

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

A humán papillomavírus (HPV) 31 egyes genomi régióinak filogenetikai és funkcionális vizsgálata

Ferenczi Annamária

Témavezető: Dr. Veress György



DEBRECENI EGYETEM

Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2016

BEVEZETÉS

Napjainkban a humán papillomavírus (HPV) fertőzés az egyik leggyakoribb szexuális úton terjedő betegség világszerte. A méhnyakrák a nők második leggyakoribb rákos megbetegedése, mely esetek döntő többségében a perzisztens HPV fertőzés bizonyult a legfontosabb etiológiai ágensnek; Magyarországon is a vezető egészségügyi problémák közé tartozik. Mintegy 200 HPV típust írtak le napjainkig, melyeknek körülbelül az egyharmada az anogenitális traktust fertőzi, de megtalálhatóak a száj-, a légutak és az emésztőtraktus nyálkahártyáján kialakuló tumorokban is. Onkogén potenciáljuk szempontjából megkülönböztetünk alacsony kockázatú (low risk) - például HPV 6, 11, 44, 55, 74 - és magas kockázatú (high risk) papillomavírusokat, mint például a HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45. Az alacsony kockázatú HPV-k főleg benignus elváltozásokból mutathatók ki, mint a condyloma acuminatum, genitális papillomák, légzőszervi, szájüregi és conjunctiva infekciók, míg a magas kockázatú HPV típusok gyakran okoznak invazív rákos elváltozásokat.

A papillomavírusok (PV) a *Papillomaviridae* családba tartozó, kisméretű (~55nm), lipoprotein burokkal nem rendelkező, ikozahedrális szimmetriájú, duplaszálú, cirkuláris DNS vírusok. A kapszid két strukturális proteint is tartalmaz: az erősen konzervált major kapszid proteint (L1), illetve a kevésbé konzervatív minor kapszid proteint (L2). A teljes genom kb. 8000 bp nagyságú, mely három részre tagolódik: a 4,5 kb nagyságú korai gének (E1-E7) régiójára, mely a vírus replikációjához szükséges korai fehérjéket kódolja; a 3 kb nagyságú késői gének (L1 és L2) régiójára, valamint e két szakasz között található az LCR (long control region), mely 500-1000 bp-ból áll és fontos szerepet játszik a vírális DNS replikációjában és transzkripciójában.

A HPV-eket kifejezett sejttropizmus jellemzi, az epitélium proliferáló, bazális sejtjeit fertőzik. A humán papillomavírusok életsiklusa szorosan összefügg a keratinocita gazdasejt differenciálódási programjával. A papillomavírus fertőzés nem lítikus, az újonnan képződött virionok együtt távoznak az elhalt hámsejtekkel.

A magas rizikó-faktorú papillomavírusok daganatkeltő hatásáért az E6 és E7 onkogének a felelősek, illetve közvetetten az e két onkogén expresszióját szabályzó fő szabályzó régió (LCR). Az E6-tal kölcsönható fehérjék közül az E6 associated protein (E6AP), egy E3 ubiquitin ligáz volt az első, melyet azonosítottak. Az E6AP komplexet alkotva az E6-tal, képes megkötni más fehérjéket, mely kapcsolat a target fehérje ubiquitinálódásához és következményes proteaszóma mediált degradációjához vezet.

Hasonlóképpen, a Bak proapoptotikus fehérjéhez kötődve az E6 indukálja annak degradációját. Továbbá az E6 képes növelni a hTERT (humán telomeráz reverz transzkriptáz) promóter aktivitását is a Myc fehérjével asszociálódva.

Az E7 onkoprotein egy igen fontos funkciója, hogy képes az E2F-pRb represszor komplexben lévő retinoblasztóma (Rb) fehérjét kötni és degradációját indukálni. E represszor komplex, melyet az Rb, E2F és a járulékos p107 és p130 fehérjék alkotnak, a sejtek G1 fázisból S fázisba történő átlépését gátolja a sejtciklus során. Az E7 retinoblasztóma kötésének eredményeképpen szabaddá válik az E2F transzkripciós faktor, melynek hatására a sejtek átlépnek az S fázisba. Az E7 fehérje indukálja a pRb ubiquitin-proteaszóma útvonalon keresztül történő degradációját

Az LCR más néven URR (upstream regulatory region) nagy számban tartalmaz cisz-reszponzív elemet, melyek a virális gének expresszióját és replikációját szabályozzák. A PV-k vizsgálatai során négy olyan szekvencia elemet találtak, melyek minden papillomavírusban megtalálhatóak: a késői mRNS-ek poliadenilációs helye (pA), mely az LCR 5' végén található; az E1 kötőhely; az E2 palindrom felismerési szekvenciák; és az E6 gén promóterében található TATA box. Az LCR számos celluláris transzkripciós faktor kötőhelyet – AP1, cEBP, NF1, Oct-1, PEF-1, TEF-1, TEF-2, YY1, glukokortikoid receptor, progeszteron receptor- és virális fehérje (E2 és E1) kötőhelyet tartalmaz több ismétlődésben.

A HPV 16 és 18 típusok prevalenciája a legmagasabb világszerte a magas-kockázatú HPV-k közül, melyek az invazív méhnyakrákos esetek 55, illetve 15 százalékában kimutathatóak. Európában a HPV 16 után a HPV 31 prevalenciája a második helyen áll, míg a méhnyakrákos elváltozásokban detektálható HPV 31 típus a HPV 16 és 18 után a harmadik pozíciót tölti be. Világviszonylatban a HPV 31 az invazív méhnyakrákos esetek 4%-ában mutatható ki.

