

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Humán polyomavírusok prevalencia és *in vitro*  
vizsgálata**

**Katona Melinda**

**Témavezető: Dr. Csoma Eszter**



**DEBRECENI EGYETEM**

**GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2025**

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BKPyV	BK polyomavírus
E	korai régió
9	HPyV9 referenciaszekvencia
9_E	HPyV9 referenciaszekvencia korai promoterének aktivitása
9_L	HPyV9 referenciaszekvencia késői promoterének aktivitása
EV	üres, inzertet nem tartalmazó, pcDNA3.1+ vektor
HPyV	humán polyomavírus
HPyV9	humán polyomavírus 9
JCPyV	JC polyomavírus
L	késői régió
LTA <sub>g</sub>	nagy tumorantigén
MWPyV	MW polyomavírus
NCCR	nem kódoló, kontroll régió
OD	optikai denzitás
PyV	polyomavírus
RLU	relatív luciferáz egység
SARS-CoV-2	súlyos akut légzőszervi szindróma koronavírus 2
STLPyV	STL polyomavírus
UF-1_E	HPyV9 UF-1 izolátum korai promoterének aktivitása
UF-1_L	HPyV9 UF-1 izolátum késői promoterének aktivitása
VP1	vírus protein 1

## Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1. Humán polyomavírusok	3
2.2. A humán polyomavírusok tulajdonságai	5
2.3. Humán polyomavírus 9	8
2.4. MW polyomavírus	10
2.5. STL polyomavírus	11
3. Célkitűzések	12
4. Anyagok és módszerek	13
4.1. Szeroprevalencia vizsgálatok	13
4.1.1. Minták	13
4.1.2. VP1 expressziós plazmidok előállítása	14
4.1.3. Bakteriális fehérjeexpresszió	17
4.1.4. A kapszid fehérje tisztítása	17
4.1.5. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis	18
4.1.6. Fehérjék vizsgálata Coomassie Brilliant Blue R-250 festéssel	19
4.1.7. VP1 fehérjék kimutatása Western blottal	19
4.1.8. ELISA	19
4.2. DNS prevalencia vizsgálatok	20
4.2.1. Vizsgálati minták, nukleinsav izolálása	20
4.2.2. Valós idejű PCR	23
4.2.3. MWPyV és STLPyV szekvenciák amplifikációja, szekvenálása	24
4.2.4. HPyV9 PCR szekvenciák amplifikációja, szekvenálása	26
4.3. HPyV9 promoter aktivitásainak in vitro vizsgálata	27
4.3.1. Vektorok	27
4.3.2. Sejtkultúrák	28
4.3.3. Transzfecció	28
4.3.4. Kettős luciferáz assay	29

4.3.5. LTA <sub>g</sub> kimutatása Western blottal	29
4.4. Statisztikai és filogenetikai elemzés	29
5. Nem önállóan végzett munkák	30
6. Eredmények és megbeszélés	31
6.1. Szeroprevalencia vizsgálatok eredménye	31
6.1.1. VP1 antigének	31
6.1.2. HPyV9 szeroprevalencia vizsgálat eredményei	31
6.1.3. MWPyV szeroprevalencia vizsgálat eredményei	35
6.1.4. STLPyV szeroprevalencia vizsgálat eredményei	38
6.2. DNS prevalencia vizsgálatok eredményei	41
6.2.1. HPyV9 DNS prevalencia	41
6.2.2. HPyV9 szekvenciaanalízis eredményei	43
6.2.3. MWPyV DNS prevalencia	44
6.2.4. MWPyV szekvenciaanalízis eredményei	47
6.2.5. STLPyV DNS prevalencia	49
6.2.6. STLPyV szekvenciaanalízis eredményei	50
6.3. HPyV9 <i>in vitro</i> , funkcionális genomvizsgálata	53
7. Összefoglalás	61
8. Summary	63
9. Új megállapítások	65
10. Irodalomjegyzék	66
11. Tárgyszavak	74
12. Köszönetnyilvánítás	75
13. Függelék	76

## 1. BEVEZETÉS

A *Polyomaviridae* víruscsalád 13 humánpatogén vírusa közül mindössze négyről tudjuk biztosan, hogy milyen betegséget, tünetet okoznak. Ismeretanyagunk erről a négy vírusról segíthet a kutatások tervezésében, amelyekkel lépésről lépésre deríthetjük ki a ma még feltáratlan patogenezisű, genomszekvenciaként leírt vírusok klinikai jelentőségét. A több mint 50 éve felfedezett BK és JC polyomavírusok (BKPyV és JCPyV) a populáció nagy részét fertőzik, látens vírusként élethosszan a szervezetben maradnak, reaktivációjuk az immunszupprimált betegekben komoly kockázatot jelent. A transzplantált, immunszuppresszív terápiában részesülő betegekben súlyos, akár halálos kimenetelű következménnyel járhat a vírusok replikációja. A fertőzések, reaktivációk mikrobiológiai diagnosztikája ma már alapkövetelmény, viszont célzott terápia, prevenció továbbra sincs.<sup>1,2</sup> Mindkét vírusról folyamatosan bővül az ismeretanyagunk. Tudjuk, hogy különböző genotípusaik vannak, hogy ezek földrajzi elkülönülést is mutatnak, hogy a hipervariábilis, szabályozó régiót érintő genetikai mutációk hatással lehetnek a vírus patogenezisére.<sup>3,4</sup> Az is tény, hogy a BKPyV esetében nem csak különböző genotípusok, hanem szerotípusok léteznek, amelyek fő kapszid fehérjéi jelentős különbségeket mutatnak.<sup>5</sup> Több kérdés azonban máig nem tisztázott. Nem tudjuk, pontosan hogyan terjednek, mi a behatolási kapu, hol replikálódnak először. A DNS prevalencia adatok alapján feltételezhető a vizelettel, széklettel, szennyvízzel, nyállal, légúti váladékkal terjedés, a szájon át, légúton át történő behatolás, de még az anyáról magzatra terjedés is. A BKPyV onkogén potenciálja is erősen kutatott terület. A Merkel sejt polyomavírus (MCPyV) viszont bizonyítottan a Merkel sejt carcinoma, egy ritka, de nagyon rossz prognózisú bőrtumor okozója. Bár a szeroprevalencia felmérések alapján tudjuk, hogy a vírus az emberek döntő többségét fertőzi, hogy a Merkel sejt carcinomák közel 80%-ában kimutatható a vírusgenom integrált formában, mégis több virológiai alapkérdés és az onkogenezis pontos mechanizmusa sem kellően tisztázott még.<sup>6</sup> A terjedési módok közül szintén a DNS prevalencia adatok alapján a bőr a bőrrel kontaktus, a légúti váladékkal, nyállal, fekál-orál módon való transzmisszió is feltételezett. Nem ismert, hogy a szervezetben mely sejt(ek)ben replikálódik, jelenleg az *in vitro* végzett replikációs kísérletekre támaszkodnak a feltételezések. A folyamatosan bővülő szekvenciaadatok alapján pedig szintén felmerült, hogy földrajzilag elkülönülő genotípusai lehetnek. A trichodysplasia spinulosa asszociált polyomavírust (TSPyV) a csak immunszupprimált betegekben leírt, ritka bőrbetegségből fedezték fel.<sup>7</sup> Érdekeség,

hogy a TSPyV primer fertőzés során is okozhatja a bőr tüskeszerű elváltozásait, a szőrvesztést, vagyis nem csak a reaktiváció járhat következményekkel.<sup>8</sup> A szerológiai felmérések alapján a BKPyV-hez és JCPyV-hez hasonló mértékben elterjedt vírus, az általa okozott betegséget mégis jóval ritkábban diagnosztizálják. A patogenezis mellett a terjedési mód, a replikáció célsejtjei sem tisztázottak.<sup>9</sup>

A többi humán polyomavírusról — így a doktori munka során vizsgált humán polyomavírus 9-ről, MW polyomavírusról és STL polyomavírusról — viszont még kevesebb információval rendelkezünk. A fentiekben felsorolt ismeretanyag, a már jobban tanulmányozott humán polyomavírusokról meglévő tudásunk alapján azonban tervezhetőek a kutatások. Megismerésükhöz, a virológiai alapkérdések tisztázásához tudnunk kell, hogy valóban fertőzik-e az embert, mennyire elterjedtek, vannak-e földrajzi különbségek, mikor fertőzödünk, esetleg vannak-e olyan betegcsoportok, akik fogékonyabbak a fertőzésre. Ezen kérdések megválaszolására szeroprevalencia vizsgálatokat végezhetünk. Módszertani kihívás, mivel a szükséges antigén sem kapható kereskedelmi forgalomban. A metodikákat mindenki maga fejleszti, ami olykor nehezíti az egyes kutatócsoportok által publikált adatok kiértékelését, az összehasonlítást. A vírus, a vírus genomjának kimutatása különböző mintákban, a prevalencia vizsgálatok segítik a terjedési mód, a replikáció helyének feltérképezését. A genomok szekvenálása, a szekvenciák elemzése segíthet feltárni, vannak-e a vírusoknak eltérő genotípusai, ezek mutatnak-e földrajzi elkülönülést. A replikációt, génexpressziót szabályozó régiók variációjának analízise, majd ezeknek a szekvenciáknak az *in vitro*, funkcionális vizsgálata feltárhatja az esetleges biológiai különbségeket, sőt, a replikáció potenciális célsejtjeit is.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Humán polyomavírusok

A *Polyomaviridae* család első tagját az 1950-es években izolálták egérből, majd *in vivo* és *in vitro* kísérletekkel is igazolták, hogy többféle daganat okozója.<sup>10,11</sup> A polyomavírus görög eredetű elnevezés, a tumorkeltő tulajdonságra utal: a sok jelentésű poly és a tumor értelmű oma szavak összetételéből keletkezett. A *Polyomaviridae* családban a Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság jelenleg (ICTV, <https://ictv.global>) 118 emlősöket, így embert is, madarakat és halakat fertőző fajt tart nyilván, amelyeket az *Alphapolyomavirus*, *Betapolyomavirus*, *Deltapolyomavirus*, *Epsilonpolyomavirus*, *Etapolyomavirus*, *Gammapolyomavirus*, *Thetapolyomavirus* és *Zetapolyomavirus* genusokba sorol. Vélhetően mai ismereteinknél sokkal diverzebb víruscsaládról lehet szó, írtak már le polyomavírus szekvenciákat hullőkből, kételtűekből és ízeltlábúakból is.<sup>12</sup> A polyomavírusok általában erősen gazdafaj-specifikusak, gyakran egyetlen fajt, esetleg annak közeli rokonait fertőzik. Néhány humán, emlős és madár polyomavírus jól ismert patogén, amelyek súlyos, akár letális kórképeket vagy tumort okoznak.<sup>12,13</sup> A taxonómiai fajnevek helyett az értekezésben a vírusnevek szerepelnek, az általános bemutatás pedig a humánpatogén vírusokra fókuszál.

A víruscsaládban jelenleg 13 humánpatogén fajt tart nyilván az ICTV. Az első humánpatogén vírusokat, a BK és a JC polyomavírust 1971-ben izolálták replikálódó vírusokként. A BKPyV-et egy húgyvezeték-szűkületben szenvedő, veseátültetett beteg vizeletéből, a JCPyV-et pedig egy Hodgkin-lymphomás beteg agyszövetéből, aki progresszív multifocalis leukoencephalopathiában szenvedett.<sup>14,15</sup> Ugyan e két humánpatogén polyomavírusról tudunk a legtöbbet, a klinikai mikrobiológiai vizsgálatok során bizonyos betegcsoportok esetében rutinszerűen diagnosztizált vírusok, több kérdés is nyitott velük kapcsolatban. Nem ismert a pontos terjedési mód, ahogy a replikáció első célsejtjei sem. Viszont mindkét vírus jelenlétét igazolták garatmandulában, így feltételezik, hogy egyrészt a bejutás után ott replikálódhatnak, másrészt perzisztens fertőzés jöhet létre ebben a másodlagos nyirokszervben.<sup>16,17</sup> Ma már tudjuk, hogy mindkét vírus ubikviter az emberi populációban, a BKPyV primer fertőzések döntően gyermekkorban zajlanak, a JCPyV szeroprevalencia viszont életkorral fokozatosan növekvő. Az egészséges immunrendszerű személyekben tünetmentesen vagy nagyon enyhe, nem specifikus tünetekkel zajló, primer fertőzés során a vírus a szervezetben disszeminálódik, virémia, majd látens fertőzés alakul ki elsősorban a vesében és a

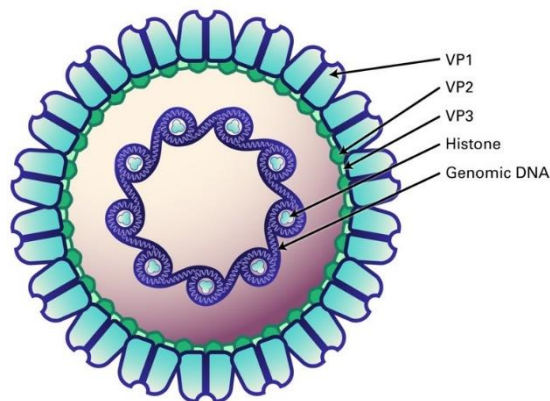
húgyútban, de leukocitákban és agyban is. A reaktiváció során viruria jellemző. Mindkét vírus tünetmentes reaktivációja egészséges egyéneknél is megtörténhet, immunszuppresszáltakban viszont a reaktiválódott vírusfertőzés súlyos, akár letális kórképekkel járhat. A BKPyV reaktivációja leggyakrabban veseérintettséggel jár: haematuria, haemorrhagias cystitis, ureter stenosis, interstitialis nephritis, polyomavírus asszociált nephropathia főként csontvelő-, illetve vesetranszplantált betegekben alakul ki, de más immungyenge személyekben is előfordul. A JCPyV reaktiváció immunszupprimáltakban az igen gyakran fatális kimenetelű progresszív multifocalis leukoencephalopathiát okozza.<sup>1,2,18</sup> Több mint három évtized telt el, mire 2007-ben két újabb humánpatogén polyomavírust azonosítottak. A KI és a WU polyomavírust (KIPyV és WUPyV) is légúti betegségben szenvedő gyerekek orrgarat mintájából írták le.<sup>19,20</sup> Az azóta zajló kutatások ellenére sem sikerült kóroki szerepüket feltárni. Feltételezések szerint önállóan vagy társfertőzőként légúti patogének lehetnek, ám ezt egyértelműen igazolni még nem tudták.<sup>21,22</sup> 2008-ban egy ritka, de igen rossz prognózisú bőrtumorból, a Merkel sejt carcinomából azonosították az MCPyV-et.<sup>23</sup> Míg az egyetlen humánpatogén polyomavírus, amelyet egyértelműen tumorvírusként tartunk számon.<sup>6</sup> A humán polyomavírus 6-ot és 7-et (HPyV6, HPyV7) egészséges személyektől vett bőrmintából írták le 2010-ben.<sup>24</sup> Néhány esettanulmány alapján feltételezik, hogy mindkét vírus immunszupprimáltakban hiperkeratózissal járó bőrtüneteket okozhat.<sup>25,26</sup> A TSPyV-et szintén 2010-ben egy trichodysplasia spinulosában szenvedő, transzplantált beteg bőrének tüskeszerű elváltozásából írták le. A vírus a nevét adó bőrbetegség okozója.<sup>7</sup> Egy évvel később publikálták a következő vírust, a humán polyomavírus 9-et (HPyV9) vesetranszplantált beteg szérumából.<sup>27</sup> 2012-ben az MW polyomavírust (MWPyV),<sup>28</sup> egy évvel később az STL polyomavírust (STLPyV) írták le gyerekek székletmintáiból.<sup>29</sup> 2014-ben egy transzplantált beteg izombiopsziájából azonosított új polyomavírussal, a New Jersey polyomavírussal (NJPyV), majd 2017-ben bőrmintából szekvenált LI polyomavírussal (LIPyV) bővült a víruscsalád.<sup>30,31</sup> Az utóbbi öt vírus egyikét sem tudjuk jelenleg betegséghez társítani. Két újabb, feltételezhetően humánpatogén polyomavírus genomot írtak le, 2019-ben székletből a Quebec polyomavírust (QPyV),<sup>32</sup> 2023-ban bőrmintából a HPyV16-ot.<sup>33</sup> Ezeket az ICTV még nem sorolta be a víruscsaládba. A humán polyomavírus 12 (HPyV12) genomját májzsövetből 2013-ban szekvenálták.<sup>34</sup> Mivel majdnem teljesen identikus szekvenciát cickányokból is publikáltak, jelenleg kérdéses a vírus gazdafaja, ezért nem szerepel a humánpatogén vírusok közt.<sup>35</sup> Kiemelendő, hogy a 2000-es években azonosított vírusok mindegyikét

genomszekvenciaként azonosították, nem klasszikus virológiai izolálás történt. Az MCPyV és TSPyV által okozott betegségek jól ismertek.<sup>9,36,37</sup> A HPyV6 és HPyV7 valószínűleg bőrbetegséget okoznak, ismereteink azonban még hiányosak.<sup>25,38,39</sup> A többi hét, humánpatogénként számon tartott vírusról azonban nem tudjuk, hogy okoznak-e és milyen betegséget, ismereteink ezen vírusok esetében erősen hiányosak.

## 2.2. A humán polyomavírusok tulajdonságai

A polyomavírusok kisméretű, 45–50 nanométer átmérőjű, lipidburokkal nem rendelkező, ikozaédes szimmetriájú vírusok. A kapszidjuk 72 kapszomerből épül fel, amelyek fő alkotóeleme a pentamereket formáló VP1 (vírus protein 1) fehérje. A kapszomerek stabilitását a C-terminális régiók közti kapcsolatok biztosítják, amelyeket diszulfid hidak és kalcium ionok is erősítenek. Minden kapszomer a virion belseje felé egy VP2 vagy VP3 fehérjével is kapcsolódik. Szekvenciaelemzések alapján VP4 fehérje létét is feltételezik a BKPyV és JCPyV esetében is, hasonlóan néhány állati polyomavírushoz.<sup>40</sup> A VP1 N-terminális régiója kötődik a DNS genomhoz, amely celluláris hisztonokkal minikromoszómaként található a virionban.<sup>13</sup> A polyomavírusok jellegzetes, sematikus képe a strukturális elemekkel az **1. ábrán**. A kapszidot alkotó VP1 fehérjére jellemző, hogy spontán is képes pentamerekké, majd ikozahedrális, vírusszerű partikulummá, úgynevezett VLP-vé rendeződni akár laboratóriumi körülmények közt is.<sup>41</sup>

**1. ábra:** Polyomavírusok szerkezete



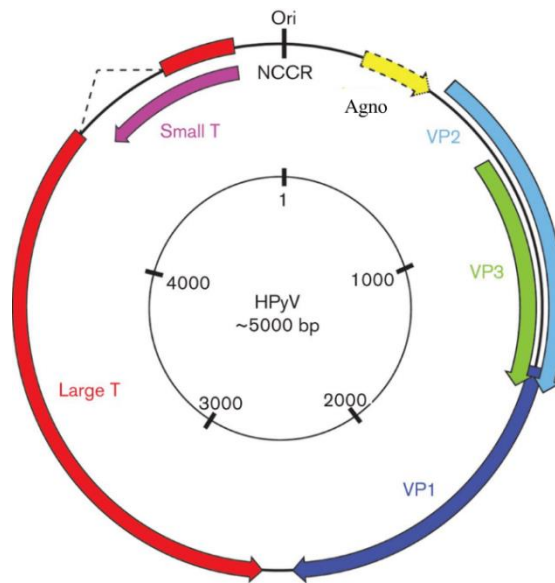
Forrás: <https://lsbio-7d62.kxcdn.com/research-areas/infectious-disease/polyomaviridae>

VP1: vírus protein 1; VP2: vírus protein 2; VP3: vírus protein 3

Mivel a VP1 fehérje helyezkedik el a kapszid külső felszínén, ez határozza meg a vírus receptorspecifitását, vagyis azt, hogy milyen sejtekhez képes kötődni. Továbbá a fertőzésen átesetteknél ez ellen termelődik neutralizáló ellenanyag. A neutralizáló ellenanyagok képesek megakadályozni a polyomavírusok kötődését a gazdasejtekhez, ezáltal gátolják a vírusok sejtbe való bejutását.<sup>42</sup> A VP1 ellen termelődő neutralizáló és nem neutralizáló ellenanyagok kimutatásával szeroprevalencia vizsgálatot végezhetünk, azaz felmérhetjük a vírusok populációban előforduló gyakoriságát, azonosíthatjuk a fertőzésen már átesetteket.

A polyomavírusok genomja cirkuláris, duplaszálú DNS. A humán polyomavírusok genomja 4776 (STLPyV) és 5387 bázispár (MCPyV) közt változó méretű (<https://ictv.global>). A genom funkcionális egységei a korai (E), a késői (L) és a kettő közötti, nem kódoló, szabályozó régió (NCCR). Érdekes, hogy mindkét szálról történik transzkripció ellentétes irányban (**2. ábra**). A korai régió a tumor antigéneket (TAg) kódolja. Még a virális DNS replikációja előtt, egyetlen mRNS alternatív splicingja révén keletkezik a nagy T-antigén (LTA<sub>g</sub>) és a kis T-antigén (sTAg). Bizonyos polyomavírusok — például a JCPyV, az MCPyV, TSPyV és STLPyV — esetében alternatív nyitott leolvasási keret vagy splicing révén további fehérjék is keletkezhetnek.<sup>43-45</sup> Az LTA<sub>g</sub> konzervált motívumokkal rendelkezik, és számos funkciója van. Az NCCR meghatározott szekvenciamotívumaihoz kötődve kulcsszerepe van a transzkripció és a replikáció szabályozásában. Kis mennyiségben celluláris fehérjékkel együtt a korai régió transzkripcióját segíti. Nagyobb mennyiségben viszont inicializálja a DNS replikációját, gátolja a korai régió transzkripcióját, valamint celluláris transzkripciós faktorokhoz kötődve serkenti a késői fehérjék expresszióját.<sup>46</sup> A sejtciklust is szabályozza, a retinoblastoma család tagjaihoz kötődése révén a sejtet S fázisba tolja.<sup>47</sup> Az sTAg szerepe az LTA<sub>g</sub> stabilizálása, a sejtciklus előremozdítása, a virális DNS replikációjának és a késői régió expressziójának segítése.<sup>47-51</sup> A késői régió a kapszidot alkotó szerkezeti fehérjéket kódolja. A VP1 és a VP2 fehérjék egy mRNS alternatív splicingja révén keletkeznek. A VP3, amely az MCPyV esetében hiányzik, alternatív startkodon révén keletkezik. Ezenkívül a BKPyV és JCPyV késői régiójáról agnoprotein is keletkezik, amely serkenti a vírus DNS replikációját és a virion összeszerelődését.<sup>52</sup> A késői régióról keletkező microRNS-ek gátolják a korai génexpressziót, valamint a vírus számára előnyös, immunmoduláló hatásuk is van.<sup>53</sup>

## 2. ábra: A Polyomavírusok genomszerkezete



Forrás: J. Gen. Virol. 94, 482 (2013); <https://doi.org/10.1099/vir.0.048462-0> NCCR: nem kódoló, kontroll régió; agno: agnoprotein; VP1: vírus protein 1; VP2: vírus protein 2; VP3: vírus protein 3; Large T: nagy T antigén; small T: kis T antigén; HpyV: humán polyomavírus; bp: bázispár

Az NCCR-ben található a replikációs origó LTA<sub>g</sub> kötő motívummal, valamint a korai és késői régió promoterei és enhancerei. Az NCCR régió kulcsszerepet játszik a polyomavírusok sejtotropizmusának és génexpressziójának szabályozásában, meghatározva, hogy a vírus mely sejtípusokban képes replikálódni. Az NCCR régió mérete és szekvenciája fajoként változó, hossza a jelenlegi szekvenciák alapján 267 bp és 645 bp között. A különböző vírusfajok NCCR szekvenciái nagyon különbözőek, és hipervariábilis régióként fajokon belül is jelentős változékonyságot mutatnak.<sup>54</sup> Igazolták, hogy az archetípushoz képest jelentősen eltérő, úgynevezett átrendeződött NCCR szekvenciával rendelkező BKPyV és JCPyV replikációja fokozott lehet, valamint a vírus patogenitása is változhat, súlyosabb lehet a fertőzés következménye.<sup>3,4</sup>

A genomszekvenciák elemzése alapján mind a BK, mind a JC polyomavírusnak különböző genotípusai vannak, amelyek földrajzi elkülönülését is igazolták. A földrajzi elkülönülést az analízisek alapján felállított hipotézis szerint a gazdafajjal történő együttes migráció, azaz az emberi faj kontinenseken át történő vándorlása eredményezhette.<sup>1,55</sup> A BKPyV genotípusok VP1 fehérjéi olyan jelentősen eltérnek, hogy a genotípusok egyben elkülönülő szerotípusok is.<sup>5</sup> Ez egyrészt jelenthet eltérő

sejttropizmust, akár patogenitásbeli különbséget. Másrészt az egyik szerotípus ellen termelődő ellenanyagok nem nyújtanak teljes védelmet egy másik szerotípussal szemben.

### 2.3. Humán polyomavírus 9

Közel másfél évtizeddel a felfedezést követően sem ismerjük a HPyV9 klinikai jelentőségét, nem tudjuk, okoz-e betegséget.<sup>27</sup> Annak ellenére, hogy több kutatócsoport is végzett DNS prevalencia vizsgálatokat különféle mintákkal, illetve szeroprevalencia felméréseket is publikáltak, még az alapvető kérdések is tisztázatlanok a vírussal kapcsolatban.

