR-t követő RFLP analízissel meg tudtuk határozni, hogy mintáink melyik nukleotid variánst (G vagy C) tartalmazzák a polimorf –31 nukleotid helyen. A 341 bp hosszúságú PCR terméket *Eco*O109I restrikciós enzimmal emésztettük. Az enzim hasítási helye az általunk vizsgált polimorfizmus helyére esik. Abban az esetben, ha az enzim hasított és az emésztés egy 236 bp és egy 105 bp hosszúságú DNS szakaszt eredményezett, a mintánk GG homozigóta volt, ha nem történt hasítás, akkor CC homozigóta, míg ha a két rövidebb fragment mellett jelen volt az emésztetlen PCR termék is, a mintánk GC heterozigóta volt a kérdéses polimorf helyen.

RFLP mellett mintáinkat SSCP analízissel is megvizsgáltuk, és az ezüstoffestést követően a kontrollként használt sejtvonalak SSCP mintázata alapján meghatároztuk a polimorfizmust. Az SSCP analízis eredménye teljesen egybevágott az RFLP módszerrel kapottakkal (11. ábra).

A három genotípus variáns egy-egy reprezentatív képviselőjét megszekvenáltuk, a szekvenciák szintén alátámasztották az RFLP és SSCP eredményeit.



11. ábra

A survivin promóter genotípus vizsgálata RFLP (a) és SSCP (b) analízissel

A 2., 3., 5. minta G allélra nézve homozigóta, az 1., 4. és 7. minta CC homozigóta, a 6-os minta GC heterozigóta

Méhnyakrákos és P3-as mintáinkban nested PCR-t követő RFLP analízissel mutattuk ki a HPV jelenlétét és azonosítottuk annak típusát. A 3. táblázatban az előbb említett két populációban előforduló HPV típusokat tüntettük fel.

3. táblázat HPV típusok P3 és méhnyakrákos betegekben

	P3 (n = 122)	méhnyakrák (n = 81)
HPV 16	45	53
HPV 18	7	12
egyéb HPV	42 ^a	8 ^b
Többszörös fertőzés	3 ^c	-
HPV negatív esetek	25	8

^aHPV 6: 6, HPV 11: 1, HPV 31: 7, HPV 33: 9, HPV 35: 2, HPV 44: 2, HPV 45: 1, HPV 52: 4, HPV 53: 1, HPV 56: 2, HPV 58: 2, HPV 66: 2 eset és 3 nem tipizálható HPV minta

^bHPV 11, HPV 31, HPV 33, HPV 43, HPV 44, HPV 54, HPV 59: 1-1 eset; és egy nem tipizálható HPV eset

^cHPV 16/31, HPV 16/33 és HPV 6/45

A 4. táblázat a survivin promóter -31 genotípus megoszlását tünteti fel a kontroll populációban, a méhnyakrákos és a P3 csoportban.

4. táblázat A survivin promóter -31 polimorfizmus megoszlása a beteg és kontroll populációkban

	kontroll (n = 180)	P3 (n = 122)	méhnyakrák (n = 81)
Genotípus			
GG	71 (0,39) ^a	56 (0,46)	29 (0,36)
GC	85 (0,47)	53 (0,43)	45 (0,56)
CC	24 (0,14)	13 (0,11)	7 (0,08)
Allélgyakoriság	G: 0,63 C: 0,37	G: 0,68 C: 0,32	G: 0,64 C: 0,36
		p = 0,5 ^b	p = 0,37 ^b

p = 0,4^c

^agenotípus gyakoriságok

^bChi-négyzet teszt a beteg és kontroll csoportok közti genotípus megoszlásbeli eltérésekre

^cChi-négyzet teszt a vizsgálati csoportok közti genotípus megoszlásbeli eltérésekre

A vizsgálati populációk genotípus gyakoriságának eloszlásában nem találtunk statisztikailag szignifikáns eltérést (p = 0,4). A kontroll csoport adatait összevetve a tumoros esetekkel (p = 0,37) valamint a P3 populációval (p = 0,5) szintén nem tudtunk statisztikailag szignifikáns különbséget kimutatni. Ugyancsak nem találtunk statisztikailag jelentős eltérést a survivin promóter genotípus eloszlásokban a kontroll csoport és a HPV pozitív (P3 és méhnyakrákos) esetek (p = 0,7) illetve a tumoros és tumormentes (kontroll és P3) esetek (p = 0,27) között.

A cervix carcinomában leggyakrabban előforduló HPV típus a HPV 16, ezért az adataink elemzése során összevetettük a HPV 16 pozitív P3 és méhnyakrákos populációk adatait a kontroll csoportéval. Ebben az esetben sem találtunk szignifikáns különbséget a HPV 16 pozitív esetek és a kontroll minták genotípus eloszlásában ($p = 0,74$).