A humán papillomavírusok csoportosítása a magas konzerváltsági fokú L1 strukturális proteint kódoló ORF alapján történik; eltérő variánst akkor különböztetünk meg, ha az L1 szekvencia eltérés kevesebb, mint 2 %, illetve a nem-kódoló LCR szekvencia különbség nagyobb, mint 5 %. Korábbi tanulmányok szerint a HPV 16 természetes variánsai különböző hatással bírnak a p53 kötése és degradációjának indukálása, a p53 transzaktiváció gátlása, immortalizáció indukálása, keratinocita differenciáció gátlása és az apoptózis befolyásolása szemszögéből. Klinikai tanulmányok alapján a HPV 31 eltérő intratípusos variánsai (A, B, C) különböznek a perzisztáló képességük és a premalignus léziót okozó funkciójukban. Azokat a mechanizmusokat, amelyek a klinikai különbségeket okozzák a HPV 31 esetében még mindig tanulmányozzák. Az egyik lehetséges funkció, amely felelős lehet ezekért az eltérésekért, az

eltérő intratípusú HPV 31 LCR variánsok különböző transzkripciós aktivitása, ugyanis az LCR szabályozza az E6 és E7 onkogének transzkripcióját, ezáltal a megváltozott LCR transzkripciós aktivitás az onkogének expresszióját is befolyásolhatja, mely hatással lehet a vírus onkogenitására is. Egy másik lehetséges mechanizmus, amely a HPV 31 variánsok funkcionális különbségeit okozhatja azok az E6/E7 onkogénekben bekövetkező aminosav cserék, melyek hatással lehetnek a fehérjék funkciójára.

A HPV 16 és 18 természetes szekvencia variánsait széleskörűen tanulmányozták, mely variánsok biológiai és klinikai különbségeket mutatnak. A HPV 31 esetében a szekvencia variánsok detektálása világszerte napjainkban is folyik, viszont a variánsok funkcionális különbségeit eddig kevesen tanulmányozták. Ezért munkánk során a HPV 31 LCR, E6 és E7 régiók természetes szekvencia variánsait vizsgáltuk filogenetikai és funkcionális megközelítésből.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során a HPV 31 természetes variánsainak genetikai variabilitását, a különböző variánsok funkcionális különbségeit tanulmányoztam a vírus hosszú kódoló régióját (LCR), illetve az E6 és E7 onkogéneket kódoló régióit érintve, melyhez az alábbi célokat tűztem ki:

1. A klinikai mintákból származó HPV 31 LCR izolátumok genetikai variabilitásának vizsgálata, filogenetikai kapcsolataik felderítése.
2. A különböző intratípusba tartozó LCR variánsok transzkripciós aktivitásának vizsgálata, az aktivitás különbségeikért felelős nukleotid cserék detektálása a szabályzó régióon belül LCR deléciós mutánsok létrehozásával és funkcionális aktivitásuk tanulmányozásával.
3. A klinikai mintákból származó HPV 31 E6 és E7 izolátumok variabilitásának tanulmányozása DNS és aminosav szinten is, filogenetikai kapcsolataik felderítése.
4. A HPV 31 E6 és E7 intratípusos variánsok p53, illetve adenovírus E2 promóterek transzkripciós aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálata.
5. Az eltérő intratípusba tartozó E6 és E7 fehérjék celluláris p53 illetve Rb fehérjék *in vivo* degradációjára gyakorolt hatásainak vizsgálata.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Betegminták, DNS izolálás, HPV DNS kimutatás, tipizálás

Mintagyűjtés: 2005 és 2009 között 41 darab HPV 31 típusra pozitív, exfoliált sejteket tartalmazó mintát gyűjtöttünk be a Debreceni Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájáról. A mintákat olyan nőktől vették le, akiknél a kolposzkópos vizsgálat során premalignus vagy malignus elváltozást tapasztaltak. A nők átlag életkora 34,9 év volt (21,0-51,0). Az exfoliált sejtekből származó DNS izolálásához a High Pure Viral Nucleic Acid Kit-et használtunk követve a gyártó utasításait. A preparált DNS minőségét humán β -globin génre specifikus PCR módszerrel ellenőriztük (belső kontroll), míg a HPV fertőzés kimutatása az MY09-MY11-HMB01 L1 régióra specifikus konszenzus PCR technikával történt. A HPV-k tipizálása az amplimerek restrikciós analízisével (restriction fragment length polymorphism/RFLP) történt.

HPV 31 LCR, E6 and E7 amplifikáció

Az izolált betegmintákból a HPV 31 fő szabályzó régióját (LCR) illetve a két onkogénjét (E6, E7) specifikusan tervezett primerekkel sokszorosítottuk a további vizsgálatok elvégzéséhez. Az LCR szakasz amplifikálásához használt forward primer *KpnI* hasítási helyet, míg a reverz primer *HindIII* hasítási helyet tartalmaz. A PCR termékeket tisztítás után szekvenáltuk.

Filogenetikai analízis

MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 5 Software segítségével a HPV 31 LCR, illetve E6 és E7 onkogének szekvenciáiból multi szekvencia analízis, majd filogenetikai törzsfák készültek maximum likelihood (ML) módszerrel. A törzsfa megbízhatóságának ellenőrzésére bootstrap (500x) analízist végeztünk.

Plazmid konstrukciók

Reprezentatív HPV 31 LCR szekvencia variánsokat választottunk ki a filogenetikai törzsfák alapján minden intratípusból a funkcionális vizsgálatokhoz. A teljes LCR szakaszokat pGL2-Basic promóter nélküli luciferáz riporter vektorokba építettük be az amplifikációhoz szükséges primereken található *KpnI* és *HindIII* restrikciós enzim felismerő helyek segítségével. Az LCR Del 1 és Del 2 deléziós mutánsokat a teljes LCR inzerteket tartalmazó pGL2-Basic vektorokból nyertük. A Del 1 konstrukciókat *KpnI* és *RsrII* restrikciós enzimekkel, míg a Del 2 mutánsokat *KpnI* és *PmeI* enzimek segítségével hasítottuk, majd a

kivágott szakasz eltávolítása után a plazmidokat újraligáltuk. A Del 3 mutáns konstruktok az LCR 14-179 nukleotidjáig terjedő szakaszát *HindIII* restrikciós enzim felismerő helyeket tartalmazó primerekkel készültek. A tisztított PCR termékeket pGL2-Basic vektorba ligáltuk T4 DNA ligáz enzim segítségével. A HPV 31 E6, E7 illetve a HPV 16 E6 és E7 onkogének esetében az inzertek amplifikációját specifikus primerekkel végeztük el majd pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit felhasználásával, a gyártói utasításoknak megfelelően ligáltuk az inzerteket az expressziós vektorba. Az elkészült plazmid konstruktok inzertált DNS fragmentjeit két irányból történő szekvenálással ellenőriztük. A pAdE2luc vektor konstrukt adenovírus E2-t és luciferáz gént tartalmaz, míg a p53 luciferáz riporter vektor luciferáz gént és több kópia p53 kötőhelyet hordoz.