Kérdéses a HPyV9 populációs elterjedtsége is, az eddig megjelent 11 tanulmány 11% és 47% közötti felnőttkori szeroprevalencia adatot közölt.<sup>27,56-65</sup> Az adatok jelentős eltérései mellett az is változó, hogy a pozitívítási arány miként alakult az egyes korosztályokban. A gyermekeket is vizsgáló német és olasz tanulmányok életkorral növekvő átfertőzöttségi arányt figyeltek meg.<sup>56,57,66</sup> Egy ausztrál felmérés viszont a legtöbb életkori csoportban alacsony, szinte alig különböző szeropozitívítási arányt detektált.<sup>58</sup> Az olasz kutatók az életkorral folyamatosan növekvő szeropozitívításról számoltak be felnőttek esetén is, a legmagasabb, 70%-os átfertőzöttséget a vizsgált csoportban a 80 év felettek körében tapasztalták, miközben a felnőttkori szeroprevalencia 40% volt.<sup>56,57</sup> Más kutatócsoportok viszonylag stabil felnőttkori szeropozitívításról számoltak be, esetleg az életkor előrehaladtával kismértékben nőtt az átfertőzöttség,<sup>61,63</sup> vagy ellenkezőleg, az életkor előrehaladtával csökkent.<sup>58,60,64</sup> Az adatok különbözőségeit magyarázhatják a módszertani, a vizsgálat csoportok közötti eltérések, de akár földrajzi különbség is állhat a háttérben. Magyarországról még nem publikáltak adatokat, a hazai átfertőzöttségi arány ismertelen.

Nem tudjuk, hogy hogyan történik a primer infekció, hol replikálódik a vírus. HPyV9 DNS-t alacsony prevalenciával mutattak már ki vérből,<sup>27,59,67-71</sup> vizeletből,<sup>27,70,71</sup> légúti mintából,<sup>70,71</sup> bőrmintából,<sup>71-77</sup> garatmandulából<sup>78</sup> és tüdőszövetből<sup>71</sup> is. Mások viszont nem detektálták a vírust vérből,<sup>79,80</sup> vizeletből,<sup>80-82</sup> bőrmintából,<sup>83,84</sup> légúti mintából,<sup>72,80</sup> garatmandulából,<sup>85-87</sup> székletből<sup>80</sup> és likvorból<sup>80,88</sup> sem. A HPyV9 terjedési módja továbbra is rejtély, a légúti, a szájon át, esteleg a bőr a bőrrel kontaktus útján való terjedés is felmerül.

Vizsgálták a HPyV9 jelenlétét bőr-, agy-, vese-, hólyag-, mandula- és melltumorkban, minden DNS prevalencia felmérés negatív eredménnyel zárult.<sup>84,87,89-94</sup>

Egy tanulmányban a vesetranszplantáltakban szignifikánsan nagyobb arányban mutattak ki virémiát az egészséges véradókhöz képest.<sup>59</sup> Ezért felmerült, hogy az immunszuppresszió növelheti a vírusfertőzés iránti fogékonyságot, illetve ha látens fertőzés alakul ki, a reaktivációt. Két vizsgálatban is szerokonverziót, a szeropozitivitási arány szignifikáns növekedését figyelték meg transzplantáció utáni követéses vizsgálatban, miközben az egészséges kontrollcsoportban nem változott az átfertőzöttségi adat.<sup>59,95</sup> Ugyanakkor egy másik, vesetranszplantált betegek követéses vizsgálatában a HPyV9-et nem tudták kimutatni vér-, vizelet- és légúti mintában sem.<sup>96</sup> Egy másik kutatócsoport sem detektált HPyV9-et vérből egy követéses vizsgálat során, melyben allogén őssejttranszplantált betegek vérmintáit vizsgálták.<sup>97</sup> A terhesség alatti immunológiai változások növelhetik a fertőzésekkel szembeni fogékonyságot, a látens fertőzések reaktivációját. A témavezető munkacsoportja terhes és nem terhes nők vizelet, vér és légúti mintáiban is detektálta a HPyV9 DNS-ét, azonban a két csoport közt nem volt eltérés a prevalenciában. Az eredmények alapján terhességben nem nőtt a HPyV9 fertőzés kockázata.<sup>70</sup>

Egy esetsorozat elemzés kapcsán három szervátültetett betegben a kiterjedt, hiperkeratózisos bőrelváltozásukból HPyV9-et detektáltak. Mindhárom beteg a bőrtünetek megjelenését követő egy éven belül többszervi elégtelenségben elhunyt. Semmilyen más, ismert kórokozót nem azonosítottak a mintáikból a mikrobiológiai diagnosztikai vizsgálatok során. A betegek vérében, vizeletében, szem- és szájüregi tamponátumban, valamint egy beteg tüdőszövetében is kimutatták a HPyV9 nukleinsavát, ami a vírus szerkezeten belüli disszeminációjára utal. Aktív vírusreplikációt sejtet, hogy a bőr- és a tüdőszöveti mintában virális mRNS-t is detektáltak.<sup>71</sup>

A HPyV9 *in vivo* sejtropizmusa még nem ismert. Próbálkoztak már virion előállításával. Ennek során HPyV9 genomot transzfektáltak különböző állati és humán sejtekbe, azonban teljes vírusreplikáció nem történt, a kísérletek sikertelenek voltak.<sup>62</sup>

A polyomavírusok sejtropizmusát nagymértékben a víruskapszid és a gazdasejt receptorai közötti interakciók határozzák meg. Miután a vírus bejutott a sejtmagba, a génexpressziót, a replikáció lépéseit az NCCR szabályozza. A vírus szabályozó, korai fehérjéinek, a gazdasejt transzkripció faktorainak és az NCCR-nek a kölcsönhatása befolyásolja a virális génexpressziót, azt, hogy egy adott sejt típusban látencia vagy produktív vírusreplikáció következik be. A polyomavírusok hipervariábilis NCCR régiójában keletkező szekvenciavariációk jelentős hatást gyakorolhatnak a vírus replikációjára és patogenitására.<sup>3,4</sup> Noha a GenBank adatbázisban jelenleg csak

korlátozott számú teljes HPyV9 genom érhető el, az eddigi adatok máris jelentős eltéréseket mutatnak az NCCR régiók között, amelyek biológiai szerepe még feltáratlan.

#### 2.4. MW polyomavírus

Az MWPyV-et 2012-ben izolálták egy Malawiban élő, egészséges, 15 hónapos gyermek székletmintájából.<sup>28</sup> A vírus kóroki szerepe, a terjedési mód, a replikáció helye nem ismert, jelenleg viszonylag kevés DNS és szeroprevalencia adat áll rendelkezésre.

A MWPyV DNS-t egészséges, valamint gasztrointesztinális tünetekkel rendelkező gyermekek és felnőttek székletmintáiban 0,5–12,8%-os előfordulásban mutatták ki, ami arra utal, hogy a vírus fekál-orál úton terjedhet.<sup>98-101</sup> Légúti minták 0,7–9,2%-ában is detektálták, pozitivitás döntően gyermekek mintáira volt jellemző.<sup>80,100-102</sup> Ez alapján a légúti terjedés is feltételezhető. A munkacsoportunk által végzett korábbi kutatások során tüdőszöveti mintákban nem sikerült kimutatnunk a vírus genomját.<sup>103</sup> Azonban MWPyV DNS jelenlétét igazolták már garat- és orrmandulában is, ami arra utal, hogy a másodlagos nyirokszövetek szerepet játszhatnak a vírus replikációjában, akár perzisztenciájában.<sup>86,87</sup> A vírust kimutatták továbbá condylomában<sup>104</sup> és egyéb bőrmintában is.<sup>75,83</sup> A vírus szerkezeten belüli disszeminációját vizsgálva vér-, vizelet- és likvor mintákat is elemeztek,<sup>80,99,100,105</sup> de MWPyV DNS-t csupán egy egészséges véradó vérmintájában mutattak ki.<sup>69</sup> Így jelenleg kérdéses, hogy a vírus a behatolás, majd a célsejtekben történő replikáció után disszeminálódik-e a szervezetben, kialakul-e perzisztens, látens fertőzés.

A szeroprevalencia vizsgálatok meglehetősen ellentmondóak, az eddigi közleményekben a felnőttkori szeropozitivitási arány 41–99%.<sup>47,60,61,63,64,106,107</sup> A gyermekeket is vizsgáló kutatások eredményei szerint a primer fertőzések jelentős része gyermekkorban történik.<sup>47,60,106,107</sup> Az Olaszországból, Csehországból, USA-ból, Ausztráliából és Hollandiából közölt, eltérő adatok háttérben ebben az esetben is állhat módszertani különbség, de lehet akár földrajzi eltérés is az átfertőzöttségben. Magyarországi adatokkal nem rendelkezünk. Negatív eredménnyel záruló DNS prevalencia vizsgálatot munkacsoportunk tumoros és nem tumoros tüdőszövettel, valamint vese- és hólyagtumorokkal végzett.<sup>93,103</sup>

## 2.5. STL polyomavírus

Az STLPyV-vel kapcsolatban még kevesebb adattal rendelkezünk. Genomját szintén egy egészséges, Malawiban élő gyermek székletmintájából szekvenálták először.<sup>29</sup> A fekál-orál módon történő terjedés lehetősége felmerült. A vírust tünetmentes és hasmenéses tünetekkel rendelkező gyermekek székletmintáinak 0,26–4,4%-ában mutatták ki.<sup>29,99,108</sup> A vírus leírói vesetranszplantáltak orrgarati és plazmamintáiban nem detektálta a vírust, mindössze egy vizeletben igazolta a vírusgenom jelenlétét.<sup>29</sup> Vesteranszplantáltak követéses vizsgálata során egy ausztrál csoport azonban egy beteg orr- és toroktampon mintájában detektált STLPyV DNS-t, de sem vérből, sem vizeletből nem mutatták ki.<sup>96</sup> Egy kínai kutatócsoport gyermekek garatmandulájának 2%-ában azonosított STLPyV DNS-t,<sup>86</sup> egy német kutatócsoport viszont nem detektált STLPyV-et sem tumoros, sem tumormentes mandulaszövetben.<sup>74</sup> A vírus és a bőr kapcsolatát két csoport vizsgálta. Egy immunszupprimált beteg condylomájából STLPyV DNS-t azonosítottak.<sup>109</sup> A vírus DNS-ét egészséges felnőttek homlokáról és kezéről vett bőrminták 7,3%, illetve 8,3%-ában detektálták.<sup>75</sup>

STLPyV szeroprevalencia vizsgálatot mindössze három kutatócsoport végzett. Hasonló adatokat publikáltak az USA-ból, Hollandiából és Olaszországból. A teljes szeropozitivitás aránya 68% és 98% közöttinek bizonyult, ami alapján az STLPyV széles körben elterjedt az emberi populációban.<sup>110-112</sup>

Hazai átfertőzöttségi adatokkal nem rendelkezünk. DNS prevalencia vizsgálat történt, azonban tüdő-, vese- és hólyagtumorban sem sikerült STLPyV DNS-t kimutatni.<sup>103</sup>

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

A kutatómunkát három fő irányvonalban terveztük.

1. A HPyV9, az MWPyV és az STLPyV szeroprevalenciájának vizsgálatához az alábbi célokat tűztük ki:
  - immunkompetens gyermekektől és felnőttektől származó szérumminták gyűjtése;
  - VP1 fehérjék előállítása bakteriális fehérjeexpressziós rendszerben;
  - ELISA módszer tervezése és optimalizálása;
  - szeroprevalencia vizsgálatok elvégzése és analízise.
  
2. A HPyV9, az MWPyV és az STLPyV esetleges légúti terjedésének tanulmányozását DNS prevalencia vizsgálattal terveztük, amelyhez céljaink a következők voltak:
  - légúti váladék (orrgarat- és garatminta), garat-, orrmandula-, valamint tüdőszövet gyűjtése, a mintákból nukleinsav izolálása;
  - valós idejű PCR módszer tervezése, a PCR vizsgálatok elvégzése, az eredmények kiértékelése;
  - PCR pozitív minták szekvenálása, a szekvenciák analízise.
  
3. HPyV9 esetében *in vitro* funkcionális genomvizsgálatokat, jelentősen eltérő szekvenciájú promoterek aktivitásának vizsgálatát terveztük különböző sejtekben. Ehhez céljaink a következők voltak:
  - HPyV9 NCCR szekvenciák kétirányú, luciferáz riporter vektorba történő klónozása;
  - HPyV9 LTA<sub>g</sub> kódoló szekvencia expressziós vektorba történő klónozása;
  - a vektorok transzfekciója különböző, így légúti és bélepitél, endotél, valamint fibroblaszt sejtekbe;
  - a promoterek aktivitásának, valamint az LT fehérje arra gyakorolt hatásának vizsgálata a különböző sejtípusokban.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Szeroprevalencia vizsgálatok

#### 4.1.1. Minták

A szérummintákat, melyek a szeroprevalencia vizsgálatokhoz szükségesek, 2016 és 2021 között a Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológia diagnosztikai vizsgálataira érkezett minták közül gyűjtöttük a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottságának engedélyével (DE RKEB/IKEB: 5134-2018). A vizsgálat során alkalmazott kizárási kritériumok alapján nem gyűjtöttünk mintát olyan személyektől, akik kemoterápiában, immunszuppresszív terápiában, biológiai terápiában, immunstátuszt befolyásoló alapbetegségben szenvedtek, illetve ha egy éven belül a beteg vért vagy vérkészítményt kapott. A szérummintákat a további felhasználásig fagyaszttva tároltuk.

A HPyV9 szeroprevalencia vizsgálatot összesen 1038, 0,7 és 93 év közti egyénektől származó szérummintával végeztük. A mintákat életkori csoportokba rendeztük, amelyeket a vonatkozó életkori és nemi arány adatokkal együtt az **1. táblázat** tartalmazza.

**1. táblázat:** HPyV9 szeroprevalencia vizsgálatához használt minták

Korcsoportok	Mintaszám	Életkor, min-max (medián); év	Nő/Férfi
<3 év	30	0,7-2,9 (1,7)	14/16
3–5 év	47	3-5,9 (4,2)	19/28
6–9 év	57	6,1-9,9 (7,6)	29/28
10–13 év	70	10,1-13,9 (11,7)	34/36
14–20 év	143	14-20,9 (16)	77/66
21–39 év	199	21-39,6 (31)	96/103
40–59 év	237	40-59,5 (50)	119/118
60–79 év	209	60-79 (69)	105/104
>60 év	46	80-93 (83)	27/19
<b>Összesen</b>	<b>1038</b>	<b>0,7- 93 (37)</b>	<b>520/518</b>
Felnőtt (>18 év)	718	18-93 (51)	362/356
Gyerek (< 18 év)	320	0,7-17,9 (11,2)	158/162

Az MWPyV és STLPyV kapszid antigénje elleni antitestek vizsgálatát azonos mintaállománnyal, 618–618 szérummintával végeztük. A mintákat 0,8 és 90 év közti gyermekektől és felnőttektől gyűjtöttük. Az életkori csoportok, a teljes kohorsz, a felnőttek és gyermekek életkori adatait, valamint a nemek arányát a **2. táblázat** foglalja össze.

**2. táblázat:** MWPyV és STLPyV szeroprevalencia vizsgálathoz használt minták

<b>Korcsoportok</b>	<b>Mintasám</b>	<b>Életkor, min-max (medián); év</b>	<b>Nő/Férfi</b>
<6 év	49	0,8–5,9 (3,1)	16/33
6–9 év	41	6,1–9,9 (7,5)	22/19
10–13 év	66	10,1–13,9 (11,9)	37/29
14–20 év	92	14–20 (16)	51/41
21–39 év	122	21–39,5 (30)	62/60
40–60 év	130	40–59,5 (50)	66/64
>60 év	118	60–90 (69)	63/55
<b>Összesen</b>	<b>618</b>	<b>0,8–90 (30)</b>	<b>317/301</b>
Felnőtt (>18 év)	383	18–90 (48)	198/185
Gyerek (< 18 év)	235	0,8–17,9 (11,6)	119/116

#### **4.1.2. VP1 expressziós plazmidok előállítása**

Minden vizsgált vírus esetében a VP1 fehérjét kódoló gént szintetizáltattuk a referencia szekvenciák alapján (GeneArt Strings DNA Fragments, Thermo Fisher Scientific): MWPyV MA095 izolátum (GenBank azonosító: JQ898291.1), STLPyV MA138 izolátum (GenBank azonosító: JX463183.1); HPyV9 (GenBank azonosító: HQ696595.1). Az MWPyV és HPyV9 szekvenciákat kodonoptimalizáltuk, az STLPyV szekvenciát nem. A szintézishez minden szekvenciát az alábbiak szerint módosítottunk: N-terminálisan 6xHis tag szekvenciát, valamint a tag és a fehérje közé linkert (Ser-Ser-Gly) kódoló szekvenciát, míg a szintetizált szekvencia végeire NcoI, illetve XhoI restriktív endonukleáz hasítóhelyeket illesztettünk. A pTriEx-4 Neo (Novagen) expressziós vektort és az inzerteket NcoI-HF és XhoI restriktív endonukleázokkal emésztettük a gyártói utasítások alapján 10X CutSmart pufferben (New England Biolabs). Az emésztett inzerteket Monarch PCR & DNA Cleanup Kittel (New England Biolabs) tisztítottuk a gyártó utasításait követve. A restriktív emésztés után a hasított plazmidot 1%-os agaróz gélben (Sigma-Aldrich) történő elektroforézis után a gélből

vágtuk ki, majd Monarch DNA Gel Extraction Kittel (New England Biolabs) tisztítottuk a gyártói protokoll szerint. Az inzert vektorba illesztését, az expressziós plazmidok létrehozását Rapid DNA Ligation Kittel (Thermo Fisher Scientific) végeztük az előírásnak megfelelően. A ligátum transzformálását TransformAid Bacterial Transformation Kittel (Thermo Fisher Scientific) végeztük egy éjszakán át Lennox Luria Broth (LB) táptalajon (Sigma-Aldrich) tenyésztett *Escherichia coli* XL-1 Blue törzsével (Agilent Technologies), amelyet a transzformáció előtt 2 órán át 37 °C-on 300 rpm-mel rázattunk C médiumban. A transzformáció minden lépése a kit utasításai alapján zajlott. A transzformált baktériumokat 100 µg/mL karbenicillinnel (Duchefa Biochemie) kiegészített LB táptalajra szélesztettük. Az egy éjszakán át 37 °C-on történő inkubálás után egyedi, izolált telepekkel kolónia PCR-t végeztünk. A **3. táblázat** tartalmazza a primerek szekvenciáit és a reakció paramétereit. A 20 µL végtérfogatú reakcióelegy AmpliTaq Gold 360 master mixet (Thermo Fisher Scientific), 10–10 pmol forward és reverse primert tartalmazott.

**3. táblázat:** Kolónia PCR-hez használt primerek és PCR protokoll

Vírus	Primer neve	Szekvencia (5'-3')	Hőmérsékleti profil
HPyV9	Triex_R_seq	TCACATTGCCAAAAGACGGC	95 °C 10 p; 35 ciklus: 95 °C 30 mp, 59 °C 30 mp, 72 °C 77 mp; 72 °C 5 p
	sz_HPpyV9_VP1_F	ATACCATGGCACACCATCACCAC	
MWPpyV	TRIEX UP	GTTATTGTGCTGTCTCATCA	95 °C 10 p; 35 ciklus: 95 °C 30 mp, 53 °C 30 mp, 72 °C 90 mp; 72 °C 5 p
	sz-MW-VP1-R	TTAACGTGCTGCCGGTGC	
STLpyV	TRIEX UP	GTTATTGTGCTGTCTCATCA	95 °C 5 p; 35 ciklus: 95 °C 30 mp, 50 °C 30 mp, 72 °C 42 mp; 72 °C 5 p
	STL 2021 R1	TTTTTAAAGAAACAGCTTCCCA	

p: perc; mp: másodperc

A kolónia PCR-re kiválasztott telepek baktériumait emellett 2 mL, 100 µg/mL karbenicillint tartalmazó, folyékony, LB táptalajban rázattuk 6 órán át 37 °C-on 220 rpm-

mel. A kolónia PCR eredmények alapján az inzertet hordozó vektorral transzformált baktériumokat 6 óra elteltével 15 mL friss, 100 µg/mL karbenicillinnel kiegészített, folyékony, LB táptalajba oltottuk át. A tenyésztés 37 °C-on 220 rpm-es rázatással egy éjszakán át zajlott. Az inkubáció után a baktériumokat 4000 g-n 10 percig centrifugáltuk 4 °C-on. A baktériumüledékből a plazmidot PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kittel (Thermo Fisher Scientific) tisztítottuk a gyártói utasítások alapján. A plazmidokat TE pufferben oldottuk be és -20°C-on tároltuk. Az inzert szekvenciájának és helyes orientációjának ellenőrzése Sanger szekvenálással történt a **4. táblázatban** megadott primerek és BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) használatával. A szekvenálást a Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium végezte ABI SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) készülékkel. A szekvenciák illesztését AliView szoftverrel végeztük.

**4. táblázat:** Expressziós plazmidok Sanger szekvenálásához használt primerek

Vírus	Primer neve	Szekvencia (5'–3')
<b>HPyV9</b>	TriEx UP	GTTATTGTGCTGTCTCATCA
	Triex_R_seq	TCACATTGCCAAAAGACGGC
	HPyV9_VP1_F2	CTGGAACTGCAAGGTCTGGT
	HPyV9_VP1_R1	ATTACCCATACGCGGATTCA
	HPyV9_VP1_R2	ATCCAGTGCCTGATTAACCG
<b>MWPyV</b>	TriEx UP	GTTATTGTGCTGTCTCATCA
	Triex_R_seq	TCACATTGCCAAAAGACGGC
	sz-Malawi_VP1-R	TTAACGTGCTGCCGGTGC
	MW_VP1tag_f	TTCAGATGCCGGATAACACC
	MW_VP1tag_r	TGCCGGAACACAATACTGC
<b>STLPyV</b>	TriEx UP	GTTATTGTGCTGTCTCATCA
	Triex_R_seq	TCACATTGCCAAAAGACGGC
	STL2021 F1	GCTGTTCTTCAGCCTCGAAT
	STL2021 F2	ATGTAGAGGCGATGGACTTTATT
	STL2021 R1	TTTTTAAAGAAACAGCTTCCCA
	STL2021 R2	GCCTCTGAGCCTTTTCTCATT
	STL2021 F3	GTGTAAGTGGTCAGCCCCTG

#### 4.1.3. Bakteriális fehérjeexpresszió

A kodonoptimalizált HPyV9 és MWPyV VP1 fehérjéket *Escherichia coli* Origami B(DE3)pLacI (Novagen), míg az STLPyV VP1-et *Escherichia coli* Rosetta-gami B(DE3)pLacI (Novagen) kompetens baktériumban expresszáltattuk. A transzformációt TransformAid Bacterial Transformation Kittel, 10 ng plazmival végeztük a gyártói utasításoknak megfelelően. A transzformálás után 1% glükózt (Sigma-Aldrich), 15 µg/mL kanamicint (Merck Millipore), 34 µg/mL kloramfenikolt (Merck Millipore), 2,5 µg/mL tetraciklint (Merck Millipore) és 100 µg/µL karbenicillint tartalmazó, szilárd LB táptalajon tenyésztettük a baktériumokat 30 °C-on 16 órán át. Ezt követően az egyedi, izolált telepet 14 órán át 30 °C-on 220 rpm-mel rázatva előtenyésztettük 5 mL folyékony táptalajban, mely az alábbiakat tartalmazta: 1% glükózt, 100 µg/µL karbenicillint, 15 µg/µL kanamicint, 34 µg/µL kloramfenikolt és 12,5 µg/µL tetraciklint. Az inkubációs idő letelte után az előtenyészetből 2 mL-t 98 mL 100 µg/µL ampicillint (Antibiotice) tartalmazó, folyékony, LB táptalajba oltottunk, majd 37 °C-on, 220 rpm-mel rázatva tenyésztettük további 4 órán át. A fehérjetermeltetés indukált módon történt, a folyékony táptalajba 0,5 mM IPTG (izopropil-β-D-1-thiogalaktopiranozid, Thermo Fisher Scientific) hozzáadásával a tenyésztés 4. órájában. Ezt követően a tenyészetet 37 °C-on további 3 órán át 220 rpm-mel rázatva inkubáltuk. A baktériumokat centrifugáltuk (4000 g, 15 perc, 4 °C-on), a felülúszót eltávolítottuk. Az üledék tömegének lemérését követően a fehérjét a tisztításig -20 °C-on tároltuk.