A vizsgálati csoportjainkban kiszámolt allélgyakoriságok között, nem volt statisztikailag értékelhető különbség ($p = 0,99$), az allélgyakoriság alapján kalkulált genotípus eloszlás megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúlynak.

MEGBESZÉLÉS

I. A humán papillomavírus 16 onkoproteinjeinek hatása a survivin gén expressziójára (I. közlemény)

A survivin és a HPV 16 onkoproteinjei közti kölcsönhatás tanulmányozása során arra a következtetésre jutottunk, hogy az általunk használt humán tumoros sejtvonalakban a HPV 16 E6 fehérjeje transzaktiválta a humán survivin promótert. Ezen hatása az E6-nak összefüggésben volt a p53 celluláris tumorsuppresszor fehérje jelenlétével. A magas kockázati csoportba tartozó HPV E6-ról köztudott, hogy képes a p53 ubiquitin-függő degradációját indukálni, mely folyamatnak lényeges szerepe van a gazdasejtek transzformálásában (Munger and Howley, 2002). A p53 negatív Saos-2 sejtekben a HPV 16 E6 nem fejtett ki transzaktiváló hatást a survivin promóterére, a HeLa és MCF-7 sejtvonalakban viszont, amelyekben funkcionálisan aktív a p53 fehérje, az E6 képes volt a survivin promóterét transzaktiválni. Transzfekciós kísérleteinkből az is kiderült, hogy a p53 expressziója a survivin promóter plazmidokra – amelyeket az E6 transzaktivált – gátlólag hatott. A p53 survivin represszáló hatását korábban mások is kimutatták (Hoffman et al., 2002; Lohr et al., 2003; Mirza et al., 2002), bár a hatás mechanizmusa még nem teljesen tisztázott.

A survivin promóteren belül egy feltételezett p53 kötő hely található, amely Hoffmann és munkatársainak 2002-es tanulmányában (Hoffman et al., 2002) leírtak szerint képes a p53-t megkötni. Ez a kötődés elengedhetetlen a promóter repressziójához. Mások úgy vélik, hogy ez a represszió nem a közvetlen interakció révén valósul meg, hanem vagy a kromatin struktúra módosításán (Mirza et al., 2002), vagy a p21/waf1/cip1 gén expressziójának indukálásán keresztül (Lohr et al., 2003). Ezek alapján feltételezhető, hogy az E6-nak a humán survivin promóterre kifejtett transzaktiváló hatása a p53 fehérje degradációján keresztül valósul meg. A mutáns E6 plazmidokkal végzett vizsgálataink szintén ezt a feltevésünket támasztják alá, ugyanis azoknál a deléciós mutánsoknál (16E6 Δ 106-110, 16E6 Δ 111-115), amelyek elveszítették p53 kötő és degradáló képességüket, nem vagy csak nagyon alacsony survivin promóter transzaktiváló hatást tapasztaltunk, míg azon mutáns (16E6 Δ 128-132) esetében, amely képes a p53 kötésére és degradálására, a survivin promóterére kifejtett transzaktiváló hatás megmaradt, annak ellenére, hogy az adenovírus E2 promóterének (AdE2) transzaktiválására képtelen (Crook et al., 1991).

A HPV 16 E6 és E7 onkogének endogén survivin transzkripcióra kifejtett hatásának tanulmányozását HEF sejtvonalakon végeztük. Kontroll HEF (HEF-LXSN) sejtekben a survivin mRNS szint alacsony, míg a retrovírus vektorok segítségével bejuttatott HPV 16 E6-ot és E7-et expresszáló sejtekben (HEF-16E6, -16E7, -16E6E7) az onkoproteinek indukálták az endogén survivin transzkripcióját. Az E6 esetében ez összhangban volt a tranziens transzfekciós kísérleteinkkel, amelyek során az E6 transzkripciósan aktiválta a survivin promótert. Az E7 a korábbi transzfekciós vizsgálatokban ugyan nem transzaktiválta a survivin promótert, de az endogén survivin mRNS szint emelkedését képes volt indukálni HEF sejtekben. Nees és munkatársai (Nees et al., 2000) is hasonló eredményre jutottak cDNS microarray kísérleteikben, miszerint humán keratinocitákban a HPV 16 E6 és E7 képes a survivin expressziójának fokozására.

Mivel a survivin expressziója a sejtciklus által erősen szabályozott folyamat, a HPV onkoproteinjeiről pedig ismert tény, hogy képesek a sejtciklust módosítani, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy a HPV onkogének hatása a survivin expressziójára függ-e a sejtciklustól. HeLa sejteken elvégzett transzfekciós kísérletekben, sejtciklus szinkronizálást követően az E6 survivin promótert transzaktiváló hatása sejtciklustól függetlenül alakult (9. ábra). HEF sejtekben az endogén survivin mRNS szint változása a HPV 16 E6/E7 jelenlétében szintén független volt a sejtciklustól (10. ábra). Ezen eredmények alapján feltételezzük, hogy a HPV 16 E6 onkoproteinje nem a sejtciklus módosításán keresztül aktiválja a survivin promótert.