Sejtvonalak, transzfekció és luciferáz teszt

A C-33A, *méhnyakrák* eredetű epiteliális sejtvonalat, mely nem hordoz HPV DNS-t, DMEM tápfolyadékban tenyésztettük, 3×10^5 darab sejtet tettünk ki lyukanként 6 lyukú tenyésztő plate-re és növesztettük, amíg elérték a kb. 70%-os konfluenciát. A C33-A sejteket kalcium-foszfát módszerrel transzfektáltuk 2 μ g luciferáz riporter plazmid és 0.05 μ g pRL-TK Control Vector felhasználásával. A sejteket 24 óráig inkubáltuk, majd lecseréltük a transzfekciós mixet DMEM-re. A transzfekciót követő 48 óra múlva a sejteket lizáltuk lízis puffer hozzáadásával. A sejtlizátumok luciferáz aktivitásának a mérésére Dual Luciferase Reporter (DLR) Assay rendszert használtuk.

A HPV 31 E6 és E7 variánsok aktivitásának vizsgálatához HPV negatív, mellrák eredetű MCF-7 epithel sejteket DMEM-ben tenyésztettük. Transzfektáláshoz a 6 lyukú plate minden lyukára 5×10^5 darab sejtet tettünk és kb. 70 %-os fedettségig növesztettük őket. Az MCF-7 sejtek lipid mediált kotranszfekcióját Lipofectamine 2000 reagens használatával, 0,75 μ g expressziós vektor (E6, E7); 2 μ g riporter vector (p53, pAdE2) felhasználásával végeztük el. 5 óráig inkubáltunk a sejteken a transzfekciós mixet, majd lecseréltük a tápfolyadékot friss DMEM-re. 48 óra múlva a sejteket feltártuk lízis puffer segítségével, majd Luciferase Assay System felhasználásával lemértük a sejtlizátumok luciferáz aktivitását. A sejtek összfehérje mennyiségét Bradford-protein assay segítségével határoztuk meg, ezen értékekre standardizáltuk a luciferáz értékeket. Minden kísérletet legalább három, egymástól független ismétlésben elvégeztünk.

Az E6 és E7 gének stabil expressziójához MCF-7 sejtvonalat transzfektáltunk, melyhez 6 lyukú plate-re 5×10^5 darab sejtet tettünk ki lyukanként és kb. 75-80%-os konfluenciáig növesztettük. A transzfektálás a fentebb leírt, lipidmediált módszerrel zajlott

azzal a kivétellel, hogy ebben az esetben csak az expressziós vektorokkal transzfektáltunk. A transzfekciót követően 48 óra múlva a tápfolyadékot lecseréltük 600 µg/µl Geneticin tartalmú szelekciós DMEM-re és a sejteket ebben tenyésztettük legalább 3 hétig, amíg kisselektálódtak az E6 illetve E7 géneket expresszáló sejtek.

RNS izolálás és RT-PCR

A totál RNS-t Tri-Reagent alkalmazásával izoláltuk a stabilan transzfektált MCF-7 sejtekből a gyártói utasításoknak megfelelően. Az E6 és E7 mRNS expresszió vizsgálatához a reverz transzkripció reakciót 2 µg RNS mintából random hexamer oligonukleotidokkal a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit segítségével végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. A PCR reakcióhoz RedTaq DNA polymerase enzimet alkalmaztunk. A konstitutívan expresszálódó GAPDH detektálása szolgált kontrollként.

Fehérje izolálás és Western blot

A HPV 16 E6, E7 illetve a HPV 31 E6 és E7 fehérjék expressziójának vizsgálatára, illetve a celluláris p53 illetve retinoblasztoma fehérjékre kifejtett hatásának vizsgálatára a stabilan transzfektált MCF-7 sejteket a teljes celluláris fehérjetartalom izolálását végeztünk RIPA lízis pufferrel. A fehérjéket 10%-os SDS-poliakrilamid gélben elektroforézissel választottuk el Bio-Rad Mini Protean II készülék alkalmazásával. Ezt követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk, majd a membrán apecifikus kötő helyeit 5% tejport tartalmazó PBST oldattal blokkoltuk. Ezután a membránokat éjszakán át 4 °C-on vagy két órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk az 5% tejport tartalmazó PBST oldatban hígított elsődleges antitestekkel (egér monoklonális anti-p53, egér monoklonális anti-Rb, egér monoklonális anti-His, nyúl poliklonális anti-aktin). A membránokat 3×10 percig mostuk PBST-vel, majd 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a torna-peroxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel. Az immunreakciók detektálását nagy érzékenységű, kemilumineszcens detektáláson alapuló előhívó oldatokkal végeztük ChemiDoc MP készülék segítségével.

Statisztika

Varianciaanalízissel (ANOVA) határoztuk meg, hogy a vizsgált csoportban, alcsoportokban az LCR variánsoknak a transzkripció aktivitásában volt-e szignifikáns különbség. Párosított Student-féle t-tesztet használtunk a transzkripció aktivitások szignifikáns különbségeinek megállapításához az E6 és E7 variánsok, illetve a Western-blot eredmények kiértékelése esetén, melyben $p < 0,05$ volt.

EREDMÉNYEK

A HPV 31 LCR variánsok

A klinikai mintákból származó HPV 31 LCR variánsok szekvenciáinak vizsgálata

Az LCR régió közel teljes hosszúságú szakaszát (nt 7122-179) 41 darab HPV 31 pozitív klinikai mintából amplifikáltuk. Az LCR izolátumok a referencia 31 izolátumhoz (Genbank J04353) és egymáshoz képest is mutattak eltéréseket. 12 mintában találtunk egy 10 bázispáros deléciót (5'-CTATTTTATA-3') a 7299-7308 pozícióban, illetve egy minta esetében egy 6 bázispárból álló deléciót is detektáltunk. A deléciókat hordozó minták a B intratípusba tartoznak (lásd később). 35 olyan nukleotid cserét detektáltunk, melyek több mintában is megtalálhatóak voltak, ezekből kettő (G7326A és A7402G) volt egyedi nukleotid polimorfizmus, melyeket korábban még nem publikáltak. 7 minta esetében találtunk egyedi nukleotid cseréket, melyekből csak kettőt (A7517G és G7764A) írtak le más tanulmányokban. A korábban még nem publikált nukleotid változásokat, illetve az egyedi nukleotid cseréket hordozó klinikai minták (HU 7156, 7404, 7527, 7548, 7762, 8128 és 8265) amplifikálását és szekvenálását újra elvégezve erősítettük meg a nukleotid cserék jelenlétét.