#### 4.1.4. A kapszid fehérje tisztítása

A fehérjék tisztítását affinitás kromatográfiával (Protino NI-TED Packed Columns, Macherey Nagel) a 6xHis tag segítségével végeztük. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy az MWPyV és az STLPyV VP1 fehérjék inklúziós testeket képeztek. A HPyV9 kapszid fehérjék azonban döntően szolubilis formában a citoplazmában találhatóak. A rendelkezésre álló irodalmi adatok szerint a VP1 fehérjék hajlamosak már a bakteriális expresszió során, de a tisztítási folyamat közben is pentamereket, akár komplett, víruszerű partikulumokat képezni, amelyben bakteriális chaperonok is segíthetnek. A bakteriális fehérjéket azonban natív körülmények között végzett tisztítás során nehéz vagy akár lehetetlen teljes mértékben eltávolítani, ahogyan azt előkísérleteink során mi is tapasztaltuk. Így az MWPyV és az STLPyV VP1 fehérjék tisztítása a baktériumokból kinyert inklúziós testekből alapvetően a kit denaturáló tisztításra vonatkozó gyártói protokollja alapján történt kisebb módosítással. A HPyV9 VP1 tisztítását a lizált

baktériumok centrifugálása után a felülúszóból végeztük, de denaturáló körülményeket alkalmazva. A fehérjetisztítások főbb lépései a következők voltak. A baktériumokat gyors olvasztást követően lizáltuk. Ehhez a baktériumokat grammonként 5 mL 1X LEW pufferben 30 percig jégen billegtetve, időnként keverve inkubáltuk. A LEW puffer proteáz inhibitor (cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche), 1 mM PMSF-et (fenilmetil-szulfonil-fluorid), 1 mg/mL lizozimet, 1000 U nukleázt (Pierce Universal Nuclease for Cell Lysis, Thermo Fisher Scientific), valamint HPyV9 és MWPyV esetében 1% Triton X-et és 5% glicerint is tartalmazott. Az inkubálást követően 10000 g-n, 30 percig, 4 °C-on centrifugáltuk a szuszpenziót. STLPyV és MWPyV esetében a centrifugált üledéket denaturáló oldatban jégen, folyamatos keverés mellett 1 órán át inkubáltuk. A denaturáló oldat a következőket tartalmazta: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 8M urea, 100 mg/mL PMSF és proteázgátló tableta (pH 8). A HPyV9 VP1 esetében a lizált baktériumok centrifugálása után a felülúszót 1:1 arányban kevertük denaturáló oldattal, majd szintén 1 órán át jégen, keverve inkubáltuk. A nem szolubilis komponenseket centrifugálással (10000 g, 30 perc, 20 °C) távolítottuk el. A felülúszót az előzőleg denaturáló oldattal ekvibrált oszlopra mértük. Mosást denaturáló oldattal két alkalommal végeztünk. A fehérjék eluálása 2 M ureát tartalmazó eluáló pufferrel (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 2M urea, 250 mM imidazol, pH8) történt. A tisztítás során alkalmazott urea eltávolítását és a fehérjék renaturálását csökkenő urea koncentrációjú, majd ureamentes foszfát pufferben (PBS, pH7,4) dialízissel végeztük dializáló kazettában (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, gamma-irradiated, 10 kDa, Thermo Fisher Scientific) 1 napig. A fehérje koncentrációját Pierce BCA Protein Assay Kittel mértük (Thermo Fisher Scientific). Amennyiben a koncentráció növelésére volt szükségünk, úgy a koncentrációt Amicon Ultracentrifugal Filterrel (10 kDa MWCO, Sigma-Aldrich) végeztük. A fehérjéket -20 °C-on tároltuk.

#### **4.1.5. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis**

A tisztított VP1 fehérjéket 5 percig 95 °C-on, Laemmli pufferben denaturáltuk (Sigma-Aldrich). Az elektroforézis 12%-os SDS-poliakrilamid gélben Bio-Rad Mini Protean II készülékkel történt. A molekulatömeg meghatározásához fehérjelétrát alkalmaztunk (MagicMark XP Western Protein Standard 20-220 kDa, valamint PageRule Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, Thermo Fisher Scientific).

#### **4.1.6. Fehérjék vizsgálata Coomassie Brilliant Blue R-250 festéssel**

Az elektroforézist követően a gélt 60 percig, szobahőmérsékleten, fixáló oldatban (50% metanolt, 10% jégecet desztillált vízben) billegtettük. A gél festése 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250-t, 50% metanolt és 10% jégecetet tartalmazó oldatban, szobahőmérsékleten, 45 percig történt. A szintelenítéshez használt oldat 40% metanolt és 10% jégecetet tartalmazott. A gélt 5%-os jégecet oldatban tároltuk, a fotódokumentálás is ebben az oldatban történt.

#### **4.1.7. VP1 fehérjék kimutatása Western blottal**

Az elektroforézist követően a fehérjéket a gélből Mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories) készülékkel polivinilidén-fluorid membránra (PVDF, Immobilon-E Transfer Membrane, Merck) transzferáltuk. A blottolás 1 órán át 90 V feszültséggel zajlott transzfer pufferben (10% metanol, 25 mM Tris-base, 192 mM glicin). A membránt 5% tejpört (Sigma-Aldrich) tartalmazó TBST oldatban (0,05% Tween-20-at tartalmazó tris-pufferelt sóoldat) 60 percig inkubáltuk. A fehérjék 6xHis tagét felismerő és kötő, primer antitesttel (egér, anti-6xHis tag ellenanyag, REF: MA1-21315, Thermo Fisher Scientific; 1:5000 hígítás 5% tejpört tartalmazó TBST-ben) 16 órán át 4 °C-on inkubáltuk a membránt. A le nem kötött ellenanyagokat TBST-vel távolítottuk el háromszor 5 percig tartó mosásokkal. A másodlagos antitestet (kecske, egér Ig elleni, tormaperoxidázzal konjugált antitest, REF: A28177, Thermo Fisher Scientific) 5% tejpört tartalmazó TBST-ben 1:30000 hígításban oldottuk be, amellyel 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a membránt. Majd újabb, TBST-vel történő, háromszori, 5 percig tartó mosás következett. A detektálásához Immobilon ECL Ultra Western HRP reagenst (Merck Millipore) alkalmaztunk, a jel detektálása ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories) készülékkel történt.

#### **4.1.8. ELISA**

A polyomavírus kapszidfehérjék elleni IgG antitestek kimutatására kolorimetriás ELISA eljárást terveztünk és optimalizáltunk. Meghatároztuk a kikötött antigén mennyiségét, a blokkoló oldat összetételét, a blokkolási időtartamot és hőmérsékletet, a mosó oldatot, a mosási lépések számát, a szérum és a szekunder antitest hígítását, az inkubációs hőmérsékletet és időtartamot, továbbá a szubsztrátummal végzett inkubáció idejét. Az ELISA méréseket 96 lyukú, lapos aljú, műanyag, mikrotiter lemezekon (MaxiSorp Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-Well Plate, Nunc) végeztük,

minden mintát duplikátumban vizsgálva. A lemez minden lyukában 50 ng HPyV9 VP1 fehérjét, vagy 100 ng MWPyV VP1 vagy STLPyV VP1 fehérjét kötöttünk ki 100  $\mu$ L PBS (pH 7,4, Thermo Fisher Scientific) oldatban, majd ezt követően 16 órán át 4 °C-on inkubáltunk. A le nem kötött antigént lyukanként 300  $\mu$ L PBS-el történő háromszori mosással távolítottuk el. Az aspecifikus kötéseket kazeinnel blokkoltuk 1 órán át 37 °C-on (2%-os kazeint tartalmazó 300  $\mu$ L PBS-oldattal). Háromszori PBS-el történő mosást követően mértük be a lyukakba a blokkoló oldatban 1:100 arányban hígított szérumminta 100  $\mu$ L-ét. A 60 perces, 37 °C-on zajló inkubáció után háromszori mosás következett lyukanként 300  $\mu$ L mosóoldattal (0,05% Tween-20-at tartalmazó PBS, eBioscience ELISA Wash Buffer, Thermo Fisher Scientific). A szekunder antitestet (egér, anti-humán, HRP-konjugált, Thermo Fisher Scientific, REF: A18829, LOT: 95-14-052722) 1:10000 hígításban, blokkoló oldatban hígítottuk, majd minden lyukba 100  $\mu$ L-t mértünk. Az 1 órán át, 37 °C-on történő inkubálás után újabb, 300  $\mu$ L mosó oldattal történő háromszori mosás következett. Szubsztrátumként 100  $\mu$ L 3,3',5,5'-tetrametilbenzidint (eBioscience TMB Solution (1X), Thermo Fisher Scientific,) mértünk minden lyukba, majd 15 percen keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A reakciót 100  $\mu$ L/lyuk 1M-os kénsavval állítottuk le. Az optikai denzitást (OD) spektrofotométerrel mértük (MultiSkan Sky Microplate spektrofotométer, Thermo Fisher Scientific) 450 nm hullámhosszon, amelyet a 620 nm-en mért értékekkel korrigáltuk. Az egyes szérumminták OD értékének meghatározásához a kapott értékekből kivontuk a vak kontroll OD értékét, majd átlagoltuk a duplikátumok eredményeit. Az ELISA cut-off értékét inflexiós pont analízissel határoztuk meg. Az OD értékeket, ehhez növekvő sorrendbe rendeztük, és az adatsorra megfelelő determinációs együtthatójú ( $r^2$ ) trendvonalat illesztettünk. A függvény alapján számítottuk az inflexiós pontot, amely az ELISA cut-off értékeként szolgált. Szeropozitívnak azt a mintát tekintettük, amelynek OD értéke/cut-off >1,1.

## **4.2. DNS prevalencia vizsgálatok**

### **4.2.1. Vizsgálati minták, nukleinsav izolálása**

A DNS prevalencia vizsgálatokat különböző mintacsoportokkal végeztük. 2016 májusa és novembere között garat- és/vagy orrmandula műtéten áteső betegek mintáit gyűjtöttük. Valamennyi betegől közvetlenül a műtét előtt tamponnal (PurFlock swab, Puritan Medical Products) torokváladékot vettek 1 ml Puritan UniTranz-RT médiumba (Puritan Medical Products). Ha a betegnek a műtét idején szerózis otitis mediája volt, középfülváladékot is vettek. Ez a mintatípus 15 betegől állt rendelkezésre. Összesen 100

garatmandula és 100 orrmandula szöveti mintát gyűjtöttünk, 54 betegől mindkét mintatípust, 46–46 betegől csak az egyik mintát. A vizsgálatba bevont személyek többsége gyermek volt ( $n = 126$ ; 2,5–17 év; medián: 4,7 év), a kohorszban mindössze 20 felnőtt mintáit dolgoztuk fel (18–37,5 év; medián: 26,1 év). A minták levételét és azokkal történő vizsgálatokat az Állami Népszésgügyi és Tisztiorvosi Szolgálat (száma: IF-5418-7/2016) és az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT TUKEB, 651-3/2016/EKU; 0027/16) hagyta jóvá. A mintákra vonatkozó adatokat az **5. táblázat** tartalmazza. A vizsgálatba bevont minden résztvevő vagy törvényes képviselője (szülő) írásos beleegyező nyilatkozatot írt alá.

A nukleinsav izolálását minden mintából a begyűjtést követően azonnal végeztük DNeasy Blood and Tissue kittel (Qiagen) a gyártói utasítást követve. A szöveti minták esetében 10-20 mg szövetet emésztettünk. A középfül- és a torokvadásból 200  $\mu\text{L}$ -t emésztettünk. Az elúció 100  $\mu\text{L}$  elúciós pufferrel történt, a nukleinsavat felhasználásig  $-20^\circ\text{C}$ -on tároltuk.

**5. táblázat:** Orr- és/vagy garatmandula műtét során gyűjtött minták adatai

	<b>Mintatípus</b>			
	orrmandula	garatmandula	torokvadás	középfülvadás
<b>Mintaszám (=betegszám)</b>	100	100	146	15
<b>Nő/Férfi</b>	44/56	37/63	60/86	8/7
<b>Betegek életkora: min-max (median); év</b>	2,5–12,1 (4,4)	2,5–37,5 (7,1)	2,5–37,5 (5,5)	3,1–8,9 (5,2)

A COVID-19 világjárvány idején, 2020 szeptembere és 2022 márciusa közt a Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiára SARS-CoV-2 PCR vizsgálatra küldött, orrgarati minták nukleinsavát gyűjtöttük gyermekektől és felnőttektől. A vizsgálatokba SARS-CoV-2 RNS pozitív és negatív mintákat is bevontunk, összesen 1130 légúti mintát gyűjtöttünk. MWPyV és STLPyV DNS prevalencia vizsgálatát az 1130 beteg nazofaringeális mintájából végeztük, míg a HPyV9 DNS kimutatásához 919 orrgarati mintát használtunk. A **6. táblázat** mindkét mintacsoportra külön-külön tartalmazza a vonatkozó életkori és nemi adatokat. A vizsgálatot a Helsinki Nyilatkozat irányelveinek megfelelően végeztük, amelyet a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága engedélyezett (DERKEB/IKEB: 5770-2021). A

nukleinsav automatizált izolálását az Orvosi Mikrobiológia Virologiai Laboratóriuma végezte MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kittel (Roche) vagy Chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96 (PerkinElmer) Kittel a leírt protokollnak megfelelően. A SARS-CoV-2 RNS detektálása ViroReal Kit SARS-CoV-2 & SARS (Ingenetix) és SARS-CoV-2 RT-qPCR Reagent (PerkinElmer) kitekkel történt. A diagnosztikai vizsgálatok során megfelelő minőségűnek bizonyult nukleinsavakat PCR vizsgálatainkig -20 °C-on tároltuk.

**6. táblázat:** COVID-19 világjárvány alatt gyűjtött orrgarati minták adatai

<b>MWPyV és STLPyV DNS prevalencia vizsgálatra gyűjtött, orrgarati minták</b>			
	Összes	SARS-CoV-2 pozitív	SARS-CoV-2 negatív
<b>Mintaszám (=betegek száma)</b>	1130	565	565
<b>Nő/Férfi</b>	564/566	283/282	281/284
<b>Betegek életkora: min-max (medián); év</b>	0,8–92 (30,2)	0,8–89,8 (31,2)	0,9–92 (29,5)
<b>HPyV9 DNS prevalencia vizsgálatra gyűjtött, orrgarati minták</b>			
	Összes	SARS-CoV-2 pozitív	SARS-CoV-2 negatív
<b>Mintaszám (=betegek száma)</b>	919	403	516
<b>Nő/Férfi</b>	468/451	208/195	260/256
<b>Betegek életkora: min-max (medián); év</b>		0,8–89,8 (35,5)	1,1–92 (31)

A HPyV9 DNS jelenlétét tumoros és nem tumoros tüdőszöveti mintákban is vizsgáltuk. Ehhez 143 betegtől származó 147 tüdőszöveti mintát vizsgáltunk, amelyek közül 100 minta tüdőtumoros betegtől származott, 47 kontroll minta nem tumoros szövet volt. A kontroll szövetminták tüdőgyulladásban, tüdőfibrózisban vagy tüdőágulatban szenvedő betegektől származtak. A mintákra vonatkozó betegadatokat a **7. táblázat** tartalmazza. A mintákat 2012 és 2016 között küldték patológiai vizsgálatra a Debreceni Egyetem Patológiájára. A formalinnal fixált, paraffinba ágyazott szövetekből 10 µm-es metszeteket dolgoztunk fel.

A nukleinsav izolálása High Pure FFPE DNA Isolation Kittel (Roche) történt a gyártói utasítást követve. A paraffin eltávolítását xilénnel végeztük. A nukleinsav eluálása 50 µL elúciós pufferrel történt, amelyet felhasználásig -20°C-on tároltunk. A nukleinsav mennyiségének, minőségének ellenőrzése NanoDrop 2000c Spectrophotometerrel (Thermo Fisher Scientific) történt.

7. táblázat: HPyV9 DNS prevalencia vizsgálatokhoz gyűjtött tüdőszöveti minták

	Szövet minta típusa	Betegszám/ mintaszám	Nő	Férfi	Életkor: min-max (medián); év	
tüdőcarcinoma	kissejtes carcinoma	4/4	2	2	53,4-67 (65,4)	
	nemkissejtes carcinoma	laphámsejtes carcinoma	17/17	3	14	57,7-75,9 (66,4)
		adenocarcinoma	69/71	37	32	38,3-73,3 (61,3)
		nagysejtes neuroendokrin carcinoma	2/2	1	1	28,1-56,5
	vegyes típusú carcinoma	4/4	2	2	45-71,6 (59,6)	
	nem differenciált típusú tüdőcarcinoma	2	1	1	35,6-61,9	
	<b>Összmintaszám</b>	<b>98/100</b>	<b>46</b>	<b>52</b>	<b>28,1-77,3 (61,8)</b>	
kontroll	tüdőgyulladásban, fibrózisban vagy emfizémában szenvedő betegek tüdőszövetmintája	45/47	21	24	13,1-78,8 (59,6)	
<b>Összmintaszám</b>		<b>143/147</b>	<b>67</b>	<b>76</b>	<b>13,1-78,8 (61,5)</b>	

A nukleinsav-izolálások hatékonyságát és minőségét humán  $\beta$ -globin DNS-t célzó PCR segítségével is ellenőriztük, amely során 5  $\mu$ l DNS-t amplifikáltunk 25  $\mu$ l végső térfogatban, ehhez 1x AmpliTaq Gold 360 Master Mixet (Applied Biosystems) és 10–10 pmol primert (PCO3: 5'ACACAACCTGTGTTCACTAGC3' és PCO4: 5'CAACTTCATCCACGTTCAACC3') használtunk. Az enzim aktiválása 95 °C-on 10 percig zajlott, amelyet 40 ciklus követett az alábbiak szerint: denaturálás 95 °C-on fél percig, anelláció 55 °C-on fél percig, extenzió 72 °C-on-on 1 percig. A végső extenzió 72 °C-on 5 percig történt.

#### 4.2.2. Valós idejű PCR

A valós idejű PCR-eket Applied Biosystems 7500 real-time PCR és QuantStudio 5 (Applied Biosystems) készülékekkel végeztük.

A MWPyV és STLPyV DNS kimutatása multiplex, valós idejű PCR-rel történt 25  $\mu$ L végtérfogatban TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) felhasználásával, 400–400 nM primerekkel és 250–250 nM próbákkal korábban publikált módszer alapján.<sup>28</sup> Orr- és garatmandulák esetében 1000 ng DNS-t, más mintatípusoknál

10 µL nukleinsavat mértünk a reakcióelegybe. Az MWPyV (GenBank: JQ898291.1) részleges szekvenciáját (3966-4927), illetve az STLPyV részleges szekvenciáját (GenBank: JX463183.1, 3922-4776) szintetizáltattuk (GeneArt Gene Synthesis), majd pJET1.2/blunt vektorba klónoztuk CloneJET PCR Cloning Kittel (Thermo Fisher Scientific) a termék utasításai szerint. Az így előállított plazmid szolgált pozitív kontrollként a PCR reakció során. HPyV9 DNS kimutatására a valós idejű PCR-t 25 µL végtérfogatban végeztük, amely TaqMan Universal PCR Master Mixet, 500–500 nM forward és reverse primert, valamint 200 nM próbát tartalmazott. Az általunk tervezett primerek és próba szekvenciáit, valamint a reakció körülményeit a **8. táblázatban** tüntettük fel. A szövetekből 1000 ng, az egyéb minták esetében 10 µL nukleinsav templátot mértünk a reakcióelegybe. Pozitív kontrollként szolgáló plazmidot a fent leírtak szerint állítottuk elő, amelyhez inzertként a HPyV9 VP1 szekvenciáját (GenBank: HQ696595.1) szintetizáltattuk.

**8. táblázat:** Valós idejű PCR reakció körülményei és a primerek, próbák szekvenciái

	<b>Primerek, próbák</b>	<b>Szekvencia (5'-3')</b>	<b>PCR reakció</b>
<b>HPyV9</b>	HPyV9_VP1_qF	CCAAACTGGAGAGGCCTACCT	50 °C 2 p; 95 °C 10 p; 45 ciklus: 95 °C 15 mp, 60 °C 1 p
	HPyV9_VP1_qR	TTGAGGCATAAGACCAGAGAACAAG	
	HPyV9_Vp1_probe	VIC- TAATGTAACTCTAAGGAAACGGGT- MGBNFQ	
<b>MWPyV</b>	ES105	TGAGAAGGCCCGGTTCT	A fluoreszcens jel detektálása 60 °C-on zajlott minden ciklusban.
	ES106	GAGGATGGGATGAAGATTTAAGTTG	
	ES107	FAM-CCTCATCACTGGGAGC- MGBNFQ	
<b>STLPyV</b>	STL-LT-F	TGCAGAGGTCCCTTCATCATC	
	STL-LT-R	TTTTCTTTTTAGGGCGGACAATAT	
	STL-LT-Prb	VIC- CCACCATTGCTCCCAAGCAGGAGTAC- MGBNFQ	

p: perc; mp: másodperc

#### 4.2.3. MWPyV és STLPyV szekvenciák amplifikációja, szekvenálása

A valós idejű PCR-ben MWPyV és STLPyV pozitívnak bizonyult mintákból NCCR szekvenciát amplifikáltunk és szekvenáltunk. Az általunk tervezett amplifikációhoz és szekvenáláshoz is használt specifikus primerek szekvenciái, valamint a PCR reakció

paraméterei a **9. táblázatban** találhatóak. Az amplifikációt 25 µL reakciótér fogatban végeztük Phusion Hot Start II High Fidelity DNS-polimerázzal (1 U) HF pufferben, amely 500–500 nM szensz és antiszensz primert, valamint 200 µM dNTP mixet (Thermo Fisher Scientific) tartalmazott. Az amplifikált PCR termékeket agaróz gélelektroforézist követően a gélből kereskedelmi forgalomban kapható kitekkel (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen vagy Monarch DNA Gel Extraction Kit, New England Biolabs) tisztítottuk a gyártói utasítást követve. A Sanger szekvenálás a korábban leírtaknak megfelelően történt. A szekvencia illesztésekhez AliView szoftvert használtunk.

**9. táblázat:** MWPyV és STLPyV NCCR régiók amplifikációjához használt primerek szekvenciái és PCR protokollok

PCR	Primer neve	Primer szekvenciája (5'-3')	Hőmérsékleti profil
MWPyV NCCR	MW_F2	GCATTAAGGGWATATTTCCCAAGC	98 °C 1 p; 35 ciklus: 98 °C 10mp, 62 °C 20 mp, 72 °C 20 mp; 72 °C 5 p
	MW_R2	GAAAGCTGWGATTCTACTATAGCAGCT	
STLPyV NCCR	STL_F 4518-4540	ACAACAACATTCTTACCGGCGGA	98 °C 1 p; 35 ciklus: 98 °C 10mp, 60 °C 20 mp, 72 °C 35 mp; 72 °C 5 p
	STL_R 1289-1267	CATTGGACATGTCTGTGAGGTGC	

p: perc; mp: másodperc

STLPyV teljes genomot is szekvenáltunk. Ehhez átfedő szakaszokat amplifikáltunk. A PCR reakcióelegyet a fentiek szerint mértük össze. A PCR protokollok esetében az annealációs hőmérsékletet az alkalmazott primerpár olvadáspontjához, az extenziós időt pedig az amplitikon hosszának megfelelően állítottuk be a Phusion Hot Start II High Fidelity DNS polimeráz gyártói utasításoknak megfelelően. Az amplifikált termékek tisztítása, a szekvenálás és a genom illesztése a korábban leírtak szerint történt. Az általunk tervezett és használt primerek szekvenciája a **10. táblázatban** található.

**10. táblázat:** STLPyV teljes genom amplifikálásához és szekvenálásához használt primerek szekvenciái

<b>Primer neve</b>	<b>Primer szekvenciája (5'-3')</b>
STL_F 1224-1248	TAGTGGAAGAAGTTGAAAATGGCTC
STL_szR 2374-2354	CAACATCTAGCATCCAAAGTC
STL_szF 101-126	ATTGTCTATTGCATAGTTTCATCACC
STL_R 1289-1267	CATTGGACATGTCTGTGAGGTGC
STL_F 1224-1248	TAGTGGAAGAAGTTGAAAATGGCTC
STL_R 3028-3003	CTGTGCAATAGATGAGTTCATGGTTG
STL_F 2226-2249	TCATCCCTATTAACAGCCCAAATG
STL_R 3028-3003	CTGTGCAATAGATGAGTTCATGGTTG
STL_F 2901-2925	CACACCCATCTAAATGATCTCTAAG
STL-szR 4001-3975	CAGATCCAACAGATTTTCCTGCTGAAT
STL-szF 3953-3980	GCATGACTTAAAAAAGTCTCTAATTCAG
STL_szR 126-101	GGTGATGAAACTATGCAATAGACAAT
STL_F 4518-4540	ACAACAACATTCTTACCGGCGGA
STL_szR 915-891	GCTTGTCTAACATTTTCCACAGTTT
STL_R 1289-1267	CATTGGACATGTCTGTGAGGTGC

#### **4.2.4. HPyV9 PCR szekvenciák amplifikációja, szekvenálása**

A HPyV9 valós idejű PCR pozitív mintákból a vírus LTag-t kódoló régiójának 488 bp-nyi szakaszát is amplifikáltuk és szekvenáltattuk. A PCR reakcióelegy 1U Phusion Hot Start II High Fidelity DNS-polimerázt tartalmazott HF pufferben, valamint 500 nM forward (9szLT-F2: 5'TTTTGAAAAACATCCCATGAG3'), 500 nM reverse primert (9szLT-R3: 5'CCCCCTTTTAAGTTGTTG3') és 200 µM dNTP mixet. Az enzim aktiválását 98 °C-on fél percre végeztük, majd 40 ciklus következett az alábbiak szerint: denaturálás 98 °C-on 10 másodpercig, annealáció 56 °C-on 15 másodpercig, extenzió 72 °C-on 15 másodpercig. A végső extenzió szintén 72 °C-on 5 percre tartott. A PCR termékeket agaróz gélelektroforézist követően a gélből Monarch DNA Gel Extraction Kittel tisztítottuk. A szekvenálás a már leírt módon történt.