A HIV 1 (humán immunodeficiencia vírus 1) Vpr fehérjéje a survivin promóterének transzaktiválását oly módon éri el, hogy a sejtciklus leállítását indukálja G2/M fázisban. Más celluláris és virális onkoproteinről is kiderült, hogy fokozzák a survivin transzkripcióját. Ezek közül az Ad2 E1B-55K fehérje a survivin promótert felszabadítja a p53-mediált transzkripció gátlás alól, így fejtve ki hatását (Punga and Akusjarvi, 2003). Megfigyeléseink alapján feltételezzük, hogy az HPV 16 E6 hatása is ennek megfelelően érvényesülhet, hiszen a magas kockázati csoportban tartozó HPV-k E6 fehérjéi számos tulajdonságukban mutatnak hasonlóságot az adenovírus Ad E1B fehérjéivel, így a p53 kötő képességben, különböző promóterek transzaktiválásában és represszálásában és a programozott sejthalál (apoptózis) gátlásában (Cuconati and White, 2002; Finzer et al., 2002; Rapp and Chen, 1998). Úgy tűnik, hogy ezek a konzervatív funkciók fontos szerepet kapnak ezen onkoproteinek onkogén aktivitásában.

A magas kockázati csoportba tartozó HPV-k onkoproteinjei képesek az apoptózis folyamatát befolyásolni. A HPV 16 E6 természetes gazdasejtjében (primer keratinocitában) gátolja a differenciálódás vagy Fas ligand indukálta apoptózist (Aguilar-Lemarroy et al.,

2002; Alfandari et al., 1999). Bár az E6 pontos anti-apoptotikus hatásának háttere még nem ismert, a pro-apoptotikus fehérjék (p53, Bax és Bak) kötése és gátlása szerepet játszhat ebben (Finzer et al., 2002). Mivel a p53 képes a survivin expressziójának gátlására, és a survivin egy anti-apoptotikus fehérje, feltételezik, hogy a p53 részben a survivin transzkripciójának gátlása útján indukálja az apoptózist (Hoffman et al., 2002; Mirza et al., 2002), amelyek alapján elképzelhetőnek tartjuk, hogy a HPV 16 E6 survivinre kifejtett transzaktiváló hatása a p53 degradációján keresztül szerepet játszhat ezen onkoprotein anti-apoptotikus funkciójában.

II. Survivin promóter polimorfizmus és a méhnyak karcinogenezise (II. közlemény)

Az élő szervezetben a sejtosztódás és az apoptózis közti egészséges egyensúly fenntartása és szabályozása rendkívül fontos a normális fejlődés szempontjából. A szabályozó fehérjék nem megfelelő időben és helyen történő kifejeződése a sejtek kóros működéséhez és kontrollálatlan osztódásához vezethet. A különböző daganatokban a survivin fokozott átíródása arra utal, hogy az apoptózisban résztvevő géneknek jelentős szerepük lehet a tumorok kialakulásában és progressziójában (Altieri, 2001).

Számos tanulmányban közltek, hogy a survivin kifejeződése fontos lehet a méhnyakrák kialakulásában. Ezt a fokozott expressziót nemcsak az invazív rákban, hanem a rák megelőző állapotokban is tapasztalták (Branca et al., 2005; Frost et al., 2002; Kim et al., 2002; Rapp and Chen, 1998; Yoshida et al., 2003).

A HPV-nek régóta nagy jelentőséget tulajdonítanak a cervix carcinóma kifejlődésében. A vírus onkoproteinjei (E6 és E7) beavatkozva a normál sejtciklusba és a tumorképződés irányába hatnak. A survivin és a magas kockázatú HPV fertőzés közti esetleges kapcsolatról méhnyakrák esetén is vannak megfigyelések (Branca et al., 2005). Erre utal az a tanulmány (Nees et al., 2000) is, amelyben kimutatták, hogy a HPV E6 és E7 képes a survivin átíródásának normál menetét befolyásolni; első közleményünkben mi is úgy találtuk, hogy a HPV 16 E6 transzaktiválja a survivin promóter aktivitását.