A HPV 31 LCR filogenetikai vizsgálata

A filogenetikai törzsfák elkészítéséhez maximum likelihood (ML) algoritmust használtunk. A 41 klinikai mintából származó HPV 31 LCR izolátum és a referencia HPV 31 LCR alapján készített törzsfá elemzése során 3 intratípusba lehetett sorolni az izolátumokat, mely megállapítás megegyezik a korábban már leírt irodalmi adatokkal, melyeket Chen és munkatársai közöltek 2011-ben. Ezek alapján a HPV 31 intratípusokat *A*, *B* és *C* jelzésekkel látjuk el. Az azonos intratípusba tartozó variánsok közötti genetikai távolság kevesebb, mint 1%, amennyiben nagyobb, mint 1%, úgy a variánsok különböző intratípusba sorolandók. A maximális genetikai távolságot a HU 8128 és HU 8265 variánsok között detektáltuk, mely értéke 3,3% volt. Az *A* intratípust 2 variáns képviselte az általunk vizsgált magyarországi populációban, melyek 1-1 nukleotidban tértek el a referencia szekvenciához viszonyítva. A *B* intratípus két különböző variáns 12 izolátumából áll, melyek egy 10 bázispárból álló deléciót és 15 illetve 17 nukleotid cserét tartalmaznak a referencia izolátumhoz hasonlítva. A legnagyobb polimorfizmust mind mintaszámban, mind genetikai variabilitásban a *C* intratípus mutatta, melyet 10 különböző variáns 27 izolátuma képvisel, melyek 22-27 nukleotidcserét tartalmaznak.

A teljes hosszúságú LCR izolátumok transzkripció aktivitásának vizsgálata

Azzal a céllal, hogy kiderítsük, hogy mely nukleotid cserék okoznak az általunk vizsgált izolátumokban a referencia LCR szekvenciához képest eltérő transzkripció aktivitást, pGL2-Basic promóter nélküli luciferáz riporter vektorba klónoztunk reprezentatív, a filogenetikai törzsfa alapján kiválasztott HPV 31 LCR izolátumokat. A plazmid konstruktokat ezt követően két irányból történő szekvenálással ellenőriztük, hogy kizárhassuk az esetlegesen PCR során generálódott mutációkat, majd HPV negatív méhnyakrákos C33-A sejtvonalba transzfektáltuk a referencia LCR izolátum mellett. A luciferáz tesztek eredményei azt mutatják, hogy az eltérő intratípusba tartozó variánsoknak különbség van a transzkripció aktivitásában. A *B* illetve *C* intratípusba tartozó variánsok transzkripció aktivitása szignifikánsan magasabb volt ($p < 0,001$), mint a prototípus HPV 31 LCR aktivitás. Érdekes volt, hogy az *A* intratípusú referencia HPV 31 LCR aktivitása nem volt magasabb az üres pGL2 vektor aktivitásánál. További érdekes eredmény volt az is, hogy a *B* csoport variánsainak transzkripció aktivitása szignifikánsan magasabb volt, mint a *C* intratípus tagjaié ($p < 0,001$).

Azért, hogy lokalizálni tudjuk, hogy az LCR mely szakaszán lévő nukleotidcserék felelősek a variánsok transzkripció aktivitásbeli különbségeiért, deléciós mutánsokat hoztunk létre a meglévő, teljes hosszúságú LCR inzerteket hordozó konstruktok felhasználásával mindhárom intratípusból, majd C33-A sejteket transzfektáltunk a különböző hosszúságú LCR-deléciós mutánsokkal. Ellentétben a teljes hosszúságú LCR variánsok eltérő transzkripció aktivitásával, a HPV 31 Del 1 variánsok (7122-7415 deléció) relatív luciferáz aktivitásai között nem volt szignifikáns különbség. Ebből arra lehet következtetni, hogy azok a nukleotidcserék, amelyek a teljes hosszúságú LCR aktivitásbeli különbségeiért felelősek, az LCR ezen szakaszára (nt 7122-7415) lokalizálódnak. A különböző HPV 31 LCR Del 2 variánsok (7122-7792 deléció) transzkripció aktivitásaiban nem volt szignifikáns különbség, míg a HPV 31 Del 3 variánsok esetében a *C* intratípusba tartozó variáns relatív luciferáz aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt ($p < 0,01$), mint az *A* és *B* csoportú variánsoké. Ez a különbség a Del 3 mutánsok esetében azt jelzi, hogy a *C* intratípus minimal promóter régiójában található nukleotid cserék transzkripció aktivitás-csökkenést okoznak az *A* és *B* intratípushoz viszonyítva.

A HPV 31 E6 és E7 variánsok

A klinikai mintákból származó HPV 31 E6 és E7 variánsok szekvencia polimorfizmusának vizsgálata és filogenetikai kapcsolataik tanulmányozása

A HPV 31 referencia izolátumhoz (Genbank J04353) viszonyított Az E6 génben összesen 8 nukleotid változást azonosítottunk a referencia izolátumhoz képest, melyek közül 4 eredményezett aminosav cserét (H60Y, T64A, K123R, A138V) a referencia HPV 31 izolátum aminosav szekvenciájához viszonyítva. Az E7 onkogénben 5 bázis cserét detektáltunk, melyek közül 3 eredményezett aminosav cserét (H23Y, E46K, K62E).

Az összehasonlító filogenetikai vizsgálataink azt mutatták, hogy az egyes izolátumok mindkét régiót vizsgálva ugyanabba az intratípusba tartoznak, tehát a HPV 31 intratípusba történő besorolása úgy tűnik, hogy bármely régió alapján megtörténhet. Az LCR polimorfizmusához viszonyítva az E6/E7 fehérjét kódoló régiók nagyobb fokú konzerváltságot mutatnak.