Teljes HPyV9 genomot is szekvenáltunk, a fent leírtakkal egyező módon, szintén átfedő szakaszok amplifikációjával, Sanger szekvenálásával. A tervezett és

amplifikációhoz, valamint szekvenáláshoz használt primerek szekvenciáit a **11. táblázat** tartalmazza.

**11. táblázat:** HPyV9 teljes genom amplifikáláshoz és szekvenálásához használt primerek

Primer neve	Primer szekvencia (5'-3')
9refNCCR_F2	AGGGTGGTAAATTTTGGAAACTG
9szLT-F1	CAAAGCAAATCTAACTCCCCTG
9szLT-F2	TTTTGAAAAACATCCCCTGAG
9szLT-F3	TCTCCTGCCAATTTACAGC
9szLT-F4	AACACATAGGAAAGTCCTCTG
9szLT-R1	AACATGTGAATAAAAGAAGCCAG
9szLT-R2	TTGCATGGGGAAATTGAAA
9szLT-R3	CCCCCTTTTAAGTTGTTG
9szLT-R4	GAAGCTGGATCATCCCAGAG
9szLT-R5	TATGGGGTGAATGCTTTTGC
9szLT-R6	TTGGAGGAGAGAAATGAGC
HPyV9 VP1-2 rt F	CCAGGAGGGGCAAATCAAAG
HPyV9 VP1-2 rt R	TAGCCTTGCTGGAGGCAAC
HPyV9 VP1-rt nF	GCCTACCTAAATCCAAGAATGG
HPyV9_F	ATGAATAAATCTGAAGAAGAAAAG
HPyV9_LT-F	ACAAATTGTTATGCTTGTCTTCA
HPyV9_LT-R	GGTAAGAAGTTCTCCACCTATTTG
HPyV9_VP1_qF	CCAAAACCTGGAGAGGCCTACCT
HPyV9_VP1_qR	TTGAGGCATAAGACCAGAGAACAAG
9FOR_1	ACAAGTGCATTGCGGTTTC
9REV_3	AAATTGTTCCCTAGTTGGGGG
9FOR_2	CAATGCCATAGGAATAGGAATCTT
HPyV9 VP1-2rt R	TAGCCTTGCTGGAGGCAAC

### 4.3. HPyV9 promoter aktivitásainak *in vitro* vizsgálata

#### 4.3.1. Vektorok

A referencia HPyV9 genom (GenBank: HQ696595.1) és az UF-1 izolátum (GenBank: KC831440.1) teljes NCCR szekvenciáját a végeken XhoI és HindIII hasítóhelyekkel szintetizáltattuk (GeneArt Gene Synthesis), majd pGL4Luc-RLuc kétirányú reporter vektorba illesztettük (Addgene). Az NCCR vektorba illesztése után a polyomavírus kétirányú promotere szabályozza a vektor ellentétes irányban kódolt firefly és *Renilla* luciferáz génjeinek expresszióját. A HPyV9 (GenBank: HQ696595.1) LTA<sub>g</sub>-t kódoló gén cDNS-ét az 5'végen KpnI hasítóhellyel, a 3'végen HA tag és ApaI restrikciós hasítóhellyel szintetizáltattuk, majd pcDNA3.1+ vektorba (Thermo Fisher Scientific)

klónoztuk. Az inzertek és a hasított plazmid tisztítása, a ligálás, a vektor amplifikálása XL1-Blue szuperkompetens sejtekben, valamint a szekvenálás a korábban leírtaknak megfelelően történt. A plazmidok tisztítása PureLink Expi Endotoxin-Free Maxi Plasmid Purification Kittel (Thermo Fisher Scientific) történt a gyártói utasításnak megfelelően. A transzfekciós hatékonyság vizsgálatához a pmaxGFP (Lonza) vektort használtuk.

#### **4.3.2. Sejtkultúrák**

A humán, primer légúti epitelsejteket (ATCC, LGC Standards GmbH) Airway Cell Basal Mediumban tartottuk, amelyet Bronchial Epithelial Growth Kittel (ATCC) egészítettünk ki. Az A549 sejteket (humán tüdőcarcinoma epitelsejtek, ATCC) Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12-ben (Gibco), 10% főtális borjú szérummal (FBS, kat.: 16140071; Gibco) és 100 U/mL penicillin, sztreptomycin oldattal (Gibco) kiegészítve. A HEK-293 sejteket (humán, embrionális, vese epitelsejtek, ATCC), a Caco-2 sejteket (humán epitelsejtek vastagbél adenocarcinomából, ATCC), az MRC-5 sejteket (normál, humán, tüdő fibroblaszt sejtek, ATCC) és az SK-HEP1 sejteket (humán endotelsejtek máj adenocarcinomából, ATCC) Dulbecco's modified Eagle's mediumban tenyésztettük (D-MEM, kat.: 31885023, Gibco) 10% FBS-sel és 100 U/mL penicillin, sztreptomycin oldattal kiegészítve. A sejteket 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében, termosztátban tartottuk.

#### **4.3.3. Transzfekció**

A sejteket 24 órával a transzfekciót megelőzően 12 lyukú tenyésztőlemezre (TPP Techno Plastic Products AG) szélesztettük. A transzfekciót 24 óra múlva, a primer sejtek esetében 90%-os konfluenciaszint elérésekor, míg a többi sejtkultúra esetében 70-80%-os konfluenciaszintnél végeztük. A sejtekről a médiumot eltávolítottuk, majd kétszeri, PBS-sel (pH7,4) történő mosást követően lyukanként 800 µL Opti-MEM (Gibco) médiumot mértünk a sejtekre. A sejtek transzfekciója 1 µg riporter vektorral, Lipofectamine 2000 transzfekciós reagenssel (Thermo Fisher Scientific) történt az alábbiak szerint: 100 µl Opti-MEM tápfolyadékhoz 3 µl Lipofectamine 2000 reagenst adtunk, melyet 5 percig tartó, szobahőmérsékleten történő inkubálás követett. A reagenst 1 µg plazmidot (pGL4Luc-RLuc vektor HPyV9 NCCR-rel vagy anélkül) tartalmazó 100 µL Opti-MEM tápfolyadékhoz adtuk, szuszpendáltuk, majd 20 perc szobahőmérsékleten történő inkubálás után a sejtekhez adtuk. Hat óra inkubáció után a transzfekciós folyadékot lecseréltük a sejtek tenyésztő médiumára. A mock kontroll transzfekciót a leírtakkal megegyező módon végeztük, azzal a különbséggel, hogy a

transzfekeciós elegy nem tartalmazott vektort. Kotranszfekeciós kísérleteink során a transzfekeciós médium a riporter vektor mellett 200 ng LTA<sub>g</sub>-t expresszáló vagy kontrollként üres pcDNA3.1(+) vektort is tartalmazott. Kísérleteinket minden minta esetében minden alkalommal három párhuzamos sejttenyészettel végeztük, és a vizsgálatokat három független alkalommal ismételtük.

#### **4.3.4. Kettős luciferáz assay**

A promoter aktivitásokat a transzfekeciót követő 24 óra múlva Dual-Luciferase Reporter Assay Kittel (Promega) mértük. Ehhez PBS-sel történő, kétszeri mosást követően a sejteket 200 µl 1X passzív lizispufferben lizáltuk. A mérés a gyártói utasításokat követve Berthold luminométerrel zajlott a lizált sejtek centrifugálásával (20000 g, 30 másodperc) nyert felúszójából. Kísérleteinkben a firefly luciferáz aktivitás a késői promoter aktivitást (L), míg a *Renilla* luciferáz aktivitás a korai promoter aktivitást (E) reprezentálta. Az egyes minták luciferáz aktivitását az adott minta fehérjekoncentrációjára normalizáltuk. A fehérjekoncentrációt a Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével mértük a vonatkozó utasítások alapján.

#### **4.3.5. LTA<sub>g</sub> kimutatása Western blottal**

Az SDS-PAGE és a Western blot módszert a fentebb leírtakhoz hasonló módon végeztük el. Az aspecifikus kötőhelyek blokkolása ebben az esetben 1X Pierce Clear Milk blokkoló oldattal (Thermo Fisher Scientific) történt. Az elsődleges antitestet TBST oldatban 1:10000 hígításban használtuk. A HA-taggal ellátott LT antigéneket HA Tag monoklonális antitesttel (kat.: 6183, Thermo Fisher Scientific), míg a béta-aktint a Beta Actin Loading Control monoklonális antitesttel (kat.: MA5-15739, Thermo Fisher Scientific) jelöltük. A HRP-konjugált, kecske, egér IgG elleni (H+L) szuperklonális, rekombináns, másodlagos antitestet (kat.: A28177, Thermo Fisher Scientific) 1:20000 hígításban blokkoló oldatban adtuk a membránhoz. Minden további lépés a korábban leírtaknak megfelelően történt.

#### **4.4. Statisztikai és filogenetikai elemzés**

A normalitás vizsgálatokat, a Fisher egzakt tesztet, a chi-négyzet-trend tesztet, a Mann-Whitney U tesztet, a Kruskal-Wallis-tesztet, a Dunn post hoc analízist és a *t*-teszteket a GraphPad Prism 9.4.0 verziójával végeztük. A statisztikai vizsgálatok eredményét szignifikánsnak tekintettük, ha  $p < 0,05$ . A filogenetikai elemzéshez a Mega X szoftvert, a haplotípus hálózatok kialakításához pedig a PopART szoftvert használtunk.

## 5. NEM ÖNÁLLÓAN VÉGZETT MUNKÁK

- Témavezetővel közösen végeztük az ELISA módszer fejlesztését és optimalizálását.
- A többezer ELISA mérés ~20%-át dr. Jeles Krisztina végezte.
- SARS-CoV2 PCR-eket a témavezető végezte a rutin diagnosztikai vizsgálatok során.
- A cut-off érték meghatározását, illetve a megfelelő statisztikai vizsgálat kiválasztását a témavezetővel közösen végeztem.
- A filogenetikai és haplotípus hálózat elemzéseket dr. Takács Péterrel közösen végeztük.
- Az *in vitro* kísérletek optimalizálását, a sejt kultúrák megfelelő fenntartását, a transzfekció időpontjának meghatározását a témavezetővel közösen végeztük. A luciferáz aktivitások sötétben mérésekor a témavezető és dr. Jeles Krisztina segített.

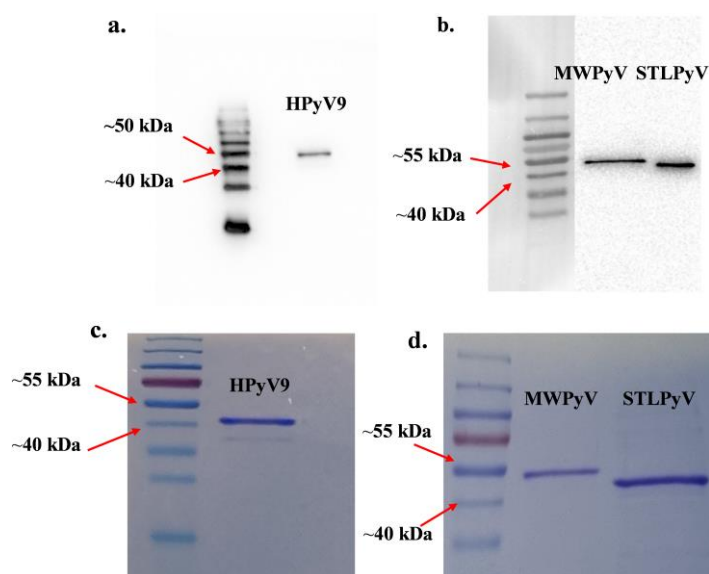
## 6. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

### 6.1. Szeroprevalencia vizsgálatok eredménye

#### 6.1.1. VP1 antigének

Az előállított VP1 fehérjéket Coomassie Brilliant Blue festéssel és Western blot vizsgálattal ellenőriztük (**3. ábra**). Az antigéneket mindhárom polyomavírus esetén megfelelőnek ítéltük a szerológiai reakciók elvégzéséhez.

**3. ábra:** Szeroprevalencia vizsgálatokhoz előállított HPyV9, MWPyV, STLPyV VP1 fehérjék Western blot és Coomassie brilliant blue festés eredményei

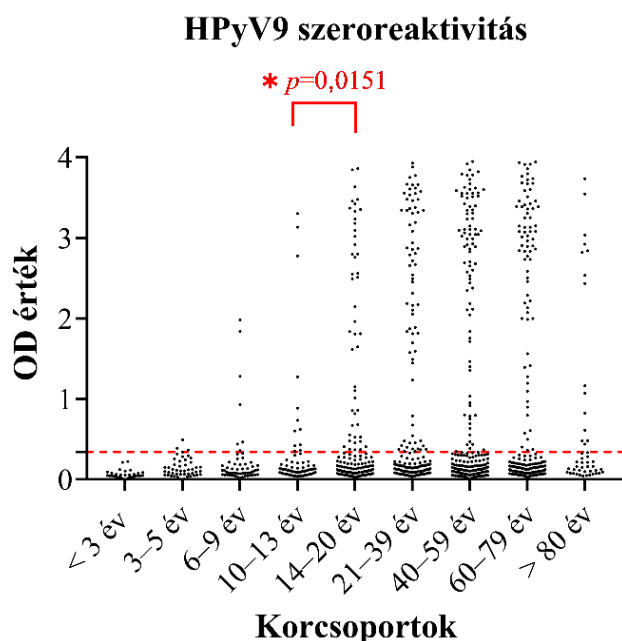


Az **a** és **b** képeken a HPyV9, MWPyV és STLPyV VP1 fehérjék Western blot eredményei láthatóak, a tisztított fehérjéből 500 ng-ot mértünk a géltre. A molekulatömeg becsléséhez a HPyV9 esetében Magic Mark (20-220kDa) míg a MWPyV és STLPyV esetében Page Ruler fehérje létrát (10–180kDa) használtunk. A **b** ábrán a fehérje létra fotója fehérfény megvilágítással készült. A **c** és **d** képeken a HPyV9, MWPyV és STLPyV VP1 fehérjék láthatóak Coomassie brilliant Blue festéssel. A fehérjékből 1000 ng-ot mértünk a géltre.

#### 6.1.2. HPyV9 szeroprevalencia vizsgálat eredményei

A módszertani részben leírtak szerint meghatároztuk a HPyV9 ELISA cut-off értékét. A vizsgált mintát akkor tekintettük szeropozitívnak, ha OD értéke  $>0,343$ . Az egyes minták szeroreaktivitása, azaz OD értéke korcsoportonként a **4. ábrán** látható.

4. ábra: HPyV9 szeroreaktivitás korcsoportonként



A fekete pontok egy-egy szérumminta átlagolt OD értékét jelölik. A szaggatott, piros vonal a szeropozitivitás határértékét mutatja. A piros vonal  $p$  értékkel a korcsoportok közötti szignifikáns különbséget (MannWhitney U teszt) jelzi. OD: optikai denzitás

Az egymást követő korcsoportok OD értékeit páronként Mann-Whitney U teszttel analizáltuk. Statisztikailag szignifikáns különbséget csak a 10–13 éves és a 14–20 éves korcsoportok között figyeltünk meg ( $p=0,0151$ ). A teljes kohorsz korcsoportjain végzett Kruskal-Wallis, Dunn post hoc analízis eredményét, a statisztikailag szignifikáns különbségeket a **12. táblázat** mutatja be. Ez alapján a gyermekek körében a szeroreaktivitás statisztikailag is igazolhatóan növekedett az életkor előrehaladtával.

12. táblázat: HPyV szeroreaktivitás (OD értékek) többszörös összehasonlítása korcsoportonként

<b>Korcsoportok (év)</b>									
	<3	3–5	6–9	10–13	14–20	21–39	40–59	60–79	>80
<3	ns								
3–5	ns	ns							
6–9	*0,0375	ns	ns						
10–13	***0,0009	ns	ns	ns					
14–20	****<0,0001	ns	*0,0463	ns	ns				
21–39	****<0,0001	**0,0074	**0,0036	ns	ns	ns			
40–59	****<0,0001	**0,0024	***0,001	*0,0414	ns	ns	ns		
60–79	****<0,0001	**0,0045	**0,002	ns	ns	ns	ns	ns	
>80	****<0,0001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

A Dunn post hoc analízis eredményei. A csillagok és  $p$  értékek statisztikailag szignifikáns különbséget jeleznek. ns: nem szignifikáns ( $p>0,05$ ).

A polyomavírusok VP1 fehérjéinek kisebb vagy nagyobb mértékű szekvenciaazonossága miatt a VP1 antigének elleni ellenanyagok akár keresztreakálhatnak is. Aspecificitási problémák esetében az ELISA eredmények nem megbízhatóak. Ezért ELISA eredményeink specificitását, az antigének közötti keresztreaktivitást is vizsgáltuk azonos genusba tartozó polyomavírusok közt. A HPyV9 az *Alphapolyomavirus* genusba tartozik, VP1 fehérjéje 59%, illetve 62%-os hasonlóságot mutat az azonos genusba sorolt MCPyV és a TSPyV VP1 antigénjével. A specificitási vizsgálatokhoz ezért heterológ antigénként az MCPyV és a TSPyV VP1 fehérjét használtuk, amelyeket korábbi kutatásaink során állítottunk elő.<sup>113</sup> A HPyV9 ELISA vizsgálatban szeroreaktív szérumminták közül széles OD tartományt lefedve válaszottunk 16 mintát a kompetíciós vizsgálatához. A szérumokat 2000 ng homológ vagy heterológ VP1 antigénnel inkubáltuk 1 órán keresztül 37 °C-on, majd elvégeztük az ELISA vizsgálatot a korábban leírtak szerint. A szérumokat bármiféle kezelés nélkül, illetve a homológ vagy heterológ fehérjével történő előinkubáció után is vizsgáltuk, minden mintát duplikátumban. Eredményeinket a **13. táblázat** mutatja be.

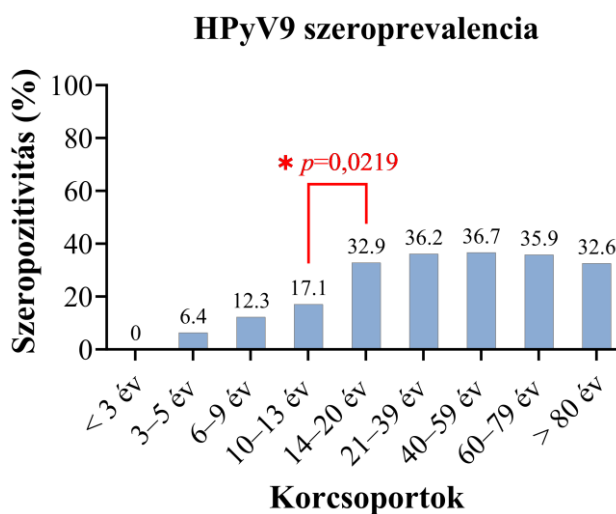
**13. táblázat:** Keresztreaktivitási vizsgálat eredménye: HPyV9 ELISA szeroreaktivitás a HPyV9, MCPyV vagy TSPyV antigénnel történő előinkubálás után

Szérumminta azonosítója	HPyV9 szeroreaktivitás (OD érték)	HPyV9 szeroreaktivitás (OD érték) az alábbi VP1 fehérjékkel való előinkubáció után		
		HPyV9	MCPyV	TSPyV
1510	0,4904	0,0663	0,5212	0,4921
140	0,6300	0,0974	0,6635	0,7085
333	0,7196	0,0864	0,7333	0,6963
789	0,7301	0,0696	0,7557	0,7577
817	0,7490	0,0416	0,6718	0,6313
109	0,8380	0,1541	0,8106	0,7547
1194	0,8710	0,0798	0,8971	0,8546
1320	1,0822	0,0741	1,0653	1,0501
21011	1,0992	0,0334	1,0873	1,0509
8520	1,2046	0,0776	1,2681	1,1135
11604	1,2515	0,0366	0,9777	1,0364
10311	1,2961	0,0274	1,3702	1,1956
17326	1,3316	0,0267	1,2440	1,2003
3066	1,4218	0,0398	1,5558	1,4783
21632	1,4758	0,1455	1,4354	1,1841
15782	1,9156	0,0468	1,9286	1,8823

A HPyV9 antigénnel történő előinkubáció a szérumokban az OD értékek teljes és statisztikailag szignifikáns csökkenését ( $p < 0,0001$ ) eredményezte, valamennyi minta szeronegatívvá vált az ELISA vizsgálatban. Ugyanakkor az MCPyV és TSPyV antigénnel való előinkubáció során az OD értékek alig vagy egyáltalán nem változtak. Mindezekből arra következtethetünk, hogy az ELISA méréseink során a HPyV9 VP1 fehérje elleni specifikus antitesteket detektáltunk.

A teljes kohorszban 30,6% HPyV9 szeropozitivitást detektáltunk, a felnőttek ( $>18$  év) közt pedig 36,2% volt a fertőzésen már átesettek aránya. Az eltérő vizsgálati módszerek ellenére az általunk mért HPyV9 szeroprevalencia több kutatócsoport eredményével egyezik.<sup>56,59,62,114</sup> Mindössze egy német tanulmány közölt magasabb, 47%-os szeroprevalenciát,<sup>66</sup> mások viszont jóval alacsonyabb, 11–24%-os átfertőzöttségi arányról számoltak be.<sup>61,63,64</sup> A szeroprevalenciát, a szeropozitív arányát korcsoportonkénti bontásban mutatja az **5. ábra**.

**5. ábra:** HPyV9 szeropozitivitás korcsoportonként



A piros vonal a  $p$  értékkel a korcsoportok közötti szignifikáns különbséget jelöli (Fisher egzakt teszt).

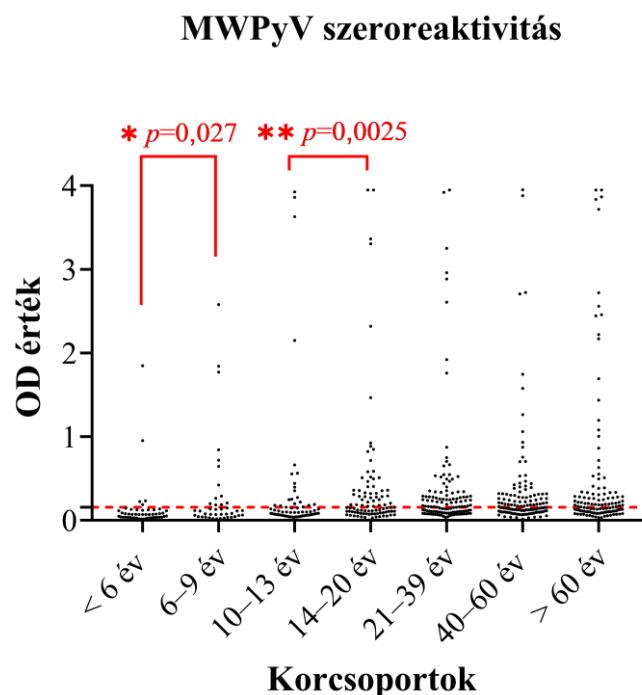
A legfiatalabb, 3 év alatti korcsoportban nem mutattunk ki HPyV9 elleni antitesteket. Az antitest-pozitivitási arány 3 év felett az életkor előrehaladtával a 21–39 éves korcsoportig szignifikánsan növekedett, amit a  $X^2$  trend teszt is alátámasztott ( $p < 0,0001$ ). Hasonlóan a szeroreaktivitáshoz, a 10–13 éves és a 14–20 éves korcsoportok között a szeroprevalencia szignifikáns növekedését tapasztaltuk ( $p = 0,0219$ ; Fisher egzakt teszt.). Annak ellenére, hogy egy német munkacsoport összességében magasabb

szeropozitivitási arányt mért, a trend, a fertőzésen már átesettek arányának növekedése az életkor előrehaladtával nagyon hasonlóan bizonyult az általunk tapasztaltnak.<sup>56</sup> További két tanulmány a gyermekek körében szintén életkorral növekvő szeropozitivitási arányról számolt be.<sup>58,115</sup> A 40 év felettek közt viszonylag stabil szeroprevalencia értéket figyeltünk meg, a 80 év felettek körében azonban — hasonlóan más munkacsoportok adataihoz<sup>58,60,64</sup> — kismértékű csökkenést tapasztaltunk. Nemek közti különbséget az átfertőzöttségi adatokban nem mutattunk ki. Eredményeink alapján a vírus jelen van hazánkban, viszont a felnőttek jelentős aránya is fogékony a vírussfertőzésre.

### 6.1.3. MWPyV szeroprevalencia vizsgálat eredményei

Az MWPyV VP1 fehérjéje elleni IgG antitestet detektáló ELISA cut-off értéke alapján szeropozitívnek azt a mintát tekintettük, amelynek OD értéke meghaladta a 0,157-et. A **6. ábra** az egyes minták OD értékét mutatja korcsoportonkénti bontásban.

**6. ábra:** MWPyV szeroreaktivitás korcsoportonként



A fekete pontok egy-egy szérumminta átlagolt OD értékét jelöli. A szaggatott, piros vonal a szeropozitivitási határértékét mutatja. A piros vonal  $p$  értékkel a korcsoportok közötti szignifikáns különbséget (Mann-Whitney U teszt) jelöli. OD: optikai denzitás

A szeroreaktivitásban szignifikáns eltérést, növekedést a két legfiatalabb korcsoport között ( $p=0,027$ ; Mann-Whitney U teszt), valamint a 10–13 éves és a 14–20 éves korcsoport között ( $p=0,0025$ ) detektáltunk.