Hogy mi lehet a pontos mechanizmusa a daganatokban a survivin szabálytalan átíródásának még nem teljesen világos. Számos elképzelés született azonban, ilyen a neuroblasztómában a 17q25 kromoszóma helyen a survivin lókuszt felszaporodása (Islam et al., 2000), a survivin exon1 demetilálása petefészekrákban (Hattori et al., 2001), a p53 transzkripció represszor hatásának (Hoffman et al., 2002; Mirza et al., 2002) valamint a Wnt/TCF szignál útvonalnak a módosítása (Zhang et al., 2001). A survivin promóter normál

sejtekben nem aktív, míg a tumor sejtekben intenzíven működik (Altieri et al., 1999). A promóter számos, a G2/M fázisban expresszáldó gének esetén jellemző sejtciklus függő elemet (CDE, cell cycle dependent element) és sejtciklus homológ régiót (CHR, cell cycle homology region) tartalmaz. Ezen elemek felelősek azért, hogy a survivin gén átíródása sejtciklus függő módon alakuljon. Xu és munkatársai (Xu et al., 2004) nemrégiben egy polimorfizmust (G/C) azonosítottak a survivin promóterben az ATG start kodonhoz viszonyított –31 nukleotid pozícióban. Rákos sejtvonalakban vizsgálva azt találták, hogy a polimorfizmusból adódó survivin promóter variánsok különböznek transzkripció aktivitásukat tekintve. Mivel ez a polimorfizmus a CDE/CHR represszor kötő helyen található, ezért a kapcsolódó elemek kötését befolyásolva hatással lehet a survivin gén sejtciklus függő transzkripciójára, ezáltal szerepe lehet a tumorokban a survivin expresszió szabályozásának felborulásában.

Epidemiológiai összefüggésében eddig még nem vizsgálták a survivin promóter polimorfizmus jelentőségét méhnyakrákban. Annak érdekében, hogy megismerjük a survivin polimorfizmus és a HPV asszociált cervix carcinoma kialakulása közti kapcsolatot, a survivin promóter variánsok genotípus megoszlását és az allél frekvencia alakulását méhnyakrákos és Papanicolaou osztályozás szerinti P3 diagnózisú betegekben, valamint kontroll populációban tanulmányoztuk.

Vizsgálati csoportjainkban nem találtunk statisztikailag szignifikáns eltérést a survivin promóter variánsok genotípus megoszlásában. Ez a megfigyelés azt feltételezi, hogy az általunk vizsgált populációkban a survivin promóter polimorfizmus nem jelent kockázati tényezőt a cervix carcinoma kialakulása szempontjából. További tanulmányokra lenne szükség annak vizsgálatára, hogy más földrajzi területeken a survivin promóter polimorfizmus szerepet játszik-e a cervikális karcinogenezisben.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. A HPV 16 E6 fehérje transzkripciósan aktiválta a survivin gén promóterét. Ez a hatás a p53 tumorszuppresszor fehérje jelenlétével összefüggésben van, mivel p53 negatív sejtvonalban nem érvényesült. A p53 kötésére és degradációjára képes HPV 16 E6 mutánsokat kódoló plazmidokkal folytatott transzkripciók kísérletekben a survivin promóterének fokozott transzaktiválását tapasztaltunk, míg a p53 kötő és degradáló képességében sérült HPV 16 E6 mutáns esetén nem vagy alig volt változás a survivin promóter aktivitásában.
2. A HPV 16 E7 onkoproteinnek, ellentétben az E6 fehérjével nem volt direkt hatása a survivin promóterre.
3. A HPV 16 mindkét onkogénje fokozott endogén survivin mRNS szintet eredményezett humán embrionális fibroblasztokban. Ez a hatása az E6/E7 onkogéneknek a sejtciklus valamennyi fázisában érvényesült, ugyanúgy, ahogy az E6 transzaktívációs hatása a survivin gén promóterére, amely a sejtciklusnak szintén mindegyik szakaszában kimutatható volt. Az E6 és az E7 endogén survivin mRNS szintre kifejtett hatása, valamint az E6 survivin promóterre gyakorolt transzaktiváló hatása sejtciklustól függetlenül alakult.
4. Survivin promóter CDE/CHR régióját (ATG kodonhoz viszonyítva –31 nukleotid pozíciót) érintő G/C variánsok genotípus megoszlása az általunk vizsgált méhnyakrákos, Papanicolaou osztályozás szerinti P3 diagnózisú, és kontroll populációban nem tér el statisztikailag szignifikáns mértékben. Megvizsgálva az érintett polimorfizmust a HPV fertőzöttséggel kapcsolatban, szintén nem találtunk összefüggést. A vizsgálati csoportjainkban végzett elemzés alapján a survivin promóter fent említett polimorfizmusa nem szerepel kockázati tényezőként a méhnyakrák kialakulása szempontjából.