A HPV 31 variánsok hatása a p53 transzkripció aktivitására

A magas kockázatú HPV típusok E6 fehérjéjének az egyik jelentős funkciója a p53 fehérje transzkripció aktivitásának gátlása. Azért, hogy megvizsgáljuk a HPV 31 természetes variánsainak ezt a funkcióját, tranziensen kotranszfektáltunk MCF-7 sejteket E6 variánsokat hordozó expressziós vektorokkal, illetve p53 riporter vektorral (p53-Luc), mely a p53 kötőhelyet több kópiában hordozza. Összehasonlításként a referencia HPV 31 E6 és a már jól ismert hatású HPV 16 E6 expressziós vektorokat is használtuk a kísérletben. A kontrollként használt üres pcDNA vektorhoz viszonyítva az A csoportba tartozó referencia HPV 31 E6 és a C intratípusba tartozó variáns (E6V2) szignifikánsan ($p < 0,001$) csökkentette a p53 promóter aktivitását, hasonlóan a HPV 16 E6-hoz. A B intratípusba tartozó variáns (E6V1) két különböző klónját (E6V1a és E6V1b) vizsgáltuk, melyeknek az aminosav szekvenciája megegyezik. A B csoportba tartozó variánsok esetében a p53 riporter luciferáz aktivitását gátló hatás mérsékeltebb volt ($p < 0,005$) az A és C intratípusú variánsokéhoz képest. Ez az eredmény azt jelzi, hogy a különböző intratípusba tartozó HPV 31 E6 variánsok eltérő funkcionális aktivitással bírnak.

A HPV 31 E7 variánsok E2F aktivitásra gyakorolt hatása

A magas rizikófaktorú HPV-k E7 onkoproteinjének egy jól ismert tulajdonsága, hogy képes kötődni a represszor komplexben lévő celluláris retinoblasztóma fehérjéhez, illetve annak társfehérjéihez, mely eredményeképpen a szabaddá váló E2F faktor aktiválódásával

indukálódik a sejtciklus. A HPV 31 E7 prototípus és az eltérő intratípusba tartozó E7 variánsok e funkcióját tranziens kotranszfekciós kísérletekben vizsgáltuk, mely során MCF-7 sejteket transzfektáltunk E7 expressziós vektorokkal és adenovírus E2 promóter riporter vektorral (pAd-E2F), mely E2F transzkripciós faktor kötőhelyeket tartalmaz. Viszonyításképpen a már jól ismert funkciójú HPV 16 E7 expressziós vektort használtuk a kísérletekben. Az eredményeink azt mutatják, hogy akárcsak a HPV 16 E7, a HPV 31 E7 különböző intratípusú variánsai is megemelik az E2F transzkripciós aktivitást a kontrollként használt üres pcDNA vektorhoz képest.

A HPV 31 E6 és E7 variánsok hatása a celluláris tumorszuppresszor fehérjékre

Azért, hogy tanulmányozni tudjuk a HPV 31 E6 és E7 variánsok hatását a celluláris p53 és Rb fehérjékre, olyan MCF-7 sejt vonalakat hoztunk létre stabil transzfekcióval, melyek expresszálják az E6 illetve E7 variánsokat. A transzfekció hatékonyságát mRNS és fehérje szinten is ellenőriztük, mely vizsgálatok alapján az E6 és E7 variánsok közel azonos szinten expresszálódtak mRNS és fehérje szinten egyaránt. Ezután megvizsgáltuk, hogy a HPV 31 E6 variánsok endogén p53 fehérjére kifejtett hatásában van-e különbség. Ehhez Western-blot analíziseket végeztünk, mely során monoklonális p53 ellenes antitesttel detektáltuk az endogén p53 szinteket. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy mindhárom intratípusba tartozó variánsok közel azonos mértékben képesek csökkenteni a p53 stabilitását.

Ezt követően megvizsgáltuk a HPV 31 E7 variánsok endogén retinoblasztóma fehérjére kifejtett hatását. Ehhez Western-blot kísérleteket végeztünk, melyben az Rb szintjét monoklonális anti-Rb antitesttel detektáltuk. Az eltérő intratípusú HPV 31 E7 variánsok retinoblasztóma fehérje degradációját indukáló hatásában nem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket. A HPV 16 E7 onkoprotein degradáló hatása kifejezettebb volt, mint a HPV 31 E7 variánsoké.

MEGBESZÉLÉS

Munkánk során magyarországi betegpopulációban vizsgáltuk a HPV 31 néhány fontosabb régiójának szekvencia variabilitását, illetve a variánsok funkcionális aktivitását. A HPV 16-ot követően a HPV 31 a második leggyakrabban előforduló típus az általunk vizsgált populációban. A HPV 16 és 18 esetében az intratípusos szekvencia variánsok biológiai és klinikai különbségeket mutatnak. A HPV 31 esetében a szekvencia variánsok funkcionális eltéréseit még kevesen tanulmányozták. Xi és munkatársai klinikai tanulmányai alapján a HPV 31 eltérő intratípusos variánsai (*A*, *B*, *C*) különböznek a perzisztáló képességük és a premalignus léziót okozó funkciójukban. Az egyik lehetséges funkció, amely felelős lehet ezekért az eltérésekért, az eltérő intratípusú HPV 31 LCR variánsok különböző transzkripciók aktivitása, ugyanis az LCR szabályozza az E6 és E7 onkogének transzkripcióját, ezáltal a megváltozott LCR transzkripciók aktivitás az onkogének expresszióját is befolyásolhatja, mely hatással lehet a vírus onkogenitására is. Egy másik lehetséges mechanizmus az E6/E7 onkogénekben bekövetkező aminosav cserék, melyek hatással lehetnek a fehérjék funkciójára.

Vizsgálatainkat a HPV 31 LCR szekvencia variabilitásának tanulmányozásával kezdtük. Más munkacsoportok korábban már vizsgálták a HPV 31 intratípusos szekvencia variánsait, viszont a HPV 31 természetes szekvencia variánsok funkcionális eltéréseit a legjobb tudásunk szerint a munkacsoportunk írta le először. Míg a korábbi tanulmányok többsége részleges LCR szekvenciákat vizsgált, egy tanulmányban elemeztek HPV 31 teljes genomi szekvenciákat, a munkacsoportunk csaknem a teljes hosszúságú LCR szakaszt tanulmányozta. A vizsgálataink során elemzett HPV 31 szekvencia variánsok polimorfizmusai összhangban vannak a korábbi tanulmányokban leírtakkal.