Statisztikailag szignifikán OD értékbeli különbséget a gyermekek és a felnőttek korcsoportjai közt mutattunk ki Kruskal-Wallis, Dunn post hoc analízissel (**14. táblázat**). 21 év felett azonban, hasonlóan mások eredményéhez,<sup>60,64</sup> a szeroreaktivitás viszonylag stabilnak bizonyult, az egyes korcsoportok közt szignifikáns eltérést nem mutattunk ki.

**14. táblázat:** MWPyV szeroreaktivitás (OD értékek) többszörös összehasonlítása

Korcsoportok (év)							
	<6	6–9	10–13	14–20	21–39	40–60	>60
<6	ns						
6–9	ns	ns					
10–13	ns	ns	ns				
14–20	****<0,0001	ns	*0,0392	ns			
21–39	****<0,0001	*0,031	**0,0059	ns	ns		
40–60	****<0,0001	*0,0497	*0,0106	ns	ns	ns	
>60	****<0,0001	*0,0116	**0,0016	ns	ns	ns	ns

A Dunn post hoc analízis eredményei. A csillagok és  $p$  értékek statisztikailag szignifikáns különbséget jeleznek. ns: nem szignifikáns ( $p>0,05$ ).

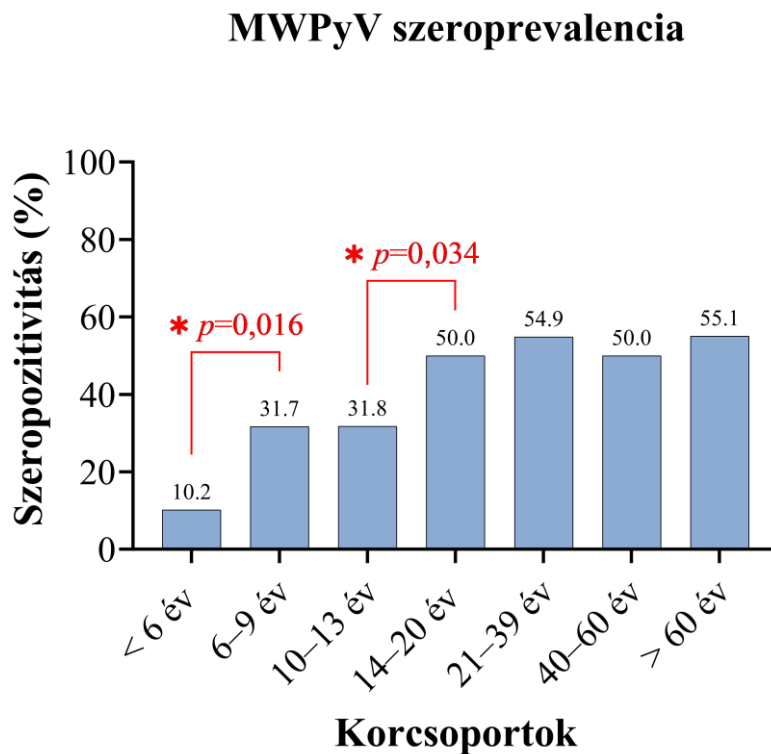
A teljes kohorsz MWPyV szeropozitivitása 45,6% volt, a felnőttek 54%-a, míg a gyermekek 31,9%-a esett át MWPyV fertőzésen.

Bár a nemek aránya a vizsgálati csoportban nem mutatott statisztikailag igazolható eltérést (51,3% vs. 48,7%), a szeropozitivitás a nők körében szignifikánsan magasabb volt a férfiakhoz képest (165/317 vs. 117/301;  $p=0,0012$ ; Fisher egzakt teszt). A gyermekek körében szintén a lányok szignifikánsan nagyobb aránya volt szeropozitív (51/119 vs. 24/116;  $p=0,0003$ ), viszont csak a felnőttek adatait elemezve már nem igazoltunk ilyen nemi különbséget (114/198 vs. 93/185;  $p=0,182$ ). Mivel hasonló eredményeket még nem publikáltak, illetve a terjedési módot sem ismerjük, további vizsgálatok szükségesek, hogy feltárjuk, valóban van-e nemi különbség.

Az MWPyV szeropozitivitási arányokat korcsoportonként a **7. ábra** mutatja. Szignifikáns életkorbeli különbség mutatkozott a szeropozitív (3,1–90 év, medián: 37 év) és a szeronegatív egyének között (0,8–80 év, medián: 22,4 év) a teljes vizsgálati csoportban ( $p=0,0001$ , Mann-Whitney U teszt), valamint a gyermekek esetében is ( $p=0,0009$ ; 3,1–17,5 év, medián: 13,6 év vs. 0,8–17,9 év, medián: 10,6 év). Az antitest-pozitivitási arány szignifikánsan nőtt az életkor előrehaladtával egészen a felnőttkorig, amit a  $X^2$  trend teszt is megerősített ( $p=0,0042$ ). Statisztikailag szignifikáns szeroprevalencia különbséget mutattunk ki a két legfiatalabb korcsoport, valamint a 10–

13 éves és a 14–20 éves korcsoportok között (7.ábra). Ezek az eredmények összhangban állnak az OD értékek szignifikáns növekedésével. A szeroreaktivitáshoz hasonlóan, 21 éves kor felett az antitest-pozitivitási arány nem mutatott jelentős változást (50–55,1%).

7. ábra: MWPyV szeropozitivitás korcsoportonként



A piros vonal és a csillag a korcsoportok közötti szignifikáns különbséget (MannWhitney U teszt) jelöli.

A már publikált MWPyV szeroprevalencia adatok nagyon változóak, 42–98% közötti értékek.<sup>64,106,107</sup> Eredményeink hasonlóak egy olaszországi tanulmányban közölt adatokhoz, bár ők magasabb gyermekkori átfertőzöttségről számoltak be.<sup>106</sup> Egy másik, szintén olasz vizsgálat a 8–17 évesek közt igen magas, 91%-os szeropozitivitási arányt mutatott ki.<sup>107</sup> Egy amerikai tanulmányban tinédzserek és fiatal felnőttek körében a miénkhez hasonló, 50%-os szeropozitivitási arányt detektáltak, a fiatal felnőttkorig növekvő átfertőzöttségi trend is nagyon hasonló az általunk tapasztalthoz. Ugyanakkor felnőttek közt (>20 év) magasabb szeropozitivitási arányt, 65,7%-ot mértek, ami az idősebbek körében csökkenést mutatott.<sup>47</sup> Néhány kutatócsoport jóval magasabb felnőttkori átfertőzöttségi adatot közölt: Csehországban a felnőtt (>20 év)

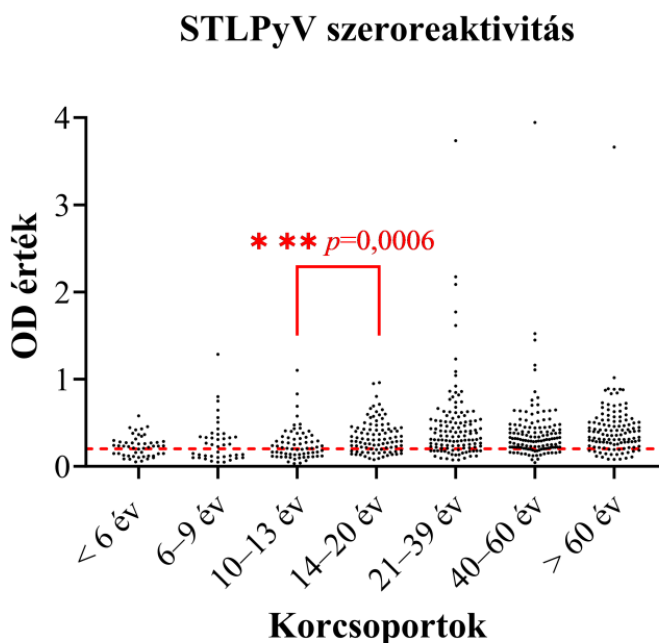
szeroprevalencia 85,6% volt,<sup>60</sup> míg Hollandiában, az USA-ban és Ausztráliában ennél is magasabb, 97%-ot meghaladó.<sup>61,63,64</sup>

Ezek az eltérések magyarázhatók a vizsgálati csoportok, az alkalmazott antigének, illetve a módszerek közötti különbségekkel. A pontosabb és összehasonlíthatóbb adatok érdekében a jövőben további, egységes módszerekkel végzett kutatások szükségesek. Nem kizárt azonban, hogy a vírusnak földrajzilag eltérő szerovariánsai vannak, esetleg tényleges földrajzi különbség van a szeroprevalenciában. A terjedési mód ismerete kulcsfontosságú lenne, mivel a földrajzilag eltérő szociális és kulturális körülmények is okozhatnak átfertőzöttségi különbséget.

#### 6.1.4. STLPyV szeroprevalencia vizsgálat eredményei

Az ELISA cut-off értéke alapján STLPyV szeropozitív volt az a minta, amelynek OD értéke >0,201. Az egyes minták OD értékét életkori csoportonként a **8. ábra** mutatja.

**8. ábra:** STLPyV szeroreaktivitás korcsoportonként



A fekete pontok egy-egy szérumminta átlagolt OD értékét jelölik. A szaggatott, piros vonal a szeropozitivitás határértékét mutatja. A piros vonal  $p$  értékkel a korcsoportok közötti szignifikáns különbséget (Mann-Whitney U teszt) jelöli. OD: optikai denzitás

Szignifikáns szeroreaktivitásbeli növekedést a 10–13 éves és a 14–20 éves korcsoportok között detektáltunk ( $p=0,0006$ ; Mann-Whitney U teszt). Az OD értékek

korcsoportonkénti Kruskal-Wallis, Dunn post hoc analízise az MWPyV esetében tapasztaltakhoz hasonló eredményeket mutatott (**15. táblázat**), vagyis szignifikáns különbséget a különböző életkorú gyermekek és felnőttek csoportjai közt tártunk fel. Fiatal felnőtt korig az életkorral növekvő, 21 éves kor felett pedig viszonylag stabil szeroreaktivitást figyeltünk meg egy korábbi vizsgálathoz hasonlóan.<sup>64</sup>

**15. táblázat:** STLPyV szeroreaktivitás (OD értékek) többszörös összehasonlítása

Korcsoportok (év)							
	<6	6–9	10–13	14–20	21–39	40–60	>60
<6	ns						
6–9	ns	ns					
10–13	ns	ns	ns				
14–20	*0,0138	ns	*0,0243	ns			
21–39	****<0,0001	**0,0023	****<0,0001	ns	ns		
40–60	**0,0011	ns	**0,0015	ns	ns	ns	
>60	****<0,0001	***0,0008	****<0,0001	ns	ns	ns	ns

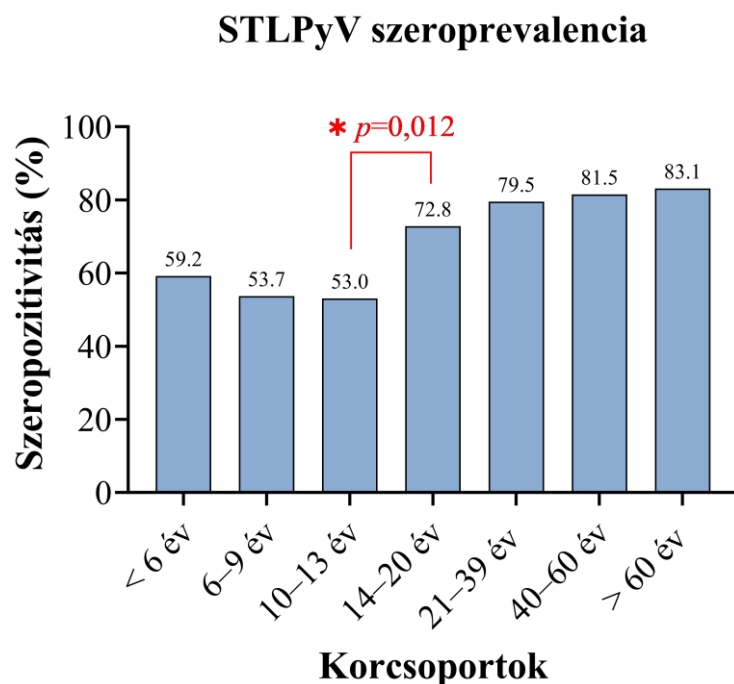
A Dunn post hoc analízis eredményei. A csillagok és  $p$  értékek statisztikailag szignifikáns különbséget jeleznek. ns: nem szignifikáns ( $p>0,05$ ).

A HPyV9-hez hasonlóan az MWPyV és az STLPyV esetében is megvizsgáltuk a keresztreaktivitást. Ez a két vírus a *Deltapolyomavirus* nemzetségbe tartozik, VP1 fehérjék aminosav szekvenciája 56% azonosságot mutat. Mivel a két vírus szeroprevalencia vizsgálata teljesen azonos mintaállománnyal történt, így a két VP1 fehérjére adott szeroreaktivitás közti összefüggést vizsgáltuk. A Spearman rangkorreláció ugyan szignifikáns ( $p<0,0001$ ), de igen gyenge ( $r=0,293$ ) korrelációt tárt fel az MWPyV és STLPyV OD értékek közt. Néhány kiválasztott szérummintával megvizsgáltuk, hogy a mért ELISA pozitivitás antigénspecifikus volt-e. A szérummintákat előinkubáltuk a homológ vagy heterológ antigének 20-szoros feleslegével, majd ezt követően végeztük el az ELISA méréseket. A homológ VP1 antigénnel történő előinkubálás az OD értékek szignifikáns csökkenését eredményezte, a minták szeronegatívvá váltak. A heterológ VP1 antigénnel történő előinkubálás esetében nem változott érdemben a minták szeroreaktivitása. Ez alapján megállapítható, hogy más kutatócsoportokhoz hasonlóan<sup>111,116</sup> az MWPyV és az STLPyV elleni szeroreaktivitás kellően specifikus az adott vírusra.

Az STLPyV szeropozitivitás a teljes vizsgálati csoportban 73,5% volt. A gyermekek körében 60,9%, míg a felnőttek esetében 81,2% volt a szeropozitivitási arány. A teljes kohorszban a szeropozitív alanyok (0,8–90 év, medián: 35 év) életkora szignifikánsan

( $p=0,0001$ ; Mann-Whitney U teszt) magasabb volt a szeronegativakéhoz képest (0,9–80 év, medián: 16,7 év), viszont ilyen életkori különbséget a gyermekek és a felnőttek adatainak elemzésekor nem tártunk fel. Az összes vizsgált személy adatait elemezve megállapítottuk, hogy a nők közt a fertőzésen már átesettek aránya szignifikánsan magasabb a férfiakéhoz képest (245/317 vs. 209/301;  $p=0,029$ ), azonban ezt a nemi különbséget sem a gyermekek, sem a felnőttek körében nem tapasztaltuk. Más kutatócsoportok hasonló megfigyelésről nem számoltak be. Az életkor szerinti szeropozitivitási adatok a **9. ábrán** láthatók.

**9. ábra:** STLPyV szeroprevalencia korcsoportonként



A piros vonal a  $p$  értékkel a korcsoportok közötti szignifikáns különbséget (Mann-Whitney U teszt) jelöli.

Hasonlóan más tanulmányok adataihoz,<sup>110,111</sup> a 6 évesnél fiatalabb korcsoportban az STLPyV szeropozitivitás közel 60% volt, vagyis a primer fertőzés gyermekkorban gyakori. A páronkénti elemzéssel a szeropozitivitási arány szignifikáns növekedését ( $p=0,012$ ; Mann-Whitney U teszt) a 10–13 és 14–20 évesek közt figyeltünk meg. A fertőzésen átesettek aránya az életkor előrehaladtával nőtt, a legmagasabb, 83,1%-os értéket a 60 év felettek korcsoportjában mértük. Bár az eddigi néhány tanulmány némiképp eltérő átfertőzöttségi mértéket, 68%–98% szeropozitivitást tárt fel,<sup>64,110,111</sup> eredményeink hasonlóak, és alátámasztják, hogy az STLPyV ubikviter vírus.

## 6.2. DNS prevalencia vizsgálatok eredményei

### 6.2.1. HPyV9 DNS prevalencia

A HPyV9 átvitelének módja még nem ismert. Mivel a munkacsoportunk korábbi vizsgálata során a légúti mintákban HPyV9 DNS-t mutatott ki,<sup>70</sup> nem zárható ki, hogy akár a szájüreg, akár a légút potenciális behatolási kapu lehet. A már említett, három esetet feldolgozó tanulmány szintén detektált vírust a szájüregből.<sup>71</sup> A BK és JC polyomavírusokhoz hasonlóan feltételezhető,<sup>16,17</sup> hogy a másodlagos nyirokszövetekben a vírus replikálódhat, perzisztens fertőzés alakulhat ki, akár a tüdőt is megfertőzheti. Ezért DNS prevalencia vizsgálatainkban a légúti minták vizsgálatára összpontosítottunk.

Ugyan megfelelő minőségű és mennyiségű DNS-t sikerült izolálni a formalinnal fixált, paraffinba ágyazott tüdőszöveti mintákból, a HPyV9 DNS-t nem detektáltuk sem a daganatos, sem a nem tumoros szöveti mintákban. Ezidáig egyetlen munkacsoport mutatta ki a HPyV9 DNS-t tüdő boncolása során vett szövetmintából. Sőt, virális mRNS-t is detektáltak, ami arra utal, hogy a vírus ezen szövetekben képes replikálódni.<sup>71</sup> Ezt megerősítő eredményeket azonban még nem publikáltak.

Az orr- és garatmandula műtétek során gyűjtött mintáink vizsgálata során a HPyV9 DNS-t sem középfül-, sem torokváladékból, sem orrmandulából nem mutattuk ki. Azonban egy 6 éves fiú garatmandulájából detektáltuk a vírust (1/100; 1%), 34 kópia HPyV9 DNS-t 1000 ng izolált nukleinsavból. A virális DNS mennyisége alapján nem állapítható meg, hogy aktív vírusreplikáció zajlott-e. A teljes vírusgenomot amplifikáltuk és szekvenáltuk (GenBank azonosító: MH844627). Több kutatócsoport is vizsgálta a vírus jelenlétét garatmandulákban,<sup>85-87</sup> azonban mindössze egy francia csoport mutatta ki a HPyV9 DNS-t szintén a minták 1%-ában.<sup>78</sup> További vizsgálatok szükségesek a másodlagos limfoid szövetek HPyV9 patogenezisében betöltött szerepének tisztázásához.

A COVID-19 világjárvány alatt gyűjtött orrgarati minták 5,2%-ában mutattuk ki a HPyV9 DNS-ét  $<250-5,4 \times 10^4$  (medián  $5,35 \times 10^2$ ) kópia/mL mennyiségben. Valamennyi valós idejű PCR pozitív mintából sikeresen amplifikáltuk és szekvenáltuk a vírus LTA<sub>g</sub> szekvenciárészletét is, megerősítve ezzel az eredményeket. A részletes adatokat a **16. táblázat** tartalmazza.

16. táblázat: HPyV9 DNS prevalencia orrgarati mintákban

	SARS-CoV-2 RNS negatív		SARS-CoV-2 RNS pozitív		Összes minta	
	Mintaszám / összes mintaszám (%)	Életkor: min-max (medián); év	Mintaszám/összes mintaszám (%)	Életkor: min-max; (medián) év	Mintaszám / összes mintaszám (%)	Életkor: min-max (medián) ; év
<b>HPyV9 DNS pozitív (%)</b>	47/516 (9,10%)	2,1–38,6 (27,7)	1 /403 (0,25%)	2,4	48/919 (5,2%)	2,1-28,6 (27,1)
<b>HPyV9 DNS negatív (%)</b>	469/516 (9,8%)	1,1–92 (32,5)	402/403 (99,7%)	0,8–89,8 (35,6)	871/919 (94,8%)	0,8-92 (33,9)
<b>Összes</b>	516	1,1-92 (31)	403	0,8-89,8 (35,5)	919	0,8-92 (32,8)

A HPyV9 DNS prevalencia szignifikánsan ( $p < 0,0001$ ; Fisher egzakt teszt) magasabb volt a SARS-CoV-2 RNS negatív légúti mintákban (9,11%), mint a SARS-CoV-2 RNS pozitívokban (0,25%). A HPyV9 DNS pozitív betegcsoport életkora szignifikánsan ( $p = 0,0139$ ; Mann-Whitney U teszt) alacsonyabb volt a HPyV9 DNS negatívakéhoz képest, a HPyV9 pozitív minták 79%-a (38/48) 21–40 év közötti felnőttektől származott. A HPyV9 DNS-t ugyan nagyobb arányban mutattuk ki felnőttek mintáiból (6,16%, 40/649), mint a gyermekekéből (2,96%, 8/270), ez a különbség nem bizonyult szignifikáns eltérésnek ( $p = 0,0508$ ; Fisher egzakt teszt). Nemek közötti eltérés nem volt kimutatható. Érdekes, hogy a 2016-ban gyűjtött 146 toroktörletből nem mutattunk ki HPyV9 DNS-t. Az, hogy eltérő mintatípusban (toroktörlet vs. orrgarati minta) vizsgáltuk a vírus jelenlétét nem magyarázat erre, mivel a munkacsoportunk korábban toroktörlet mintákban is detektálta a HPyV9 DNS-t.<sup>70</sup> Ebben a csoportban mindössze 20 minta származott 40 év alatti felnőttektől. Rajtunk kívül egy további kutatócsoport detektált HPyV9 DNS-t felnőttek torokgargalizálással vett mintáinak 2,2%-ában.<sup>78</sup> Két másik kutatás azonban negatív eredménnyel zárult, amelyek során légúti tünetekkel rendelkező és tünetmentes személyektől vett különféle légúti mintákban (nazofaringeális aspirátumban, tamponnal vett orr- és torokváladékban, bronchoalveoláris mosófolyadékban, köpetben) vizsgálták a vírus jelenlétét.<sup>85,86,88</sup> Az, hogy a koronavírus világitvány alatt gyűjtött mintáinkból az eddigi eredményekhez képest magasabb HPyV9 prevalenciát mutattunk ki, külön érdekes. A minták olyan időszakból származtak,

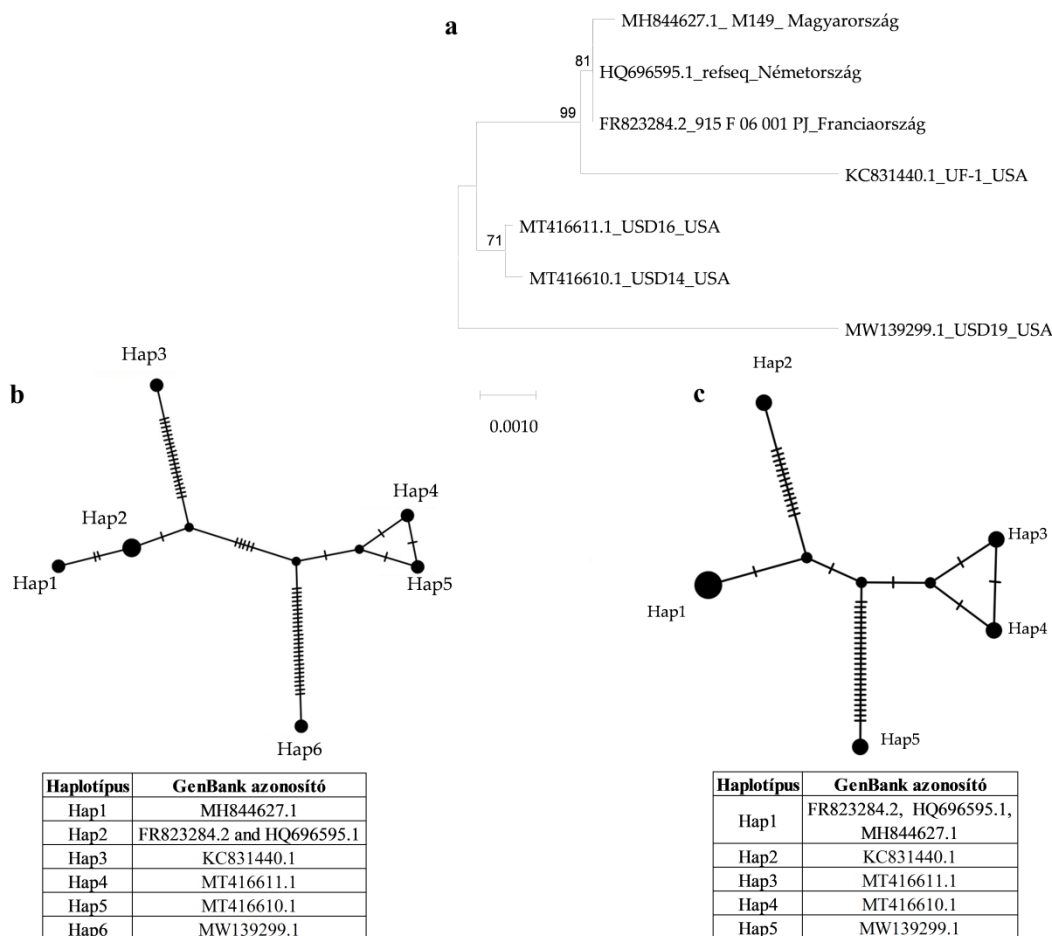
amikor a vírusok terjedését általánosságban jelentősen gátolták a korlátozó intézkedések, iskola és óvodai bezárások, kijárási tilalmak. Bár eredményeink alapján úgy tűnik, a HPyV9 jelen lehet a légútban, a légúti nyirokszervben, további vizsgálatok szükségesek a vírus terjedési módjának, a replikáció helyének megismeréséhez.