SUMMARY

1. HPV 16 E6 oncoprotein is able to transactivate the human survivin promoter. This transactivation appeared to be largely dependent on the presence of the cellular tumour suppressor protein p53. Experiments with HPV 16 E6 mutant also indicated that transactivation of the survivin promoter by E6 is largely p53-dependent.
2. HPV 16 oncoprotein E7 had no direct effect on the promoter of the survivin gene.
3. HPV 16 E6 and/or E7 induced endogenous survivin transcription in human embryonic fibroblast cells. The effect of the E6 and E7 on the endogenous survivin mRNA level and the transactivation effect of E6 on survivin promoter are independent of the cell cycle.
4. There were no statistically significant differences in the genotype distributions of the genetic polymorphism located in the CDE/CHR repressor elements of the human survivin promoter (at the -31 nt relative to the ATG start codon). We could not find any correlation considering the polymorphism in connection with HPV infection. This survivin promoter polymorphism may not represent an increased risk for the development of cervical cancer, at least in our study population.

TÁRGYSZAVAK

humán papillomavírus (HPV) 16

onkoprotein E6, E7

p53 tumorsuppresszor fehérje

méhnyakrák

survivin

transzaktiválás

promóter

polimorfizmus

KEYWORDS

human papillomavirus (HPV) 16

oncoproteins E6, E7

p53 tumor suppressor protein

cancer of the uterine cervix

survivin

transactivation

promoter

polymorphism

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Veress György egyetemi docensnek, hogy kiváló szakmai vezetése alatt, elméleti és gyakorlati irányítása mellett készíthettem el ezen dolgozatot.

Külön szeretnék köszönetet mondani Dr. Gergely Lajos professzor úrnak, hogy az általa vezetett intézetben lehetőséget kínált PhD tanulmányaim elvégzésére.

Köszönöm kollégáimnak, Dr. Szarka Krisztinának, Dr. Kónya Józsefnek, Dr. Murvai Melindának, Csoma Eszternek és hallgatótársaimnak hasznos szakmai tanácsaikat, segítségüket és baráti támogatásukat.

Végül szeretnék köszönetet mondani Kissné Deák Andreának, Kissné Geréby Viktóriának, Rácz Péterné Áginak és Márton Józsefnek, munkacsoportunk asszisztenseinek a munkám során nyújtott segítségükért és gyakorlati tanácsaikért.

IRODALOMJEGYZÉK

Aguilar-Lemarroy,A., Gariglio,P., Whitaker,N.J., Eichhorst,S.T., zur,H.H., Krammer,P.H., and Rosl,F. (2002). Restoration of p53 expression sensitizes human papillomavirus type 16 immortalized human keratinocytes to CD95-mediated apoptosis. *Oncogene* 21, 165-175.

Alfandari,J., Shnitman,M.S., Jackman,A., Schlegel,R., Gonen,P., and Sherman,L. (1999). HPV16 E6 oncoprotein inhibits apoptosis induced during serum-calcium differentiation of foreskin human keratinocytes. *Virology* 257, 383-396.

Altieri,D.C. (2001). The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends in Molecular Medicine* 7, 542-547.

Altieri,D.C., Marchisio,P.C., and Marchisio,C. (1999). Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest* 79, 1327-1333.

Ambrosini,G., Adida,C., and Altieri,D.C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* 3, 917-921.

Baker,T.S., Newcomb,W.W., Olson,N.H., Cowser,L.M., Olson,C., and Brown,J.C. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.* 60, 1445-1456.

Barbosa,M.S., Edmonds,C., Fisher,C., Schiller,J.T., Lowy,D.R., and Vousden,K.H. (1990). The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J.* 9, 153-160.

Barbosa,M.S., Lowy,D.R., and Schiller,J.T. (1989). Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J. Virol.* 63, 1404-1407.

Branca,M., Giorgi,C., Santini,D., Di Bonito,L., Ciotti,M., Costa,S., Benedetto,A., Casolati,E.A., Favalli,C., Paba,P., Di Bonito,P., Mariani,L., Syrjanen,S., Bonifacio,D., Accardi,L., Zanconati,F., and Syrjanen,K. (2005). Survivin as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus and a predictor of virus clearance and prognosis in cervical cancer. *American Journal of Clinical Pathology* 124, 113-121.

Burd,E.M. (2003). Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 1-17.

Carter,B.Z., Milella,M., Altieri,D.C., and Andreeff,M. (2001). Cytokine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia. *Blood* 97, 2784-2790.

Cason,J., Kaye,J.N., Jewers,R.J., Kambo,P.K., Bible,J.M., Kell,B., Shergill,B., Pakarian,F., Raju,K.S., and Best,J.M. (1995). Perinatal infection and persistence of human papillomavirus types 16 and 18 in infants. *J. Med. Virol.* 47, 209-218.

Crook,T., Tidy,J.A., and Vousden,K.H. (1991). Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell* 67, 547-556.