Az általunk vizsgált HPV 31 LCR szekvenciák alapján készült filogenetikai törzsfá nagyon hasonlít a teljes genomi szekvenciákat magában foglaló filogenetikai törzsfára, illetve a két tanulmányból származó izolátumok alapján készült törzsfá jól mutatja, hogy a világ eltérő részeiről származó izolátumok párhuzamosan klasztereződnek különböző intratípusos csoportokba. A HPV 16 és 18 esetén az intratípusos csoportokba történő besorolás etnikai és földrajzi eredet szerint történik. A HPV 31 esetében korábban hasonló, földrajzi intratípusos eloszlást írtak le, de ezt a későbbi tanulmányok nem támasztották alá. Kutatócsoportunk eredményei alapján sem lehet megerősíteni a HPV 31 variánsok földrajzi régiók szerinti megoszlását, ugyanis az általunk vizsgált magyarországi populációból származó HPV 31 variánsok mindhárom intratípusos csoportot (*A*, *B*, *C*) reprezentálták, ellentétben a korábban

Magyarországon izolált HPV 16 variánsokkal, melyek túlnyomóan Európai variánsok voltak, illetve néhány Ázsiai-Amerikai variánst is azonosítottak.

Az LCR, más néven URR (upstream regulatory region) a következő funkcionális doménekből épül fel: 5'URR domén, auxiliary enhancer domén (AE), egy epithel sejt specifikus keratinocyte enhancer domén (KE), replikációs origó és a p97 promóter. Az LCR kötőhelyeket tartalmaz a virális E1 és E2 proteinek számára, illetve számos celluláris transzkripciós faktor számára is, mint az AP1, NF1, YY1, Sp1, TEF-1, Oct-1 és a CDP/Cut. A HPV 31 LCR variánsok szekvencia analízise során nukleotid cseréket detektáltunk mindegyik funkcionális doménban, melyek a virális E2 illetve néhány celluláris transzkripciós faktor kötőhelyének a környezetében találhatóak. Ezek alapján ígéretesnek tűnt megvizsgálni a HPV 31 LCR variánsok transzkripciós aktivitását tranziens transzfekciós kísérletekben luciferáz riporter tesztek elvégzésével.

A teljes hosszúságú LCR konstruktok funkcionális elemzése alapján arra lehetett következtetni, hogy a különböző intratípusos vonalba tartozó HPV 31 LCR variánsok transzkripciós aktivitásában különbségek vannak. Az A intratípusba tartozó teljes hosszúságú referencia HPV 31 LCR alacsony aktivitást mutatott az üres, pGL2-Basic riporter vektorhoz viszonyítva a C33-A sejtekben. Ennek az lehet a magyarázata, hogy az általunk használt riporter konstruktkban a transzkripciós silencer elemek ellensúlyozzák az enhancer régiók HPV 31 LCR aktivitásra kifejtett hatását. Ezen túl különböző genitális papillomavírusok esetén megfigyelték, hogy egy - a virális E1 fehérjével átfedő – konzervált silencer elem az epithel-specifikus enhancer és az E6 promóter között helyezkedik el, így a folyamatos enhancer-promóter konstruktok, melyek ezt a silencert hordozzák, alacsony transzkripciós aktivitással rendelkeznek ezen HPV-k esetében. A B és C intratípusba tartozó HPV 31 LCR variánsok transzkripciós aktivitása szignifikánsan magasabb volt, mint a prototípus LCR aktivitás, jóllehet ezek a variánsok is hordozzák a konzervatív silencer elemet. Ezek alapján arra lehet következtetni, hogy a prototípushoz képest ezekben a variánsokban olyan nukleotid cserék találhatóak, amelyek szignifikánsan megváltoztatják a transzkripciós faktorok kötődését és/vagy aktivitását.

A teljes hosszúságú LCR szakaszok transzkripciós aktivitásának vizsgálati eredményei alapján deléciós mutánsokat hoztunk létre a HPV 31 LCR konstruktokból, reprezentálva mindhárom intratípust. Azt, hogy mely nukleotidcserék okozzák a különböző LCR variánsok transzkripciós aktivitásbeli különbségeit, igen nehéz meghatározni. Ezeket a különbségeket okozhatják részben az 5'URR régióban (nt 7122-7415) található báziscserék, másrészt azok a nukleotidcserék, amelyek a minimal promóter régióban találhatóak, ugyanis az A és C

intratípusba tartozó variánsokhoz képest a C csoport variánsai - melyek nukleotidcseréket hordoznak e régióban - szignifikánsan ($p < 0,01$) alacsonyabb aktivitást mutattak. Jelen vizsgálataink azt mutatják, hogy az azonos filogenetikai vonalba tartozó HPV 31 variánsok hasonló transzkripciós aktivitással rendelkeznek. A teljes hosszúságú LCR variánsok funkcionális vizsgálatai alapján úgy tűnik, hogy az eltérő intratípusba tartozó variánsok transzkripciós aktivitásai között szignifikáns különbségek vannak. Ezek alapján feltételezhető, hogy a HPV 31 variánsok filogenetikai klasztereződése és némely funkcionális tulajdonsága között korreláció van. Ezen eredményeket alátámasztva, korábbi kutatásokban leírták, hogy a HPV 16 és 18 esetén, az eltérő intratípusba tartozó LCR variánsok transzkripciós aktivitásai között is vannak különbségek. Az ázsiai-amerikai és az észak-amerikai HPV 16 variánsok magasabb transzkripciós aktivitással bírnak, mint az európai variánsok. Hasonlóképpen a HPV 18 esetében is az ázsiai-amerikai variánsok magasabb transzkripciós aktivitással rendelkeznek, mint az európai variánsok.

A HPV 31 esetében még ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre a különböző intratípusba tartozó variánsok perzisztenciáját és onkogén potenciálját illetően. A HPV 31 klinikai viselkedésének tanulmányozása a viszonylag kisszámú HPV 31 pozitív eset miatt kissé nehezebb. Mindazonáltal a funkcionális különbségek, melyeket a széleskörűen használt C33-A méhnyakrákos sejt-modell rendszeren vizsgálva tapasztaltunk, arra engednek következtetni, hogy az eltérő intratípusos csoportba tartozó HPV 31 variánsok különbözően hatnak a méhnyak karcinogenezisében résztvevő egy vagy több transzkripciós szabályzó mechanizmusban.