### 6.2.2. HPyV9 szekvenenciaanalízis eredményei

Jelenleg az általunk publikálttal együtt mindössze hét teljes HPyV9 genom szekvenciája érhető el a GenBank adatbázisban, amelyekkel filogenetikai és haplotípus hálózat elemzést végeztünk (**10. ábra**). A haplotípus hálózat elemzés alkalmas a genomok rövid távú diverzifikációjának megjelenítésére. Az elemzést a teljes genomokra (**10.b ábra**) és külön az NCCR szekvenciákra (**10.c ábra**) is elvégeztük.

Mind a filogenetikai fa, mind a haplotípus hálózat elemzés alapján a genomok négy klasztere különült el. Az európai izolátumok egy klasztert alkottak. Az NCCR szekvenciák elemzése alapján (**10.c ábra**) a referencia szekvencia (refseq; GenBank: HQ696595.1), a 915 F 06 001 PJ (GenBank: FR823284.2) és az M149 izolátum (GenBank: MH844627.1) egy haplotípus (Hap 1). Az USD14 (GenBank: MT416610.1) és USD16 (GenBank: MT416611.1) izolátumok elkülönülő haplotípusok (Hap4 és Hap3), és egy-egy elkülönülő klasztert alkotnak. Az UF-1 (GenBank: KC831440.1) és USD19 (GenBank: MW139299.1) izolátumok NCCR szekvenciája mutatja a legnagyobb variációt, mindkettő elkülönül a többi szekvenciától a filogenetikai fán és a haplotípus hálózatban is (Hap2 és Hap5). Az általunk leírt genomszekvencián kívül az összes többi HPyV9 genom immunszuppresszált betegtől származott, akik vesetranszplantáción, tüdőtranszplantáción estek át, Merkel sejt carcinomában vagy AIDS-ben szenvedtek.<sup>67,71</sup> A BKPyV esetében ismert, hogy az immunszuppresszió fokozott vírusreplikációt eredményezhet, ami növeli az NCCR mutációs rátáját.<sup>54</sup> Az új variánsok átrendeződött NCCR szekvenciái tovább fokozhatják a vírus replikációját. Ugyanezt feltételezhetjük a HPyV9 esetében is. Ezért a vírus megismerése érdekében nemcsak további HPyV9 szekvenciák gyűjtése és elemzése fontos, hanem azok biológiai tulajdonságainak *in vitro* és *in vivo* megismerése is.

## 10. ábra: HPyV9 teljes genomjának és NCCR szekvenciájának elemzése



HPyV9 genomok filogenetikai elemzése (a), valamint a HPyV9 teljes genomok (b) és NCCR szekvenciák (c) haplotípus hálózata. A maximum-likelihood filogenetikai fa MEGA X programmal Tamura-Nei modellel készült (1000 bootstrap ismétlés), a haplotípus hálózatok pedig a PopART programmal. A táblázatokban az egyes haplotípusokhoz tartozó szekvenciák GenBank azonosítói szerepelnek. A körök mérete az azonos haplotípusba tartozó minták számához igazított. A vonalak hossza a haplotípusok genetikai távolságára utal. A haplotípusokat összekötő vonalakat metsző kis vonalak a mutációs lépéseket jelölik. NCCR: nem kódoló kontroll régió.

### 6.2.3. MWPyV DNS prevalencia

Az MWPyV esetleges légúti terjedését szintén a két eltérő időszakban vett mintacsoportban tanulmányoztuk. Eredményeinket a **17. táblázat** összesíti. Vizsgáltuk, hogy a légút másodlagos nyirokszerveiben, orr- és garatmandulában jelen van-e a vírus DNS-e. Sem orr-, sem garatmandulából nem detektáltuk a vírus nukelinsavát. Ezzel szemben két kutatócsoport mindössze néhány mintában, de igazolta az MWPyV DNS jelenlétét a garatmandulák 2%-ában, illetve 6%-ában, míg az orrmandulák 1%-ában.<sup>86,105</sup>

Két másik tanulmány azonban a miénkhez hasonlóan, negatív eredménnyel zárult.<sup>78,87</sup> Mintáink esetében a preanalitikai hibákat, így a nukleinsav izolálás sikertelenségét kizárjuk, mivel ugyanezen mintákból más polyomavírusokat viszonylag nagy arányban detektáltunk korábban.<sup>117</sup> Az eltérések valószínűbb magyarázata a vírus alacsony prevalenciája, illetve földrajzi vagy populációs különbségek lehetnek. Így további, nagyobb mintaszámú vizsgálatra van szükség a mandulák vírusreplikációban betöltött szerepének tisztázására. Ugyanakkor mandulaműtét során vett egy középfül váladékban, illetve a torokváladékok 2,7%-ában mutattuk ki az MWPyV DNS-t. Valamennyi pozitív minta gyermekektől származott.

A koronavírus világjárvány alatt gyűjtött orrgarati minták 4,9%-ában detektáltunk MWPyV DNS-t. Ez ugyan magasabb DNS prevalencia a mandulatműtétek során vett torokváladék mintáink eredményéhez képest, azonban statisztikailag nem szignifikáns a különbség (55/1130 vs. 4/146;  $p=0,3007$ ; Fisher egzakt teszt). Az MWPyV prevalencia szignifikánsan ( $p<0,0001$ ) magasabb volt a gyermekek (38/360) körében, mint a felnőttek (17/770) között. Emellett szignifikáns életkori különbséget is kimutattunk az MWPyV pozitív (0,8–38 év, medián: 3,6 év) és negatív egyének (1–92 év, medián: 32,2 év) között ( $p=0,0001$ ; Mann-Whitney U teszt), pozitív mintákat fiatalabb személyek esetén azonosítottunk. Nemi különbséget nem tártunk fel. Más kutatócsoportok sem vesetranszplantáltaktól, sem légúti tüneteket mutató vagy mandulaműtéten áteső személyek légúti mintáiból nem mutatták ki a vírust. A vizsgált, különböző mintatípusok, orrgarati, orr- és toroktampon, valamint toroköblítő folyadék mindegyike felnőttektől származott.<sup>29,80</sup> Az általunk megfigyelt, gyerekek közt mértnél alacsonyabb, 2,2% felnőttkori DNS prevalencia összhangban áll a szeroprevalencia eredményeinkkel. Átfertőzöttségi adataink alapján a primer fertőzések nagy része fiatal felnőttkorig lezajlik, azonban a felnőtt populáció igen nagy része továbbra is fogékony marad a fertőzésre. A gyermekek légúti mintáiban detektált MWPyV DNS prevalencia adataink hasonlóak a világ különböző pontjairól publikált adatokhoz. Mexikóból 0,74%,<sup>100</sup> Ausztráliából 1,5%,<sup>80</sup> Kínából 1,47%,<sup>101</sup> míg Brazíliából 2,1%<sup>102</sup> MWPyV DNS pozitívítást közöltek légúti tünetes gyermekektől vett légúti mintából. Érdekes, hogy az Ausztrál tanulmányban a tünetmentesek mintáinak nagyobb aránya, 9,2%-a volt MWPyV pozitív.<sup>80</sup>

A COVID-19 pandémia alatt gyűjtött nazofaringeális mintákban vizsgáltuk a SARS-CoV-2 és az MWPyV együttes jelenlétét is. A MWPyV DNS pozitívítás szignifikánsan gyakoribb volt a SARS-CoV-2-negatív betegek körében (41/565), mint a SARS-CoV-2-

pozitívak között (14/565) a teljes kohorszban (7,3% vs. 2,5%;  $p=0,0003$ ), illetve a felnőttek közt is (17/385 vs. 0/385;  $p<0,0001$ ), Gyermekek körében is gyakrabban mutattuk ki az MWPyV DNS-t SARS-CoV-2 RNS negatív légúti mintákban (24/180) a SARS-CoV-2 RNS pozitívakhoz képest (14/180), ám a különbség statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak ( $p=0,122$ ).

Mivel 919 mintából a HPyV9 jelenlétét is vizsgáltuk, így a kettős polyomavírus fertőzést is analizáltuk. Hat mintában mutattuk ki a HPyV9 és az MWPyV DNS-t is (6/919; 0,65%), vagyis a MWPyV pozitív minták 10,9%-ában (6/55) volt jelen mindkét polyomavírus. A minták közül 4 gyermektől (2,1–5, 3 év; medián: 2,3 év), 2 pedig felnőttől származott (30,1 és 30,6 év). Az egyik gyermeknek (2,4 éves) SARS-CoV-2 fertőzése is volt a mintavételkor, a többiek légúti mintája SARS-CoV-2 RNS negatív volt.

**17. táblázat:** MWPyV DNS prevalencia vizsgálat eredménye

		<b>Mintaszám/ összmintaszám (%)</b>	<b>Nő/Férfi</b>	<b>Életkor: min-max (medián); év</b>
	<b>orrmandula</b>	0/100	-	-
	<b>garatmandula</b>	0/100	-	-
	<b>toroktörlet</b>	4/146 (2,7%)	1/3	3,4–7,1 (5)
	<b>középfülváladék</b>	1/15 (6,7%)	1/0	5,2
<b>Orrgarati minták</b>	<b>SARS-CoV2 RNS pozitív</b>	14/565 (2,5%)	8/6	0,8–16,7 (2,3)
	<b>SARS-CoV-2 RNS negatív</b>	41/565 (7,2%)	20/21	0,9–38 (8,6)
	<b>Összes</b>	55/1130 (4,9%)	28/27	0,8–38 (3,6)

Az MWPyV patogenezise, terjedési módja, behatolási kapuja, a replikáció helye továbbra is ismeretlen, ahogy azt sem tudjuk, látens fertőzés létrejön-e a szervezetben. A vírust először székletmintákból írták le, azóta több publikáció közölt prevalencia adatokat székletből. A legmagasabb pozitivitási arány 12,8% volt. Mindezek alapján feltételezhető a fekál-orál módon történő terjedés is.<sup>28,80,101</sup> Ugyanakkor az a tény, hogy az MWPyV DNS-ét orrgarati mintákban is kimutattuk felveti, hogy a vírus légúti módon is terjedhet. Érdekes, hogy az MWPyV DNS-ét egy középfülváladékban is detektáltuk, ami arra utal, hogy a vírus eljuthat a középfülbe. Ennek tisztázásához további vizsgálatokra és nagyobb

számú minta elemzésére lenne szükség. Más fertőző ágenseket nem vizsgáltunk a mintákból, így nem elemeztük az MWPyV és a betegek tünetei közötti összefüggést, ahogy a SARS-CoV-2 által okozott tünetek és a kettős vagy többszörös polyomavírus fertőzés közti összefüggéseket sem.

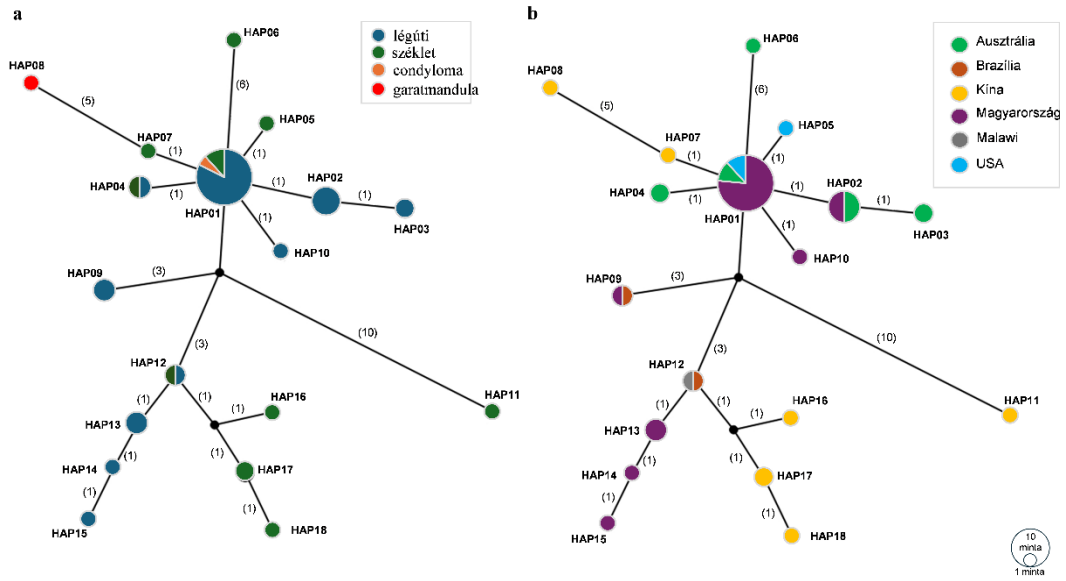
#### **6.2.4. MWPyV szekvenanciaanalízis eredményei**

A teljes NCCR régiót 21 MWPyV pozitív mintából amplifikáltuk és szekvenáltuk (GenBank azonosítók: PP346854–PP346874). Az NCCR szekvenciákat a GenBankban elérhető, korábban publikált 22 szekvenciával összehasonlítva elemeztük. Nyolc új NCCR szekvenciavariánst azonosítottunk (W317, P839, H284, 6452, C1049, C1062, H230 és W578, amely identikus a C666-tal), míg a többi izolátum egy vagy több már ismert szekvenciával egyezett meg. Négy új pontmutációt írtunk le, míg egy izolátumban, a H230-ban (GenBank: PP346859) egy 13 bázispáros deléciót.

Bár az MWPyV NCCR szekvencia varianciáinak biológiai jelentősége még nem tisztázott, feltételezhető, hogy ezek a mutációk befolyásolhatják a transzkripciós faktor kötőhelyeket, valamint a promoterek és enhancerek működését.<sup>54</sup> Haplotípus hálózatelemzéssel vizsgáltuk, hogy az NCCR szekvenciavariációk összefüggenek-e a mintatípusokkal, amelyekből izolálták, így a lehetséges replikációs helyekkel, és/vagy a földrajzi régióval, ahonnan származnak. Azonban a haplotípusok sem a mintatípusokkal, sem a földrajzi régióval nem mutattak összefüggést, a haplotípusok ilyen paraméterek szerint nem rendeződtek klaszterekbe (**11. ábra**).

Az NCCR kulcsszerepet játszik a transzkripció, a vírusreplikáció szabályozásában, és abban is, hogy mely sejtek permisszívek a vírus számára.<sup>54</sup> További szekvenciák gyűjtése, elemzése, a transzkripciós faktor kötőhelyek azonosítása igen fontos, hiszen az eredmények segíthetnek *in vitro* modellek tervezésében, a permisszív sejtek azonosításában, a vírusreplikáció tanulmányozásában.

11. ábra: MWPyV NCCR szekvenciák hálózatelemzése



Haplotípus	GenBank azonosító
HAP01	JX262162
	PP346854
	PP346859
	PP346860
	PP346861
	PP346862
	PP346863
	PP346864
	KC549588
	KC549591
	PP346866
	PP346867
	PP346873
	PP346874
	PP346872
	TEDDY01
	PP346868

Haplotípus	GenBank azonosító
HAP02	PP346871
	PP346855
HAP03	KC549590
	KC549592
HAP04	KC549593
	KC549594
HAP05	KC549586
HAP06	KC549589
HAP07	JQ898292
HAP08	KC549587
HAP09	KC571700
	KR338953
HAP10	PP346858
	OP910239
HAP11	PP346856
HAP12	KC571705

Haplotípus	GenBank azonosító
HAP12	OP910238
	NC_018102
HAP13	PP346857
HAP14	PP346870
HAP15	PP346865
HAP16	PP346869
HAP17	KC571701
	KC571702
HAP18	KC571703
	KC571704

A haplotípus hálózatok PopART programmal készültek. A körök mérete az azonos haplotípusba tartozó minták számához igazított. Az ábrákon a különböző színek különböző mintatípust (a), illetve különböző földrajzi helyet (b) jelentenek. A vonalak hossza a haplotípusok genetikai távolságára utal, a zárójelben szereplő számok a mutációs lépéseket jelölik. A táblázatban az egyes haplotípusokhoz tartozó génbanki azonosítók szerepelnek.

### 6.2.5. STLPyV DNS prevalencia

A mandulaműtét során gyűjtött mintáink vizsgálatakor az STLPyV DNS-t a toroktörletek 3,4%-ában mutattuk ki. Továbbá egy-egy középfül váladékból (6,7%) és orrmandulából (1%) is detektáltuk a vírust, sőt, ezen két beteg esetében az ugyanakkor vett toroktörlet is STLPyV DNS pozitívnak bizonyult. Minden polyomavírus pozitív minta gyermekektől származott. Garatmandulából nem mutattuk ki az STLPyV-et. A koronavírus világjárvány alatt gyűjtött orrgarati minták 1,4%-a bizonyult STLPyV DNS pozitívnak. Eredményeinket a **18. táblázat** összegzi.

Az STLPyV pozitivitás szignifikánsan magasabb ( $p < 0,0001$ ) volt a gyermekek légúti mintájában (13/360, 3,6%), mint a felnőttekben (3/770, 0,4%). Szignifikáns életkori különbséget mutattunk ki ( $p = 0,0001$ ) az STLPyV negatív (1,3–28,5 év, medián: 4,5 év) és STLPyV pozitív (0,8–92 év, medián: 30,7 év) egyének között, a vírus DNS a fiatalabbak, főként gyermekek mintáiban volt jelen. Nemi különbséget nem tártunk fel.

**18. táblázat:** STLPyV DNS prevalencia vizsgálat eredménye

		Mintaszám/ összmintaszám (%)	Nő/Férfi	Életkor: min-max (medián); év
	<b>orrmandula</b>	1/100 (1%)	1/0	4
	<b>garatmandula</b>	0/100	-	-
	<b>toroktörlet</b>	5/146 (3,4%)	3/2	2,7–4 (3,6)
	<b>középfülváladék</b>	1/15 (6,7%)	0/1	3,6
<b>Orrgarati minták</b>	<b>SARS-CoV2 RNS pozitív</b>	2/565 (0,4%)	0/2	0,8 és 16,7
	<b>SARS-CoV-2 RNS negatív</b>	14/565 (2,5%)	5/9	1,3–28,5 (5)
	<b>Összes</b>	16/1130 (1,4%)	5/11	1,3–28,5 (4,5)

A SARS-CoV-2 társfertőzést a teljes kohorszban elemezve megállapítottuk, hogy STLPyV szignifikánsan ( $p = 0,0039$ ) nagyobb arányban volt jelen a SARS-CoV-2 RNS negatív légúti mintákban, mint a SARS-CoV-2 pozitívokban. Sőt, ugyanilyen, szignifikáns különbséget tapasztaltunk a gyermekek légúti mintáit analizálva (11/385 vs.

2/358;  $p=0,01$ ). A három STLPyV pozitív felnőtt minta SARS-CoV-2 negatív egyéntől származott.

Az MWPyV prevalenciájához képest az STLPyV-é szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a teljes vizsgálati csoportban (4,9% vs. 1,4%;  $p<0,0001$ ), a gyermekek (10,6% vs. 3,6%;  $p=0,0004$ ) és a felnőttek (2,2% vs. 0,4%;  $p=0,0024$ ) körében is. MWPyV és STLPyV koinfekciót hét mintában (7/1130; 0,6%) mutattunk ki, négy minta gyermektől, három pedig felnőttől származott. Az STLPyV pozitív minták 43,8%-ában az MWPyV DNS is jelen volt, míg a SARS-CoV-2 társfertőzés csak a minták 1,3%-ában (2/16). Mindössze egy mintában (1/16; 6,3%) volt kimutatható mindhárom vírus. Egy gyermek (3,2 év) esetében HPyV9 és STLPyV DNS is jelen volt a SARS-CoV-2 RNS negatív légúti mintában.

Az STLPyV-ről igen keveset tudunk, mivel csak néhány publikáció tartalmaz prevalenciaadatokat, patogenezise teljesen feltáratlan. A vírus DNS-ét különböző vizsgálatok során székletmintákban kimutatták, ezért ahogy MWPyV esetében, úgy az STLPyV kapcsán is felmerül a fekál-orál módon történő átvitel lehetősége.<sup>99,108</sup> Ezidáig mindösszesen csak két tanulmány számolt be a légúti minták vizsgálatáról. A vírus leírói vesetranszplantált felnőttektől vett orrgarati mintákban nem mutatták ki az STLPyV DNS-ét.<sup>29,96</sup> Egy ausztrál csoport azonban egyetlen vesetranszplantált beteg tamponnal vett orr- és torokváladékából STLPyV pozitivitást publikált.<sup>96</sup> Mandulaszövetet két csoport tanulmányozott: egyikük gyermekektől származó garatmandulák 2%-ában azonosította az STLPyV DNS-t,<sup>86</sup> a másik csoport azonban felnőttek garatmandulájában nem mutatta ki a vírust.<sup>87</sup>

Eredményeink alapján az STLPyV légúti terjedése felmerül, sőt, a vírus a középfülbe is behatolhat. További, nagyobb mintaszámú vizsgálat szükséges a kérdés tisztásához. Vizsgálatunk alapján várhatóan nagy arányban egyéb polyomavírusok, sőt, más légúti vírusok is jelen lehetnek a mintákban, a patogenezis, a tüneti összefüggések vizsgálatához a társfertőzők vizsgálata is szükséges.

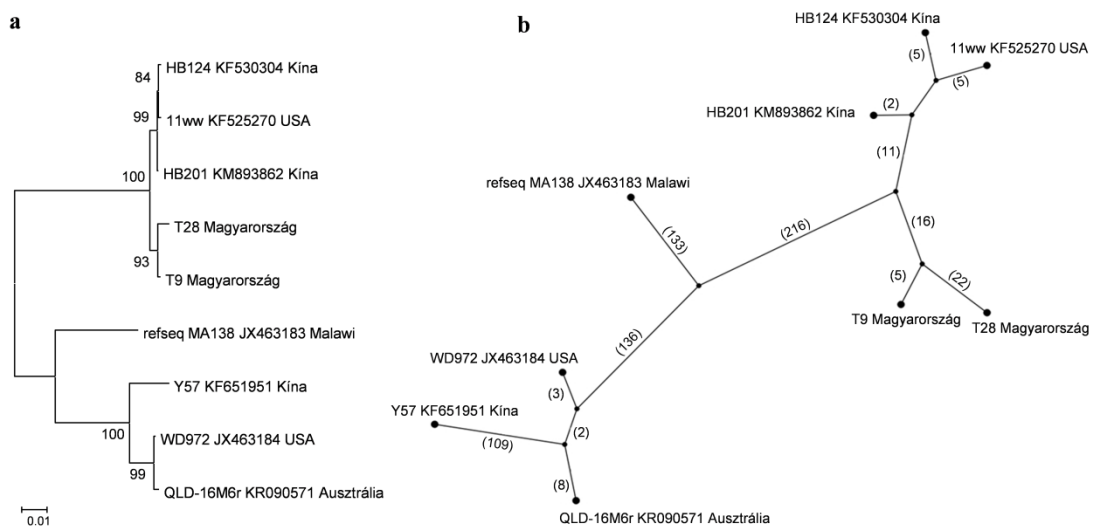
#### **6.2.6. STLPyV szekvenenciaanalízis eredményei**

A különböző kutatócsoportok által közölt, eltérő szeroprevalencia adatok mögött az is állhat, hogy a vírusnak különböző, akár földrajzilag is elkülönülő genotípusai és szerotípusai lehetnek. A BK és JC polyomavírusok esetében is megfigyelhetők ilyen földrajzi különbségek,<sup>55</sup> és hasonló variabilitás merült fel az MCPyV kapcsán is.<sup>118,119</sup>

Munkánk során két teljes STLPyV genomot szekvenáltunk (GenBank azonosítók: PP549201 és PP549202), majd a GenBank további 7 szekvenciájával együtt filogenetikai és hálózatelemzést végeztünk (**12. ábra**).

Mind a filogenetikai fa (**a**), mind a hálózatelemzés (**b**) alapján a szekvenciák két fő ágra oszlottak. Földrajzi elkülönülést azonban nem igazoltunk, mivel ugyanazon régióból származó minták mindkét ágban megtalálhatóak. Jelenleg túl kevés szekvencia áll rendelkezésre, hogy végleges következtetéseket vonjunk le, így további szekvenciák gyűjtésére van szükség különböző földrajzi régiókból a genotípusok földrajzi eloszlásának pontosabb megértéséhez.<sup>118,119</sup>

**12. ábra:** STLPyV teljes genomok filogenetikai és hálózat analízise



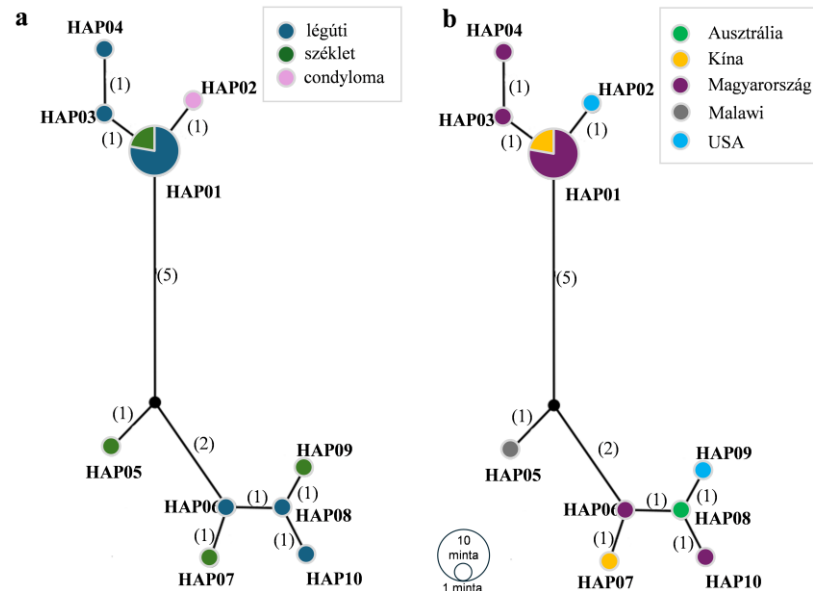
A filogenetikai elemzések az összes rendelkezésre álló STL genomszekvencia felhasználásával készültek. A maximum-likelihood filogenetikai fa MEGA X programmal Tamura 3-paraméter modellel (1000 bootstrap ismétlés) készült (**a**). A hálózatelemzést PopART programmal végeztük (**b**). A vonalak hossza a haplotípusok genetikai távolságára utal, a zárójelben szereplő számok a mutációs lépéseket jelölik.