- Cuconati,A. and White,E. (2002). Viral homologs of BCL-2: role of apoptosis in the regulation of virus infection. *Genes Dev.* *16*, 2465-2478.
- Deacon,J.M., Evans,C.D., Yule,R., Desai,M., Binns,W., Taylor,C., and Peto,J. (2000). Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. *Br. J. Cancer* *83*, 1565-1572.
- Dell,G. and Gaston,K. (2001). Human papillomaviruses and their role in cervical cancer. *Cell Mol. Life Sci.* *58*, 1923-1942.
- Desaintes,C. and Demeret,C. (1996). Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin. Cancer Biol.* *7*, 339-347.
- Deveraux,Q.L., Takahashi,R., Salvesen,G.S., and Reed,J.C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* *388*, 300-304.
- Doorbar,J., Ely,S., Sterling,J., McLean,C., and Crawford,L. (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* *352*, 824-827.
- Doorbar,J., Parton,A., Hartley,K., Banks,L., Crook,T., Stanley,M., and Crawford,L. (1990). Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology* *178*, 254-262.
- Duensing,S., Duensing,A., Crum,C.P., and Munger,K. (2001). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res.* *61*, 2356-2360.
- Duensing,S., Lee,L.Y., Duensing,A., Basile,J., Piboonniyom,S., Gonzalez,S., Crum,C.P., and Munger,K. (2000). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 10002-10007.
- Finzer,P., Aguilar-Lemarroy,A., and Rosl,F. (2002). The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis. *Cancer Lett.* *188*, 15-24.
- Fortugno,P., Wall,N.R., Giodini,A., O'Connor,D.S., Plescia,J., Padgett,K.M., Tognin,S., Marchisio,P.C., and Altieri,D.C. (2002). Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J. Cell Sci.* *115*, 575-585.
- Frost,M., Jarboe,E.A., Orlicky,D., Gianani,R., Thompson,L.C., Enomoto,T., and Shroyer,K.R. (2002). Immunohistochemical localization of survivin in benign cervical mucosa, cervical dysplasia, and invasive squamous cell carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* *117*, 738-744.
- Fukuda,S. and Pelus,L.M. (2001). Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34(+) cells by hematopoietic growth factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis. *Blood* *98*, 2091-2100.
- Funk,W.D., Pak,D.T., Karas,R.H., Wright,W.E., and Shay,J.W. (1992). A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol. Cell Biol.* *12*, 2866-2871.

- Gianani,R., Jarboe,E., Orlicky,D., Frost,M., Bobak,J., Lehner,R., and Shroyer,K.R. (2001). Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. *Hum. Pathol.* 32, 119-125.
- Giri,I. and Yaniv,M. (1988). Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *EMBO J.* 7, 2823-2829.
- Gravitt,P.E., Peyton,C.L., Alessi,T.Q., Wheeler,C.M., Coutlee,F., Hildesheim,A., Schiffman,M.H., Scott,D.R., and Apple,R.J. (2000). Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 38, 357-361.
- Halbert,C.L., Demers,G.W., and Galloway,D.A. (1991). The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J. Virol.* 65, 473-478.
- Hattori,M., Sakamoto,H., Satoh,K., and Yamamoto,T. (2001). DNA demethylase is expressed in ovarian cancers and the expression correlates with demethylation of CpG sites in the promoter region of c-erbB-2 and survivin genes. *Cancer Lett.* 169, 155-164.
- Hoffman,W.H., Biade,S., Zilfou,J.T., Chen,J., and Murphy,M. (2002). Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J. Biol. Chem.* 277, 3247-3257.
- Howley,P.M. (1996). Papillomaviruses. In *Fields Virology*, H.P.ed.Knipe DM, ed. (Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins: pp. 2197-2230.
- Islam,A., Kageyama,H., Takada,N., Kawamoto,T., Takayasu,H., Isogai,E., Ohira,M., Hashizume,K., Kobayashi,H., Kaneko,Y., and Nakagawara,A. (2000). High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* 19, 617-623.
- Kim,H.S., Shiraki,K., and Park,S.H. (2002). Expression of survivin in CIN and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Anticancer Res.* 22, 805-808.
- Klingelhutz,A.J., Foster,S.A., and McDougall,J.K. (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380, 79-82.
- Konya,J., Veress,G., Juhasz,A., Szarka,K., Sapy,T., Hernadi,Z., and Gergely,L. (2000). Additional human papillomavirus types detected by the hybrid capture tube test among samples from women with cytological and colposcopic atypia. *J. Clin. Microbiol.* 38, 408-411.
- LaCasse,E.C., Baird,S., Korneluk,R.G., and MacKenzie,A.E. (1998). The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17, 3247-3259.
- Lee,J.P., Chang,K.H., Han,J.H., and Ryu,H.S. (2005). Survivin, a novel anti-apoptosis inhibitor, expression in uterine cervical cancer and relationship with prognostic factors. *Int. J. Gynecol. Cancer* 15, 113-119.
- Leman,J.A. and Benton,E.C. (2000). Verrucas. Guidelines for management. *Am. J. Clin. Dermatol.* 1, 143-149.