Kutatásaink során a HPV 31 E6 és E7 onkogének természetes variánsainak a filogenetikai és funkcionális vizsgálatát is célba vettük. A munkánk során detektált nukleotid és aminosav cserék azonosak a korábban más kutatócsoportok által publikáltakkal. Ahogyan az várható volt, a nukleotid polimorfizmus magasabb volt a nem kódoló LCR szekvenciákban, mint a fehérjét kódoló E6 és E7 régiók esetében. Összehasonlítva a HPV 31 LCR, illetve E6/E7 szekvenciák alapján készített filogenetikai törzsfákat arra a következtetésre jutottunk, hogy e genomi régiók bármelyike alkalmas arra, hogy egy HPV 31 izolátumot intratípusba (A, B, C) tudjunk sorolni.

A HPV 31 E7 variánsok funkcionális vizsgálatait azzal kezdtük, hogy teszteltük az E7-nek azt a funkcióját, mellyel a pRb-vel és járulékos fehérjéivel represszor komplexben lévő E2F transzkripciós faktort képes felszabadítani. Továbbá megvizsgáltuk az E7 variánsok *in vivo* retinoblasztóma fehérje degradációt indukáló képességét is. Munkánk során nem találtunk szignifikáns különbségeket a HPV 31 E7 variánsok között az elvégzett funkcionális

vizsgálatok alapján. Természetesen más, celluláris vagy molekuláris funkcióikban (például különféle celluláris fehérjékhez történő kötődés, vagy a gazdasejt immortalizációjának kiváltása) lehetnek eltérések, melyek a későbbiekben további tanulmányok alapjául szolgálhatnak.

A HPV 31 E6 variánsok szekvenciáinak vizsgálata során találtunk aminosav cseréket a fehérje mind az N-terminális, mind a C-terminális cink-ujj régiójában. A HPV 31 E6-tal közeli rokonságban álló HPV 16 E6 fehérje e két cink-ujj régiójának számos funkcióját vizsgálták, melyek alapján ígéretesnek tűnt a HPV 31 E6 variánsok funkcionális vizsgálatait elkezdeni. Ebből a célból a magas rizikófaktorú HPV E6 fehérjék egy már jól ismert funkcióját vizsgáltuk a HPV 31 E6 variánsok esetében: a p53 tumorszuppresszor transzaktivátor funkcióját gátló, illetve a p53 degradációját indukáló hatásait. Vande Pol és Klingelhutz 2013-ban a HPV 16 E6 mutáns fehérjék vizsgálatai során megállapították, hogy az E6 e két aktivitása többé-kevésbe elválasztható egymástól.

Stabilan transzfektált MCF-7 sejtvonalakon *in vivo* tanulmányoztuk a HPV 31 E6 variánsok p53 degradációs aktivitását, mely kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy a HPV 31 E6 prototípus p53 degradációt indukáló hatása mérsékeltebb volt a HPV 16 E6 hatásához képest. Eredményeinket Mesplede és munkatársai 2012-es tanulmánya is alátámasztja, melyben különböző HPV típusok E6 fehérjéinek p53 degradációs aktivitását vizsgálták, mely aktivitások eltérőek voltak az egyes HPV típusok esetében. A különböző intratípusú HPV 31 E6 variánsok *in vivo* p53 degradációs aktivitásában nem találtunk szignifikáns különbségeket.

Munkánk során tanulmányoztuk a különböző intratípusú HPV 31 E6 variánsok p53 proapoptotikus fehérje transzkripció transzaktivátor funkciójára kifejtett gátló hatását is. Eredményeink azt mutatják, hogy bár az E6 variánsok *in vivo* p53 degradációs aktivitásában nem volt szignifikáns eltérés, a p53 transzaktivátor funkcióját gátló hatásukban különbségeket mutattak az eltérő intratípusú variánsok. Hasonlóan a HPV 16 E6-hoz, a HPV 31 E6 prototípus, mely az A intratípusba tartozik, illetve a C intratípusba tartozó variáns (E6V2) csökkentették a p53 transzkripció aktivitását, míg a B intratípus variánsai (E6V1a, E6V1b) csak mérsékelt gátló hatással rendelkeztek. A HPV 31 LCR variánsok transzkripció aktivitásának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy azok az LCR variánsok, melyek a B intratípusba tartoznak, magasabb transzkripció aktivitást mutattak, mint az A és C intratípus variánsai. Ez a jelenség egy kompenzációs mechanizmus lehet, ugyanis a papillomavírusok LCR szakasza fontos szerepet játszik a vírus génextpressziójának és replikációjának szabályozásában.

Ezen funkcionális vizsgálatok eredményei nincsenek teljesen összhangban az olyan jellegű epidemiológiai vizsgálatokkal, amelyekben a HPV 31 variánsok klinikai viselkedését vizsgálták. Xi és munkatársai (2012, 2013, 2014) tanulmányai alapján az *A* és *B* intratípusokba tartozó variánsok nagyobb eséllyel okoznak premalignus elváltozásokat, mint a *C* csoport variánsai. Az epidemiológiai és molekuláris adatok eltérése indokoltá teszi a HPV 31 E6 és E7 fehérjék további funkcionális vizsgálatát, melyek ezen fehérjék szerteágazó molekuláris mechanizmusaira – kötődés celluláris proteinekhez (p53, E6AP), primer keratinocita immortalizációt okozó hatás, a gazdasejt differenciációt és az apoptózist moduláló hatás - is fényt deríthetnek.

ÖSSZEFOGLALÁS

A humán papillomavírusok (HPV) mintegy harmada az anogenitális traktust fertőzi. A magas rizikófaktorú HPV típusok (16, 18, 31, 33, 35 stb.) tehetőek felelőssé a méhnyakrák kialakulásáért. Az E6/E7 valamint az LCR genomi régiókban bekövetkező nukleotidcserék megváltozott transzkripciósi aktivitást és/vagy megváltozott onkogén potenciált eredményezhetnek, mindez pedig egy lehetséges mechanizmus arra, hogy a HPV intraípusos variánsok viselkedésében eltérések mutatkozzanak.

Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk az eddig kevésbé tanulmányozott magas kockázatú HPV 31 LCR, E6 és E7 régióinak genetikai polimorfizmusát egy magyarországi populációban, illetve hogy a variánsok esetleges funkcionális különbségeit detektáljuk. Munkánk során premalignus illetve malignus elváltozásokból származó klinikai mintákkal dolgoztunk. A filogenetikai vizsgálatok alapján három intratípusba (A, B, C) sorolhatók az izolátumok, mely besorolást mind az LCR, mind az E6/E7 régiók alapján el lehet végezni. Nukleotid polimorfizmus szempontjából az LCR bizonyult variábilisabbnak szemben az E6 és E7 régiókkal, melyek fehérjét kódolnak. Szignifikáns különbségeket találtunk az eltérő intratípusos csoportba tartozó HPV 31 LCR variánsok transzkripciósi aktivitásában. Deléciók mutánsokkal végzett kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy az egyes LCR variánsok aktivitás különbségeiért részben az LCR 5', részben pedig 3' szakaszán (minimal promoter region) található nukleotidcserék a felelősek.

A különféle E6 és E7 variánsokat expressziós vektorba klónozva vizsgáltuk azok hatását p53 illetve adenovírus E2 promóterekre, valamint teszteltük az E6 és E7 variánsok *in vivo* p53 illetve pRb degradációját indukáló hatását. Az eltérő intratípusba tartozó HPV 31 E7 variánsok, akár csak a HPV 16 E7 prototípus, megemelték a pAdE2 promóter aktivitását. Az E6 variánsok esetében különbségeket találtunk a variánsok p53 transzaktivációját gátló hatásában, az A és C intratípusba tartozó variánsok csökkentették a p53 aktivitást, hasonlóan a kontrollként használt HPV 16 E6-hoz, a B csoportba tartozó variánsok hatása a p53 aktivitására mérsékeltebb volt. A különböző HPV 31 E6/E7 intratípusos variánsok *in vivo* p53/Rb degradációs aktivitásában nem találtunk szignifikáns különbségeket. További érdekesség, hogy a B intratípusba tartozó LCR variánsok nagyobb transzkripciósi aktivitást mutattak, mint az A illetve C intratípusos variánsok.



Nyilvántartási szám: DEENK/234/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Ferenczi Annamária
Neptun kód: Q1ZTA0
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Ferenczi, A.**, Gyöngyösi, E., Szalmás, A., László, B., Kónya, J., Veress, G.: Phylogenetic and functional analysis of sequence variation of human papillomavirus type 31 E6 and E7 oncoproteins.
Infection, Genetics and Evolution. 43, 94-100, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.020>
IF: 2.591 (2015)
2. **Ferenczi, A.**, Gyöngyösi, E., Szalmás, A., Hernádi, Z., Tóth, Z., Kónya, J., Veress, G.: Sequence variation of human papillomavirus Type 31 long control region: phylogenetic and functional implications.
J. Med. Virol. 85 (5), 852-859, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.23542>
IF: 2.217

További közlemények

3. László, B., **Ferenczi, A.**, Madar, L., Gyöngyösi, E., Szalmás, A., Szakács, L., Veress, G., Kónya, J.: CpG methylation in human papillomavirus (HPV) type 31 long control region (LCR) in cervical infections associated with cytological abnormalities.
Virus Genes. 52 (4), 552-555, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11262-016-1338-6>
IF: 1.285 (2015)





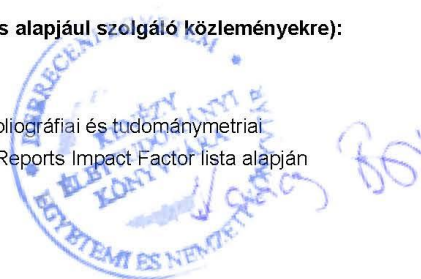
4. Gall-Debreceni, A., Lázár, J., Kádas, J., Balogh, A., **Ferenczi, A.**, Sós, E., Takács, L., Kurucz, I.:
Specific detection and quantitation of bovine IgG in bioreactor derived mouse mAb preparations.
J. Immunol. Methods. [Epub ahead of print], 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2016.08.005>
IF: 1.858 (2015)
5. Gyöngyösi, E., Szalmás, A., **Ferenczi, A.**, Pólska, S., Kónya, J., Veress, G.: Transcriptional regulation of genes involved in keratinocyte differentiation by human papillomavirus 16 oncoproteins.
Arch. Virol. 160 (2), 389-398, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-014-2305-y>
IF: 2.255
6. Szalmás, A., Gyöngyösi, E., **Ferenczi, A.**, László, B., Karosi, T., Csomor, P., Gergely, L., Veress, G., Kónya, J.: Activation of Src, Fyn and Yes non-receptor tyrosine kinases in keratinocytes expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 oncoprotein.
Virology 457 (1), 79, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.08.013>
IF: 2.089
7. Gyöngyösi, E., Szalmás, A., **Ferenczi, A.**, Kónya, J., Gergely, L., Veress, G.: Effects of human papillomavirus (HPV) type 16 oncoproteins on the expression of involucrin in human keratinocytes.
Virology 457 (1), 36, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2012.08.013>
IF: 2.092

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,387

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 4,808

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománytermetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2016.09.21.



Az értekezés témájához kapcsolódó előadások jegyzéke

Ferenczi A., Gyöngyösi E., Kónya J., Veress G.: Functional analysis of HPV 31 LCR (LONG CONTROL REGION) sequence variation, Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, October 12-15, 2010, Hotel Helikon, Keszthely, Hungary.

Ferenczi A., Gyöngyösi E., Kónya J., Veress G.: Human papillomavirus 31 LCR (Long Control Region) sequence variation: phylogenetic and functional analysis, 16th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, July 20-22, 2011. Eötvös Loránd University Convention Centre, Budapest, Hungary.

Ferenczi A., Gyöngyösi E., Szalmas A.; Kónya J., Veress G.: Sequence variation of human papillomavirus (HPV) type 31 E6 and E7 oncoproteins: phylogenetic and functional analysis, Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, October 24-26, 2012, Hotel Helikon, Keszthely, Hungary.

Ferenczi A., Gyöngyösi E., Szalmas A.; Kónya J., Veress G.: Phylogenetic and functional analysis of sequence variation of human papillomavirus (HPV) type 31 E6 and E7 oncoproteins, 4th Central European Forum for Microbiology, October 16-18, 2013, Hotel Helikon, Keszthely, Hungary.

Ferenczi A., Gyöngyösi E., Szalmas A.; Kónya J., Veress G.: Phylogenetic and functional analysis of sequence variation of human papillomavirus (HPV) type 31 E6 and E7 oncoproteins, Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, October 15-17, 2014, Hotel Helikon, Keszthely, Hungary