Teljes NCCR régiót 11 STLPyV pozitív mintából amplifikáltuk és szekvenáltuk (Genbank azonosítók: PP407403–PP407411), majd az MWPyV-hez hasonlóan az adatbázis nyolc további szekvenciájával együtt elemeztük.

Három új variánst (H566, T28, és T9) és három új pontmutációt azonosítottunk. A többi nyolc szekvencia megegyezett a korábban leírt izolátumokéval. A haplotípus

hálózatelemzés eredményei (**13. ábra**) hasonlóak az MWPyV esetében tapasztaltakhoz. Az STLPyV NCCR szekvenciák két csoportba rendeződtek, azonban földrajzi és mintatípus szerinti elkülönülést STLPyV esetében sem tapasztaltunk.

**13. ábra:** STLPyV NCCR szekvenciák hálózatelemzése



Haplotípus	GenBank azonosító
Hap01	KF530304
	KM893862
	PP407403
	PP407404
	PP407405
	PP407408
	PP407407
	PP407410
	PP407411

Haplotípus	GenBank azonosító
Hap02	KF525270
Hap03	PP549202
Hap04	PP549201
Hap05	NC_020106
Hap06	PP407406
Hap07	KF651951
Hap08	KR090571
Hap09	JX463184
Hap10	PP407409

A körök mérete az azonos haplotípusba tartozó minták számához igazított. Az ábrákon a különböző színek különböző mintatípust (**a**), illetve különböző földrajzi helyet (**b**) jelentenek. A vonalak hossza a haplotípusok genetikai távolságára utal, a zárójelben szereplő számok a mutációs lépéseket jelölik. A táblázatban az egyes haplotípusokhoz tartozó génbanki azonosítók szerepelnek.

A vírus megismeréséhez nélkülözhetetlenek a további vizsgálatok, a DNS prevalencia adatok és további szekvenciák gyűjtése is.

### 6.3. HPyV9 *in vitro*, funkcionális genomvizsgálata

A polyomavírusok nem kódoló, kontroll régiója kulcsszerepet játszik a vírus géneexpressziójának és replikációjának szabályozásában. Az NCCR promotereinek és enhancereinek szabályozó funkciója erősen függ azok szekvenciájától, illetve transzkripciós faktorokkal és a virális szabályozó fehérjékkel való kölcsönhatásaitól.<sup>54</sup> Még ha egy sejt fogékony is a vírusfertőzésre, annak permisszivitását és a produktív vírusfertőzés lehetőségét ezek a kölcsönhatások határozzák meg. A HPyV9 promoterek különböző sejttypusokban történő funkcionális analízise segíthet azonosítani azokat a célsejteket, amelyekben a vírus replikálódhat. A különböző NCCR szekvenciák korai és késői promoter aktivitásainak összehasonlítása segíthet megérteni a szabályozó szekvenciák mutációinak hatásait.

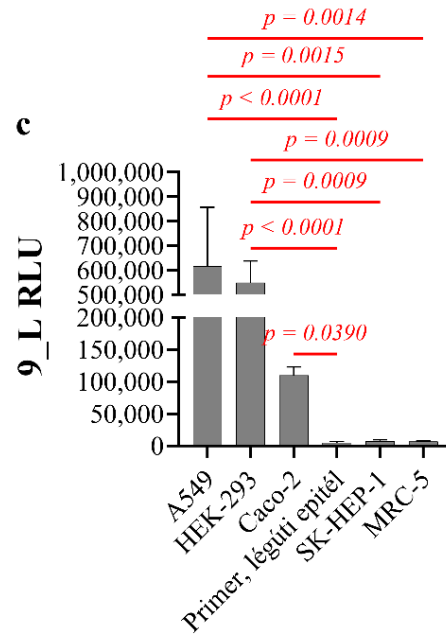
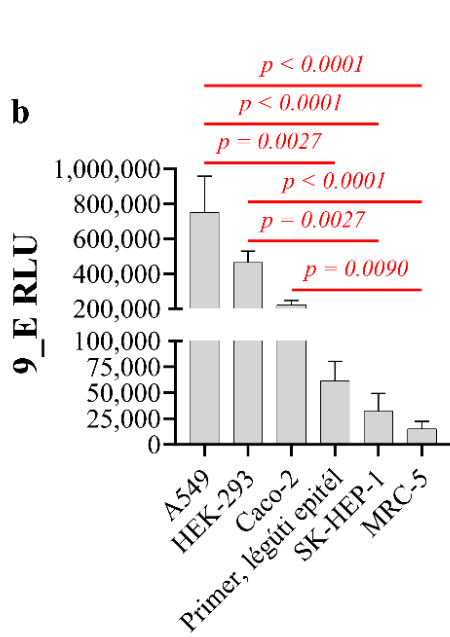
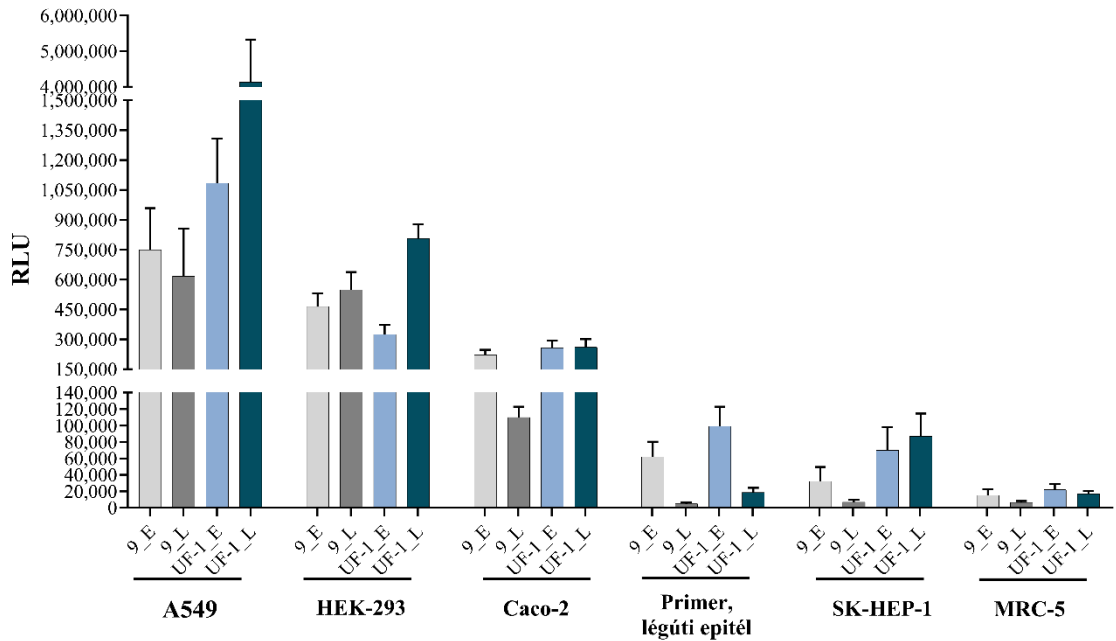
*In vitro* kísérleteinkben két HPyV9 izolátumot, a referencia szekvenciát (amely jelölése a továbbiakban 9) és az UF-1-et tanulmányoztuk. Egyrészt ezek NCCR szekvenciái jelentősen különböznek egymástól, másrészt két másik kutatócsoport is ezekkel dolgozott hasonló vizsgálatokban.<sup>120,121</sup> A kísérleteket különböző sejttypusokkal végeztük. A vírus lehetséges légúti terjedése és replikációja miatt választottuk a primer, légúti epitél sejtet, az MRC-5 tüdő fibroblaszt sejtet, valamint az A549 tüdő epitél sejt vonalat kutatásainkhoz. A HEK-293 vese epitél sejtet, ahogy az A549-cel is végezték hasonló kísérleteket,<sup>120-122</sup> ami lehetővé tette az eredmények összehasonlítását. A Caco-2 sejt vonal a mások által használt SW480-hoz hasonló bélepitél. Az SK-HEP-1 endotél sejt vonalat pedig azért választottuk, mert a vírus szerezeten belüli terjedésében kulcsszerepet játszhat az erek endotélje.

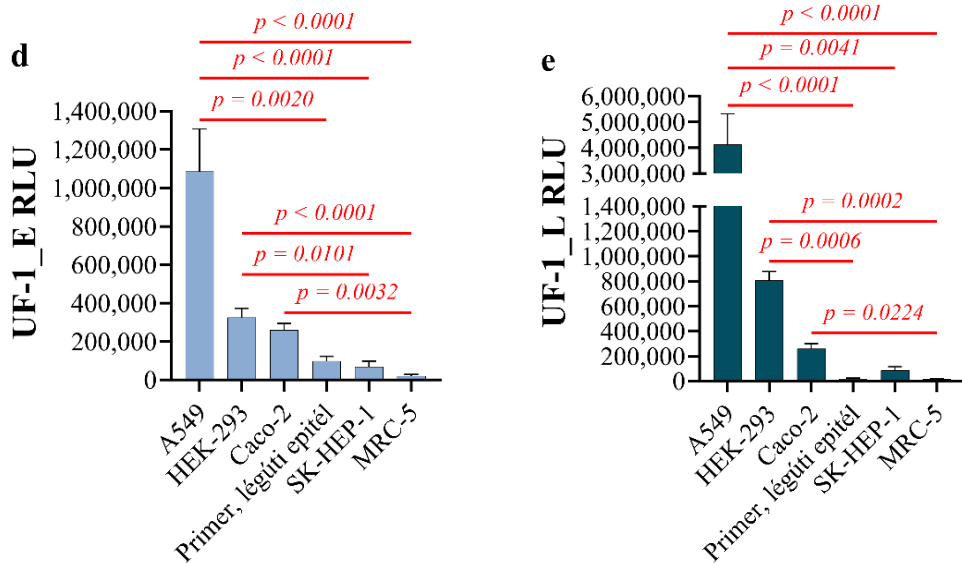
Elsőként megvizsgáltuk a promoter aktivitásokat a különböző sejtekben, amelyhez a kétirányú, NCCR szekvenciákat tartalmazó, riporter vektorokat a sejtekbe transzfektáltuk. A promoter aktivitását kettős luciferáz teszt segítségével mértük: a korai promoter aktivitását (E) a *Renilla* luciferáz aktivitása, a késői promotert (L) pedig a firefly luciferázé reprezentálta. Az eredményeket a **14. ábra** mutatja. A különböző sejtekben mért különböző promoter aktivitásokat (9\_E, 9\_L, UF-1\_E and UF-1\_L) külön-külön elemeztük statisztikailag, amelynek eredményeit a **14.b-e ábrák** mutatják.

Mindkét HPyV9 NCCR korai és késői promoter aktivitása is a legerősebb az A549 sejtben volt, míg a leggyengébb az MRC-5 fibroblasztban. Az A549 sejtekben mért promoter aktivitáshoz képest a HEK-293 és a Caco-2 sejtekben mértek ugyan alacsonyabbak voltak minden esetben, de a különbségek statisztikailag nem bizonyultak

szignifikánsnak. Ugyanakkor primer, légúti epitél sejtekben és az endotél sejtekben mind a négy promotor esetében szignifikánsan gyengébb luciferáz aktivitást mértünk.

**14. ábra:** A HPyV9 referenciaszekvencia és az UF-1 izolátum korai és késői promoterének aktivitása különböző sejtekben

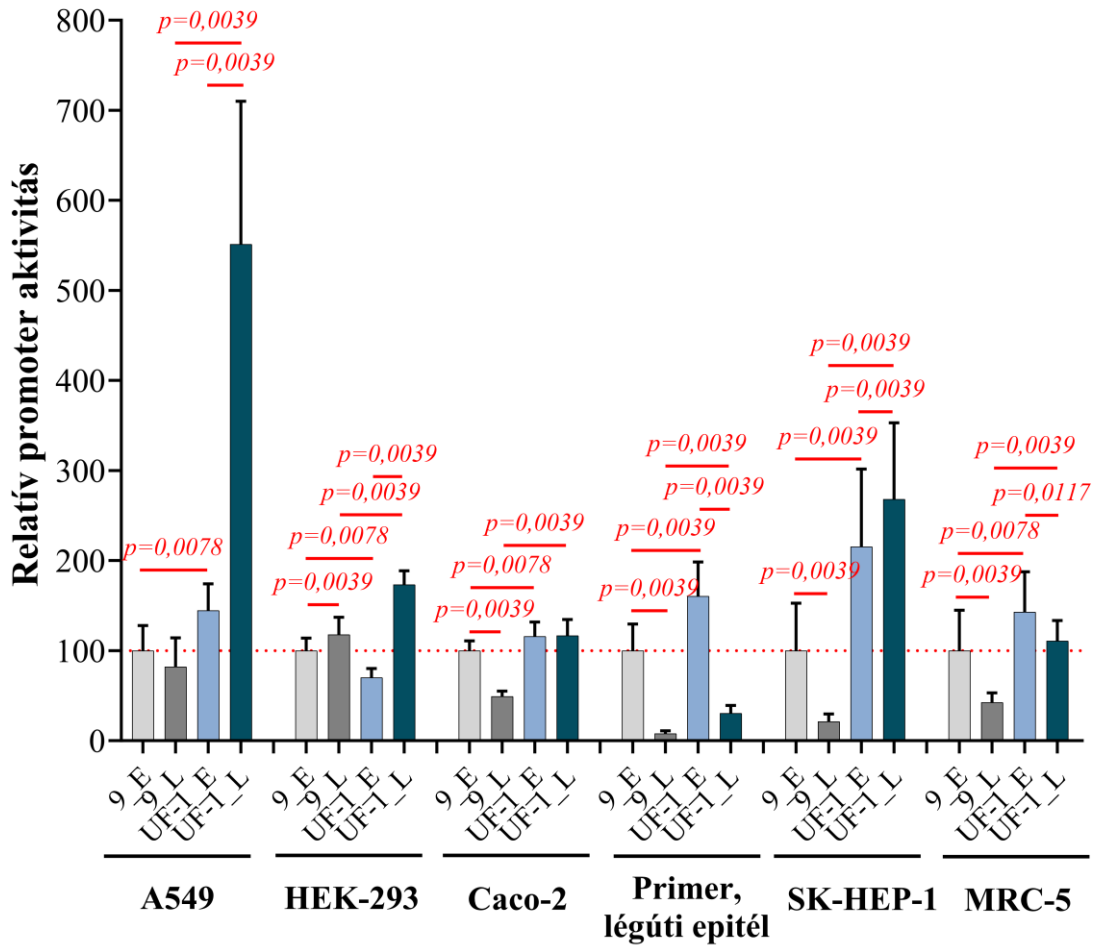




A HPyV9 referenciaszekvencia (9) és az UF-1 izolátum korai (E) és késői (L) promoter aktivitása különböző sejtekben. Minden oszlop három független kísérlet kilenc mérésének átlagát mutatja SD-vel. Az **a** ábra sejtenként ábrázolja a négy promoter aktivitását. A luciferáz aktivitásokat promoterenként ábrázolják a **b-d** ábrák. 9\_E: HPyV9 referencia genom korai promotere; 9\_L: HPyV9 referencia genom késői promotere; UF-1\_E: HPyV9 UF-1 izolátum korai promotere; UF-1\_L: HPyV9 UF-1 izolátum késői promotere; RLU: relatív luciferáz egység. A statisztikailag szignifikáns különbséget piros vonal jelzi  $p$  értékkel (Kruskal-Wallis, Dunn post hoc analízis).

A transzfekciós hatékonyság a GFP expressziós vektorral végzett kísérleteink alapján sejttípusonként változó volt: az A549 és HEK-293 sejtekben >90%, az SK-HEP-1 sejtekben >70%, az MRC-5 sejtekben ~60%, a primer légúti epitél sejtekben ~50%, míg a Caco-2 sejtekben ~30%. A transzfekciós hatékonyság azonban jelentősen befolyásolja a kísérletekben mért luciferáz aktivitást. Ahhoz, hogy a különböző promoter aktivitásokat megfelelően értékelhessük, minden sejttípusban a 9\_E promoter aktivitáshoz viszonyítottuk a többi promoter aktivitását. Ehhez a 9\_E promoter aktivitását vettük 100%-nak. Az eredményeket, vagyis a relatív promoter aktivitásokat a **15. ábra** mutatja.

15. ábra: Relatív promoter aktivitások különböző sejtekben



A HPyV9 referenciaszekvencia (9) és az UF-1 izolátum relatív korai (E) és késői (L) promoter aktivitása a különböző sejtekben. Minden oszlop három független kísérlet kilenc mérésének átlagát mutatja SD-vel. A 9\_E promoter aktivitása 100%, a többi promoterét sejtenként ehhez viszonyítottuk. 9\_E: HPyV9 referencia genom korai promoter; 9\_L: HPyV9 referencia genom késői promoter; UF-1\_E: HPyV9 UF-1 izolátum korai promoter; UF-1\_L: HPyV9 UF-1 izolátum késői promoter. A statisztikailag szignifikáns különbséget piros vonal jelzi  $p$  értékkel (Wilcoxon  $t$ -teszt, kétoldali).

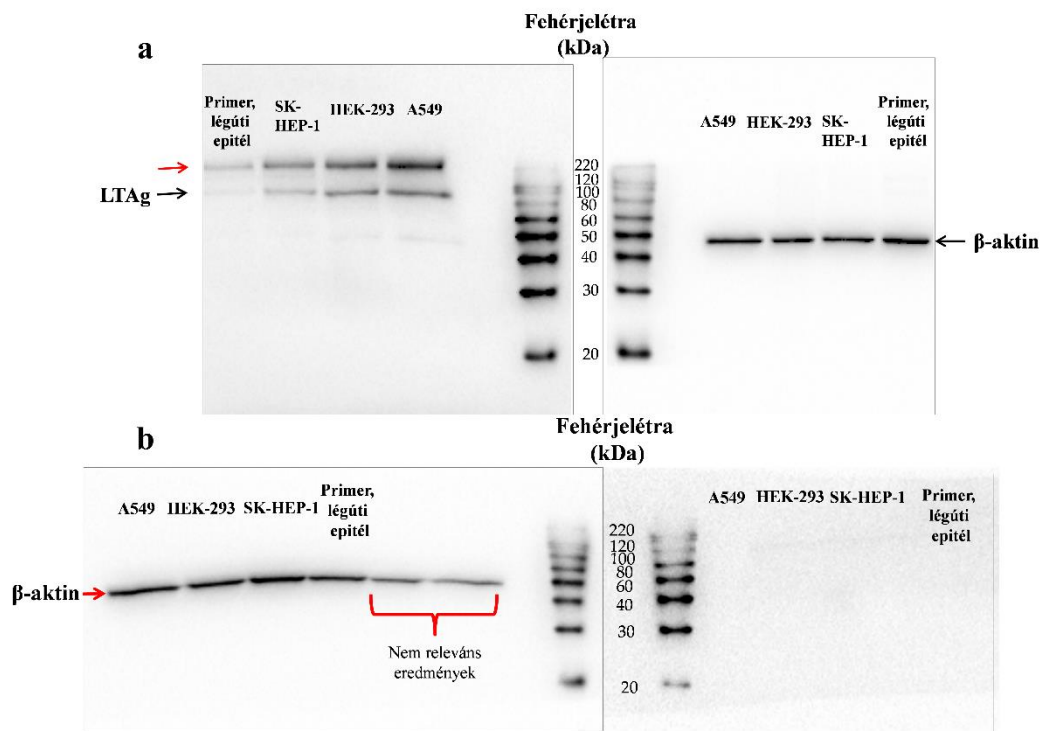
A referencia szekvencia korai promoter (9\_E) aktivitása szignifikánsan erősebb volt a késői promoteréhez (9\_L) képest a Caco-2, a primer légúti hámsejtek, az SK-HEP-1 és az MRC-5 sejtekben is. Az A549 sejtekben viszont a korai (9\_E) és a késői (9\_L) promoter aktivitása közt nem volt szignifikáns a különbség. Ugyanakkor másokhoz hasonlóan,<sup>120,121</sup> a HEK-293 sejtekben szignifikánsan magasabb 9\_L promoter aktivitást figyeltünk meg a 9\_E aktivitáshoz képest. Az UF-1 izolátum két promoterének aktivitása

a Caco-2 sejtekben közel azonos volt, míg A549, HEK-293 és SK-HEP-1 sejtekben szignifikánsan erősebb UF-1\_L aktivitást mértünk. A HEK-293 sejtekben mért eredményeink összhangban állnak két korábbi publikáció adataival.<sup>120,121</sup> A primer, légúti epitélben, illetve a fibroblasztokban viszont az UF-1\_L promoter aktivitása szignifikánsan gyengébb volt az UF-1\_E-hez képest. A két NCCR szekvencia közül az UF-1 promoterei a HEK-293 sejt kivételével minden más sejtben magasabb aktivitást mutattak. A HEK-293 sejtben viszont szignifikánsan alacsonyabb UF-1 korai promoter aktivitást mértünk a 9\_E aktivitáshoz képest. Mindkét korábbi tanulmányban ennek ellenkezőjét tapasztalták.<sup>120,121</sup> A különbségek okait vizsgálva az alábbiakat állapítottuk meg. Az egyik csoport az A549 sejtekben viszonylag alacsony, míg a HEK-293 sejtekben mérsékelt korai és késői promoter aktivitásokat mért, legmagasabbat az SW480 sejtekben.<sup>122</sup> A relatív luciferáz aktivitásokat összevetve, mi jóval magasabb értékeket mértünk az A549 és a HEK-293 sejtekben. Egy másik vizsgálatban szintén az SW480 sejtekben mértek kiemelkedően magas aktivitásokat.<sup>121</sup> Mi viszont mind a négy promoter esetében ugyan nem szignifikánsan, de alacsonyabb aktivitásokat mértünk a Caco-2 sejtekben, mint az A549 és HEK-293 epitélben. Összehasonlítva a transzfekciós hatékonyságot, a HEK-293 esetében az általunk elért érték közel egyező volt a hasonló vizsgálatokat végző munkacsoportéval, viszont A549 esetében sokkal jobb hatásfokot értünk el. Caco-2 sejtben viszont a plazmidok bevitelének sikeressége jóval gyengébbnek bizonyult, mint amit SW480-al mások elértek.<sup>122</sup> Mindkét sejt vonal colon adenocarcinoma eredetű, azonban morfológiájuk különbözik,<sup>123</sup> talán ez is állhat az eltérő transzfekciós hatékonyság hátterében. A kísérleti rendszerek kevésbé összehasonlíthatóak. Az általunk használt, kétirányú riporter vektor kiválóan szimulálja a polyomavírusokat. Moens és kollégái egyirányú riporter vektort használtak, vagyis külön-külön vektort a korai és a késői promoterek vizsgálatához, az NCCR szekvenciát mindig csak részlegesen bejuttatva.<sup>120</sup> Ilyen esetben a két vektor transzfekciós hatékonyságának különbségei, az NCCR szekvenciák részleges jelenléte jelentősen befolyásolhatja az eredményeket. Ajuh és kollégái ugyan kétirányú vektort alkalmaztak, de a fluoreszcens fehérjék NCCR által szabályozott expresszióját áramlási citometriával 48 órával a transzfekció után mérték.<sup>121</sup> Mindezek együttesen magyarázhatják az eredményeink közti eltéréseket.

Az LTA<sub>g</sub> kulcsszerepet játszik a polyomavírusok replikációjában, az NCCR LTA<sub>g</sub> kötőhelye(ke)t tartalmaz. Az általunk vizsgált két NCCR szekvencia nem különbözik a kötőhelyekben.<sup>120</sup> Viszont az LTA<sub>g</sub> nem csak közvetlenül, hanem közvetetten,

transzkripciós faktorokkal való interakciója révén is hathat a promoterekre.<sup>124</sup> Az LTA<sub>g</sub> promoterekre gyakorolt hatását kotranszfekciós kísérletekben vizsgáltuk. A riporter vektorok luciferáz aktivitásait a riporter és az LTA<sub>g</sub> expressziós vektorral együttesen transzfektált sejtekben mértük. A vizsgálatokat HEK-293, A549, SK-HEP-1 és primer sejtben végeztük. A kotranszfektált sejtekben az LTA<sub>g</sub> expresszióját Western blot módszerrel igazoltuk (**16.a ábra**).