- Li,F. and Altieri,D.C. (1999). Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochem. J.* 344 Pt 2, 305-311.
- Li,F., Ambrosini,G., Chu,E.Y., Plescia,J., Tognin,S., Marchisio,P.C., and Altieri,D.C. (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396, 580-584.
- Lohr,K., Moritz,C., Contente,A., and Dobbelstein,M. (2003). p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. *J. Biol. Chem.* 278, 32507-32516.
- May,P. and May,E. (1999). Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 18, 7621-7636.
- Mirza,A., McGuirk,M., Hockenberry,T.N., Wu,Q., Ashar,H., Black,S., Wen,S.F., Wang,L., Kirschmeier,P., Bishop,W.R., Nielsen,L.L., Pickett,C.B., and Liu,S. (2002). Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 21, 2613-2622.
- Munger,K., Basile,J.R., Duensing,S., Eichten,A., Gonzalez,S.L., Grace,M., and Zacny,V.L. (2001). Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20, 7888-7898.
- Munger,K. and Howley,P.M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 89, 213-228.
- Munger,K., Phelps,W.C., Bubb,V., Howley,P.M., and Schlegel,R. (1989). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* 63, 4417-4421.
- Murvai,M., Borbély,A.A., Kónya,J., Gergely,L., and Veress,G. (2004). Effect of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes on the activity of the transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2) promoter. *Arch. Virol.* *submitted*.
- Nees,M., Geoghegan,J.M., Munson,P., Prabhu,V., Liu,Y., Androphy,E., and Woodworth,C.D. (2000). Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins inhibit differentiation-dependent expression of transforming growth factor-beta2 in cervical keratinocytes. *Cancer Res.* 60, 4289-4298.
- O'Connor,M.J., Tan,S.H., Tan,C.H., and Bernard,H.U. (1996). YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J. Virol.* 70, 6529-6539.
- Park,P., Copeland,W., Yang,L., Wang,T., Botchan,M.R., and Mohr,I.J. (1994). The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 8700-8704.
- Pfister,H. and Fuchs,P.G. (1994). Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirol* 37, 143-149.
- Pizem,J., Cor,A., and Gale,N. (2004). Survivin expression is a negative prognostic marker in laryngeal squamous cell carcinoma and is associated with p53 accumulation. *Histopathology* 45, 180-186.

- Punga,T. and Akusjarvi,G. (2003). Adenovirus 2 E1B-55K protein relieves p53-mediated transcriptional repression of the survivin and MAP4 promoters. *FEBS Lett.* 552, 214-218.
- Rapp,L. and Chen,J.J. (1998). The papillomavirus E6 proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1378, F1-19.
- Roda Husman,A.M., Walboomers,J.M., van den Brule,A.J., Meijer,C.J., and Snijders,P.J. (1995). The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 4), 1057-1062.
- Sakai,H., Yasugi,T., Benson,J.D., Dowhanick,J.J., and Howley,P.M. (1996). Targeted mutagenesis of the human papillomavirus type 16 E2 transactivation domain reveals separable transcriptional activation and DNA replication functions. *J. Virol.* 70, 1602-1611.
- Schneider,A. (1994). Natural history of genital papillomavirus infections. *Intervirol* 37, 201-214.
- Shah,K.V.H.P.M. (1996). Papillomaviruses. In *Fields Virology*, K.D.H.P.e.Fields BN, ed. (Philadelphia, Lippincott-Raven: pp. 2077-2109.
- Shi,Y., Lee,J.S., and Galvin,K.M. (1997). Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1..... *Biochim. Biophys. Acta* 1332, F49-F66.
- Solomon,D., Davey,D., Kurman,R., Moriarty,A., O'Connor,D., Prey,M., Raab,S., Sherman,M., Wilbur,D., Wright,T., Jr., and Young,N. (2002). The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287, 2114-2119.
- Sommer,K.W., Schamberger,C.J., Schmidt,G.E., Sasgary,S., and Cerni,C. (2003). Inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin is upregulated by oncogenic c-H-Ras. *Oncogene* 22, 4266-4280.
- Song,Z., Yao,X., and Wu,M. (2003). Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 23130-23140.
- Stoppler,H., Hartmann,D.P., Sherman,L., and Schlegel,R. (1997). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins dissociate cellular telomerase activity from the maintenance of telomere length. *J. Biol. Chem.* 272, 13332-13337.
- Tamm,I., Wang,Y., Sausville,E., Scudiero,D.A., Vigna,N., Oltersdorf,T., and Reed,J.C. (1998). IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* 58, 5315-5320.
- Tan,S.H., Leong,L.E., Walker,P.A., and Bernard,H.U. (1994). The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *J. Virol.* 68, 6411-6420.
- Thomas,M. and Banks,L. (1999). Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J. Gen. Virol.* 80 (Pt 6), 1513-1517.

- Thomas,M., Kalita,A., Labrecque,S., Pim,D., Banks,L., and Matlashewski,G. (1999a). Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol. Cell Biol.* *19*, 1092-1100.
- Thomas,M., Pim,D., and Banks,L. (1999b). The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* *18*, 7690-7700.
- Turek,L.P. (1994). The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer. *Adv. Virus Res.* *44*, 305-356.
- Verdecia,M.A., Huang,H., Dutil,E., Kaiser,D.A., Hunter,T., and Noel,J.P. (2000). Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 602-608.
- Xu,Y., Fang,F., Ludewig,G., Jones,G., and Jones,D. (2004). A mutation found in the promoter region of the human survivin gene is correlated to overexpression of survivin in cancer cells. *DNA Cell Biol.* *23*, 527-537.
- Yamada,T., Manos,M.M., Peto,J., Greer,C.E., Munoz,N., Bosch,F.X., and Wheeler,C.M. (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J. Virol.* *71*, 2463-2472.
- Yoshida,H., Sumi,T., Hyun,Y., Nakagawa,E., Hattori,K., Yasui,T., Morimura,M., Honda,K., Nakatani,T., and Ishiko,O. (2003). Expression of survivin and matrix metalloproteinases in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Oncol. Rep.* *10*, 45-49.
- Zhang,T., Otevrel,T., Gao,Z., Gao,Z., Ehrlich,S.M., Fields,J.Z., and Boman,B.M. (2001). Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res.* *61*, 8664-8667.
- Zhao,J., Tenev,T., Martins,L.M., Downward,J., and Lemoine,N.R. (2000). The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J. Cell Sci.* *113 Pt 23*, 4363-4371.
- Zhou,J., Sun,X.Y., Stenzel,D.J., and Frazer,I.H. (1991). Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology* *185*, 251-257.
- zur Hausen H. (1996). Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta* *1288*, F55-F78.
- zur Hausen,H. and de Villiers,E.M. (1994). Human papillomaviruses. *Annu. Rev. Microbiol.* *48*, 427-447.
- Zwicker,J., Lucibello,F.C., Wolfrain,L.A., Gross,C., Truss,M., Engeland,K., and Muller,R. (1995). Cell cycle regulation of the cyclin A, cdc25C and cdc2 genes is based on a common mechanism of transcriptional repression. *EMBO J.* *14*, 4514-4522.

Az értekezésben felhasznált közlemények

- I **Ágnes A. Borbély**, Melinda Murvai, József Kónya, Zoltán Beck, Lajos Gergely, Fengzhi Li, and György Veress
Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression.
J. Gen. Virol., Feb 2006; 87: 287-294. IF: 3,221
- II **Ágnes A Borbély**, Melinda Murvai, Krisztina Szarka, József Kónya, Lajos Gergely, Zoltán Hernádi, and György Veress
Survivin promoter polymorphism and cervical carcinogenesis.
J. Clin. Pathol., May 2006; (online) IF: 2,619

Egyéb közlemények

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- β 2 (TGF- β 2) promoter.
Arch. Virol., Dec 2004; 149: 2379-2392. IF: 1,841

Fontosabb előadások, poszterek

Borbély Ágnes Anikó, Szarka Krisztina, Veress György, Murvai Melinda, Gergely Lajos:
A humán papillomavírus 16 E6 intratípusos variánsok hatása a p53 tumorszuppresszor fehérje izoformáira
Magyar Mikrobiológiai Társaság 2001. évi Jubileumi Nagygyűlése, 2001. október 10-12., Balatonfüred

Ágnes Anikó Borbély, Melinda Murvai, György Veress, Lajos Gergely, Krisztina Szarka:
Biological effects of the intratypic variants of the human papillomavirus type 16 (HPV16) E6 oncoprotein
20th International Papillomavirus Conference, 2002. október 4-9., Párizs

Ágnes Anikó Borbély, Melinda Murvai, Lajos Gergely, György Veress:

Effect of the oncoproteins of human papillomavirus (HPV) type 16 on the transcriptional activity of the survivin gene

14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, 2003. október 9-11., Balatonfüred

Borbély Ágnes Anikó, Murvai Melinda, Gergely Lajos, Veress György:

A humán papillomavírus 16 (HPV 16) E6 és E7 onkogénjének hatása a survivin gén expressziójára

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

Ágnes Anikó Borbély, Melinda Murvai, Lajos Gergely, György Veress:

Relationship between survivin promoter polymorphism and human papillomavirus associated cervical carcinoma

A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2005. évi Nagygyűlése és a 1st Central European Forum for Microbiology (CEFOM), 2005. október 26-28., Keszthely

FÜGGELÉK