**16. ábra:** LT antigén expresszió igazolása Western blottal



Az ábra felső sorában (**a**) a HA-taggal jelölt LTA<sub>g</sub> és a béta-aktin Western blot képe látható A549, HEK-293, SK-HEP-1 és primer, légúti epithél sejtekkel. A piros nyíl a nagyobb molekulatömegű HA-taggal jelölt fehérjét jelzi, amely feltehetően poszttranszlációsán módosított LTA<sub>g</sub>. A **b** ábra jobb alsó sorában a HA-tag, a bal alsó sorában a béta-aktin Western blot képe látható mock transzfektált A549, HEK-293, SK-HEP-1 és primer légúti epithel sejtekkel. LTA<sub>g</sub>: nagy T antigén

Az LTA<sub>g</sub> relatív mennyisége az egyes sejtekben tükrözte a transzfekciós hatékonyságot. (**16.b ábra**). Hasonlóan más kutatócsoportokhoz, a vártnál nagyobb molekulaméretű sávot is kimutattunk (piros nyíllal jelölt az ábrán), amelyről azt feltételezik, poszttranszlációsán módosult LTA<sub>g</sub>.<sup>120,125-127</sup> Kontrollként a sejteket üres, azaz LTA<sub>g</sub> kódoló szekvencia nélküli pcDNA3.1(+) vektorral is transzfektáltuk, természetesen ebben az esetben LTA<sub>g</sub>-t nem detektáltunk a sejtizátumokból.

Kotranszfekciós kísérletünkben csökkent luciferáz aktivitásokat figyeltünk meg az üres pcDNA3.1(+) vektorral (EV) és riporter vektorral kotranszfectált sejtekben a kizárólag riporter vektorral transzfectált sejtekhez képest. A legnagyobb mértékű csökkenést a primer sejtekben, míg a legkisebbet az SK-HEP-1 esetében tapasztaltunk. Vélhetően az expressziós vektor CMV promotere és a HPyV9 promoterei közti versengés lehet a magyarázat. Ezért a kotranszfekciós vizsgálatokban a promoter aktivitásokban bekövetkező változást mindig az üres pcDNA3.1(+) vektorral és az adott riporter vektorral kotranszfectált sejtekben mért eredményekhez képest számítottuk. Eredményeink a **17. ábrán** láthatóak.

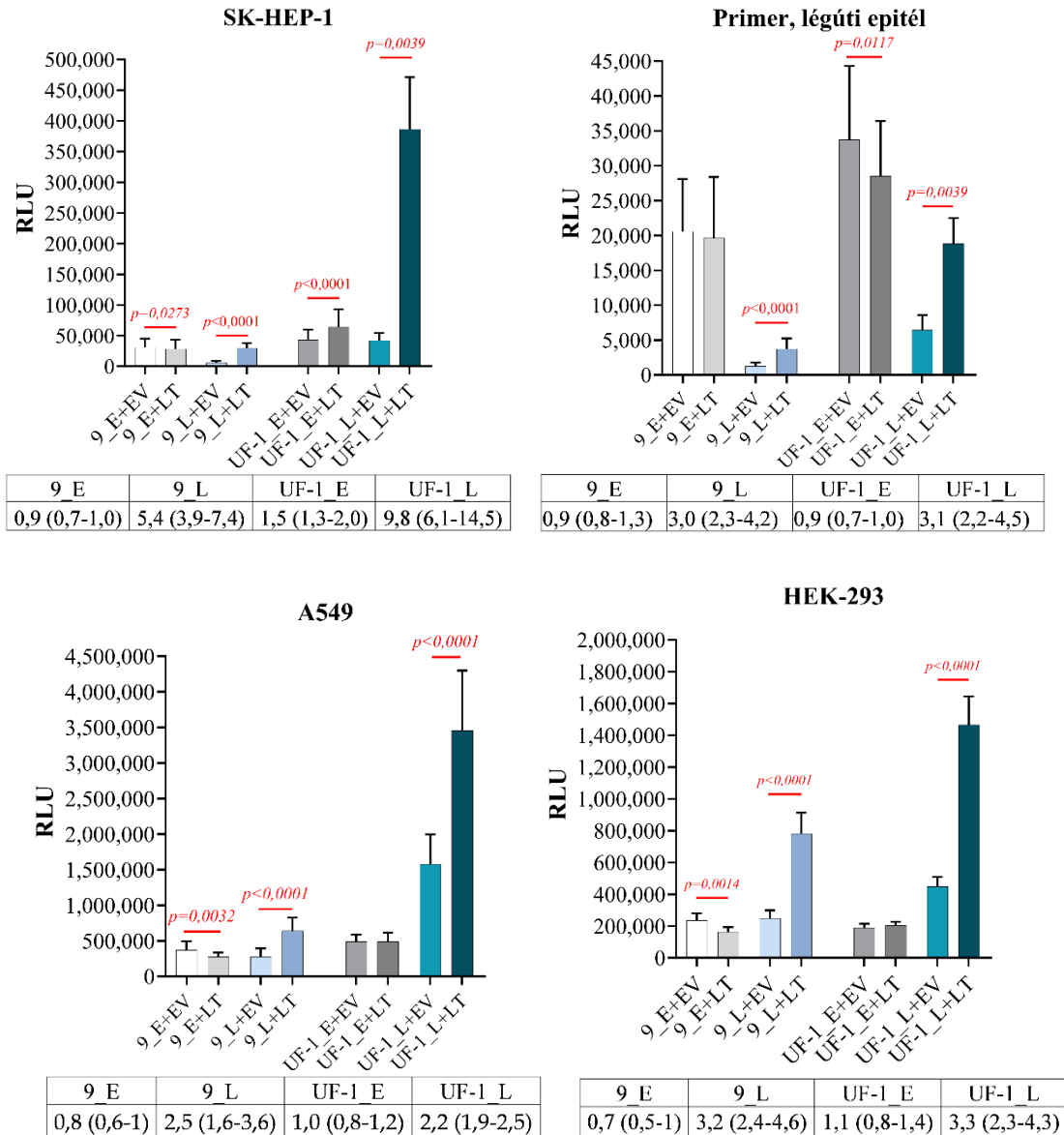
Az LTA<sub>g</sub> expressziója minden sejttypusban szignifikáns növekedést eredményezett a késői promoterek (9\_L és UF-1\_L) aktivitásában. Az eredmények összhangban állnak az LTA<sub>g</sub> funkciójával, hiszen a fehérje a vírusreplikációt segíti, de a késői géneket is transzaktiválja.<sup>13</sup> Az A549, HEK-293 és primer sejtben a luciferáz aktivitások mindkét NCCR esetében hasonló mértékben változtak. A legerősebb hatást az SK-HEP-1 sejtekben mértük. Ebben a sejttypusban az UF-1\_L aktivitás sokkal nagyobb mértékben növekedett az LTA<sub>g</sub> hatására a 9\_L aktivitáshoz és a többi sejtben mérthez képest is. A 9\_E promoter aktivitása az LTA<sub>g</sub> hatására minden sejtben hasonló mértékben csökkent, a különbség statisztikailag is szignifikáns volt a primer sejtek kivételével. Az UF-1\_E promoter aktivitása sejttypustól függően eltérően változott az LTA<sub>g</sub> hatására: az A549 és HEK-293 sejtekben nem változott, míg SK-HEP-1 sejtekben szignifikáns növekedést, primer légúti hámsejtben pedig szignifikáns csökkenést mutatott.

Az egyirányú riporter vektorral dolgozó kutatócsoport azonban HEK-293 sejtekben az LTA<sub>g</sub> eltérő hatását írta le. Ellentétben velünk, a referencia szekvencia esetében a korai promoter aktivitását szignifikánsan növelte, míg a későit szignifikánsan csökkentette az LTA<sub>g</sub>. Az UF-1 esetében a késői promoter aktivitásokra gyakorolt hatás hasonló volt az általunk tapasztaltnak, viszont a korai promoter esetében is szignifikáns növekedést mértek. Ahogy korábban írtuk, a kísérleti rendszereink nem voltak azonosak. Mindez felhívja a figyelmet arra, hogy módszertani különbségek miatt hasonló kísérletek eltérő eredményeket adhatnak.

Ugyan a primer, légúti epitél sejtekben viszonylag alacsony promoter aktivitásokat mértünk, a legmagasabbat viszont az A549 sejtben, amely légúti epitél sejt vonal. A HPyV9 replikálódhat a tüdőben, saját DNS prevalencia adataink alapján pedig a légút behatolási kapu lehet a vírus számára. Vizsgálataink szerint az A549 és a HEK-293 sejtek

is alkalmasak lehetnek a HPyV9 replikáció további tanulmányozására, mivel ezekben erőteljesebb promoter aktivitásokat figyeltünk meg, különösen az UF-1 NCCR esetében.

**17. ábra:** LTAg hatás a HPyV9 referenciaszekvencia és az UF-1 izolátum promoter aktivitásaira



Az LTAg hatása a HPyV9 referenciaszekvencia (9) és az UF-1 izolátum korai (E) és késői (L) promoter aktivitására különböző sejtekben. Minden sáv három független kísérlet kilenc mérésének átlagát mutatja SD-vel. 9\_E: HPyV9 referencia genom korai promoter; 9\_L: HPyV9 referencia genom késői promoter; UF-1\_E: HPyV9 UF-1 izolátum korai promoter; UF-1\_L: HPyV9 UF-1 izolátum késői promoter; EV: üres, inzertet nem tartalmazó, pcDNA3.1+ vektor. A statisztikailag szignifikáns különbséget piros vonal jelzi  $p$  értékkel ( $t$ -teszt, kétoldali). LTAg: nagy T antigén. A táblázatok a promoter aktivitásában bekövetkezett változások (hányszoros a kontrollhoz képest) átlagát (minimum-maximum) tartalmazza.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A kutatómunkám során három, humán polyomavírus, a HPyV9, az MWPyV és az STLPyV szeroprevalenciáját nagyszámú, egészséges immunrendszerű gyerekektől és felnőttektől vett szérummintával vizsgáltuk. Ehhez virális antigéneket állítottunk elő, valamint ELISA módszert fejlesztettünk. A vírusok légúti terjedésének és a légútban való replikációjának tanulmányozására DNS prevalencia vizsgálatot végeztünk mandula- és tüdőszövet, valamint légúti váladék mintákkal. Emellett a HPyV9 virális szabályozó régióját, a promoterek aktivitását *in vitro*, különböző sejt típusokban tanulmányoztuk.

Eredményeink alapján a HPyV9 és az MWPyV szeropozitivitási arány a gyermekek és fiatal felnőttek közt az életkor előrehaladtával nőtt. A 21 évnél idősebbek körében az átfertőzöttségi arány jelentősen már nem változott. A felnőttek (>18 év) 36,2%-a esett már át HPyV9 fertőzésen, 54%-a MWPyV fertőzésen, vagyis a felnőttek jelentős része fogékony mindkét vírushoz. Az STLPyV primer fertőzések jelentős része kisgyermekkorban, 6 év alatt történik, a felnőttek 81,2%-a szeropozitív, a vírus a populáció nagy részét fertőzi.

Tüdőszövetekben egyik vírust sem detektáltuk. Garatmandulák 1%-ában HPyV9 DNS-t, míg orrmandulák 1%-ában STLPyV jelenlétét mutattuk ki. A mandulaműtét során vett torokváladékokban HPyV9-et nem, viszont MWPyV DNS-t a minták 2,7%-ában, STLPyV DNS-t pedig 3,4%-ában detektáltunk. Sőt, egy-egy középfülváladékban is kimutattuk a két vírust. A COVID-19 világjárvány alatt gyűjtött orrgarati minták 5,2%-ában HPyV9, 4,9%-ában MWPyV és 1,4%-ában STLPyV DNS-t mutattunk ki, döntően SARS-CoV-2 RNS negatív mintákban. A HPyV9 gyakorisága magasabb volt felnőttek mintáiban, az MWPyV és az STLPyV pozitivitás pedig a gyermekekében. Eredményeink alapján mindhárom vírus légúti terjedése, légútba, szájüregbe behatolása felmerül, az MWPyV és STLPyV akár a középfülbe is bejuthat. Értékes teljes genom és NCCR szekvenciákat nyertünk ki a mintákból, szekvenciaelemzéseket végeztünk. Új MWPyV és STLPyV NCCR variánsokat, mutációkat azonosítottunk.

A HPyV9 két jelentősen eltérő NCCR szekvenciáját, a korai és késői promoterek aktivitását kétirányú expressziót lehetővé tevő, luciferáz riportter vektorral tanulmányoztuk légúti, vese- és bélepitél, valamint endotél sejt vonalban, tüdő fibroblasztban és primer, légúti epitél sejtben. A promotor aktivitások az A549 légúti epitél sejtekben voltak a legmagasabbak, míg a fibroblasztokban és a primer sejtekben a legalacsonyabbak. A referencia szekvenciától jelentősen eltérő UF-1 NCCR mindkét

promoterének aktivitása egy kivétellel minden sejtben erősebbnek bizonyult. A vírus nagy T antigénje minden sejtben fokozta a késői promoter aktivitásokat. Az *in vitro* kísérletek alapján az A549 légúti epithél sejt vonal, illetve a HEK-293 vese epithél alkalmas lehet a HPyV9 vírusreplikációjára.

## 8. SUMMARY

During our research, we investigated the seroprevalence of three human polyomaviruses — HPyV9, MWPyV, and STLPyV — using a large number of serum samples collected from immunocompetent children and adults. For this purpose, we produced viral antigens and developed an ELISA method. To study the respiratory transmission and replication of these viruses in the respiratory tract, we performed DNA prevalence analyses using tonsil, adenoid, and lung tissues, as well as respiratory samples. Additionally, we examined the viral regulatory region of HPyV9 and studied promoter activity *in vitro* in various cell types.

Based on our results, HPyV9 and MWPyV seropositivity rates increased with age among children and young adults. Among people over 21 years of age, the seropositivity rate did not change significantly. According to our results, 36.2% of adults (>18 years) were seropositive for HPyV9 and 54% for MWPyV, meaning that a significant proportion of adults are susceptible to both viral infections. STLPyV primary infections occurred in early childhood, under 6 years of age. 81.2% of adults were seropositive, the virus is ubiquitous in the population.

Neither polyomavirus was detected in lung tissue. HPyV9 DNA was detected in 1% of tonsils and STLPyV in 1% of adenoids. In the throat swab sample taken during tonsillectomy, HPyV9 was not detected, but MWPyV DNA was present in 2.7% and STLPyV DNA in 3.4% of the samples. Moreover, both viruses were detected in 1-1 middle ear discharge. HPyV9 DNA was detected in 5.2%, MWPyV in 4.9%, and STLPyV in 1.4% of nasopharyngeal samples collected during the COVID-19 pandemic, mainly in SARS-CoV-2 RNA negative samples. HPyV9 prevalence was higher in samples from adults, and MWPyV and STLPyV DNA positivity were higher in children. Our results suggest the possibility of respiratory transmission of all three viruses, the airway and oral cavity may be the portal of entry, with MWPyV and STLPyV even entering the middle ear. We obtained valuable full-genome and NCCR sequences from the samples and performed sequence analyses. Novel MWPyV and STLPyV NCCR variants and mutations were identified.

Two significantly different NCCR sequences of HPyV9, the early and late promoter activities were studied using a luciferase reporter vector, ensuring bidirectional expression in respiratory, renal and colon epithelial, and endothelial cell lines, lung fibroblasts, and primary, airway epithelial cells. Promoter activities were the highest in

A549 lung epithelial cells, and the lowest in fibroblasts and primary cells. The activity of both promoters of the UF-1 NCCR, which differed significantly from the reference sequence, was found to be stronger in all but one cell. The large T antigen of the virus increased late promoter activities in all cells. Our *in vitro* experiments suggest that the A549 lung epithelial cell line and the HEK-293 renal epithelial cell line may be suitable for HPyV9 viral replication.

## 9. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

- Szeroprevalencia vizsgálatokhoz megfelelő HPyV9, MWPyV és STLPyV VP1 fehérjét állítottunk elő, amelyekkel megfelelő ELISA módszert terveztünk és optimalizáltunk.
- Megvizsgáltuk, elemeztük a HPyV9, MWPyV és STLPyV hazai szeroprevalenciáját különböző korcsoportokban.
- Megállapítottuk, hogy a HPyV9 és MWPyV szeropozitivitás életkorral nő fiatal felnőtt korig, a felnőttek jelentős része azonban fogékony marad a fertőzésre. Az STLPyV primer fertőzések döntően kisgyermekkorban zajlanak, a vírus ubikviter, a felnőttek nagy része szeropozitív.
- DNS prevalencia adataink erősítik a vírusok lehetséges légúti terjedésének hipotézisét, értékes prevalencia és szekvencia adatokat gyűjtöttünk és elemeztünk.
- *In vitro* kísérleti rendszert hoztunk létre, amely lehetővé teszi a polyomavírusok különböző NCCR variánsainak funkcionális vizsgálatát, így a biológiai hatásaik közötti eltérések elemzését is.
- A HPyV9 promotereinek aktivitását különféle sejtvonalakban és primer sejtekben vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy az UF-1 NCCR haplotípus promoterei erősebbek a referencia szekvenciáétól, az LTA<sub>g</sub> fokozza a késői promoter aktivitásokat, valamint az A549 légúti epitél és a HEK-293 veseepitél alkalmas lehet a HPyV9 vírusreplikáció tanulmányozására.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

- 1 Hirsch, H. H., Kardas, P., Kranz, D. & Leboeuf, C. The human JC polyomavirus (JCPyV): virological background and clinical implications. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 121, 685-727, doi:10.1111/apm.12128 (2013).
- 2 Hirsch, H. H. & Steiger, J. Polyomavirus BK. *The Lancet. Infectious diseases* 3, 611-623, doi:10.1016/s1473-3099(03)00770-9 (2003).
- 3 Gosert, R. *et al.* Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *J Exp Med* 205, 841-852, doi:10.1084/jem.20072097 (2008).
- 4 Gosert, R., Kardas, P., Major, E. O. & Hirsch, H. H. Rearranged JC virus noncoding control regions found in progressive multifocal leukoencephalopathy patient samples increase virus early gene expression and replication rate. *Journal of virology* 84, 10448-10456, doi:10.1128/JVI.00614-10 (2010).
- 5 Pastrana, D. V. *et al.* BK polyomavirus genotypes represent distinct serotypes with distinct entry tropism. *Journal of virology* 87, 10105-10113, doi:10.1128/JVI.01189-13 (2013).
- 6 Wijaya, W. A., Liu, Y., Qing, Y. & Li, Z. Prevalence of Merkel Cell Polyomavirus in Normal and Lesional Skin: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in oncology* 12, 868781, doi:10.3389/fonc.2022.868781 (2022).
- 7 van der Meijden, E. *et al.* Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog* 6, e1001024 (2010).
- 8 van der Meijden, E. *et al.* Primary Polyomavirus Infection, Not Reactivation, as the Cause of Trichodysplasia Spinulosa in Immunocompromised Patients. *The Journal of infectious diseases* 215, 1080-1084, doi:10.1093/infdis/jiw403 (2017).
- 9 Bialasiewicz, S., Byrom, L., Fraser, C. & Clark, J. Potential Route of Transmission for Trichodysplasia Spinulosa Polyomavirus. *The Journal of infectious diseases* 215, 1175-1176, doi:10.1093/infdis/jix078 (2017).
- 10 Gross, L. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 83, 414-421, doi:10.3181/00379727-83-20376 (1953).
- 11 Stewart, S. E., Eddy, B. E., Gochenour, A. M., Borgese, N. G. & Grubbs, G. E. The induction of neoplasms with a substance released from mouse tumors by tissue culture. *Virology* 3, 380-400, doi:10.1016/0042-6822(57)90100-9 (1957).
- 12 Buck, C. B. *et al.* The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLoS pathogens* 12, e1005574, doi:10.1371/journal.ppat.1005574 (2016).
- 13 Moens, U. *et al.* Biology, evolution, and medical importance of polyomaviruses: An update. *Infect Genet Evol* 54, 18-38, doi:S1567-1348(17)30198-3 [pii] 10.1016/j.meegid.2017.06.011 (2017).
- 14 Gardner, S. D., Field, A. M., Coleman, D. V. & Hulme, B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1, 1253-1257 (1971).
- 15 Padgett, B. L., Walker, D. L., ZuRhein, G. M., Eckroade, R. J. & Dessel, B. H. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet* 1, 1257-1260 (1971).
- 16 Goudsmit, J., Wertheim-van Dillen, P., van Strien, A. & van der Noordaa, J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *Journal of medical virology* 10, 91-99, doi:10.1002/jmv.1890100203 (1982).

- 17 Monaco, M. C., Jensen, P. N., Hou, J., Durham, L. C. & Major, E. O. Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection. *Journal of virology* 72, 9918-9923, doi:10.1128/JVI.72.12.9918-9923.1998 (1998).
- 18 Pinto, M. & Dobson, S. BK and JC virus: a review. *The Journal of infection* 68 Suppl 1, S2-8, doi:10.1016/j.jinf.2013.09.009 (2014).
- 19 Gaynor, A. M. *et al.* Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* 3, e64 (2007).
- 20 Allander, T. *et al.* Identification of a third human polyomavirus. *Journal of virology* 81, 4130-4136 (2007).
- 21 Debiaggi, M., Canducci, F., Ceresola, E. R. & Clementi, M. The role of infections and coinfections with newly identified and emerging respiratory viruses in children. *Virology journal* 9, 247, doi:10.1186/1743-422X-9-247 (2012).
- 22 Katona, M., Jeles, K., Kovacs, R. & Csoma, E. KI and WU Polyomaviruses: Seroprevalence Study and DNA Prevalence in SARS-CoV-2 RNA Positive and Negative Respiratory Samples. *Microorganisms* 10, doi:10.3390/microorganisms10040752 (2022).
- 23 Feng, H., Shuda, M., Chang, Y. & Moore, P. S. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319, 1096-1100 (2008).
- 24 Schowalter, R. M., Pastrana, D. V., Pumphrey, K. A., Moyer, A. L. & Buck, C. B. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe* 7, 509-515 (2010).
- 25 Nguyen, K. D. *et al.* Human polyomavirus 6 and 7 are associated with pruritic and dyskeratotic dermatoses. *J Am Acad Dermatol* 76, 932-940 e933, doi:10.1016/j.jaad.2016.11.035 (2017).
- 26 Ho, J. *et al.* Human polyomavirus 7-associated pruritic rash and viremia in transplant recipients. *The Journal of infectious diseases* 211, 1560-1565, doi:10.1093/infdis/jiu524 (2015).
- 27 Scuda, N. *et al.* A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *Journal of virology* 85, 4586-4590 (2011).
- 28 Siebrasse, E. A. *et al.* Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. *Journal of virology* 86, 10321-10326 (2012).
- 29 Lim, E. S. *et al.* Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology* (2013).
- 30 Mishra, N. *et al.* Identification of a novel polyomavirus in a pancreatic transplant recipient with retinal blindness and vasculitic myopathy. *The Journal of infectious diseases* 210, 1595-1599, doi:10.1093/infdis/jiu250 [pii] (2014).
- 31 Gheit, T. *et al.* Isolation and characterization of a novel putative human polyomavirus. *Virology* 506, 45-54, doi:10.1016/j.virol.2017.03.007 (2017).
- 32 Ondov, B. D. *et al.* Mash Screen: high-throughput sequence containment estimation for genome discovery. *Genome Biol* 20, 232, doi:10.1186/s13059-019-1841-x (2019).
- 33 Torres, C., Correa, R. M., Picconi, M. A., Buck, C. B. & Mbayed, V. A. Identification of a new polyomavirus in distinct human populations and tissues. *Journal of medical virology* 95, e29197, doi:10.1002/jmv.29197 (2023).
- 34 Korup, S. *et al.* Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. *PloS one* 8, e58021 (2013).
- 35 Gedvilaite, A. *et al.* Novel polyomaviruses in shrews (Soricidae) with close similarity to human polyomavirus 12. *Journal of General Virology*, doi:10.1099/jgv.0.000948 (2017).

- 36 Yang, J. F., Liu, W. & You, J. Characterization of molecular mechanisms driving Merkel cell polyomavirus oncogene transcription and tumorigenic potential. *PLoS pathogens* 19, e1011598, doi:10.1371/journal.ppat.1011598 (2023).
- 37 Liu, W. *et al.* Identifying the Target Cells and Mechanisms of Merkel Cell Polyomavirus Infection. *Cell Host Microbe* 19, 775-787, doi:10.1016/j.chom.2016.04.024 (2016).
- 38 Klufah, F. *et al.* Emerging role of human polyomaviruses 6 and 7 in human cancers. *Infectious agents and cancer* 16, 35, doi:10.1186/s13027-021-00374-3 (2021).
- 39 Sheu, J. C. *et al.* Polyomaviruses of the skin: integrating molecular and clinical advances in an emerging class of viruses. *Br J Dermatol* 180, 1302-1311, doi:10.1111/bjd.17592 (2019).
- 40 Henriksen, S., Hansen, T., Bruun, J. A. & Rinaldo, C. H. The Presumed Polyomavirus Viroprotein VP4 of Simian Virus 40 or Human BK Polyomavirus Is Not Required for Viral Progeny Release. *Journal of virology* 90, 10398-10413, doi:10.1128/JVI.01326-16 (2016).
- 41 Salunke, D. M., Caspar, D. L. & Garcea, R. L. Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 46, 895-904, doi:10.1016/0092-8674(86)90071-1 (1986).
- 42 Helle, F. *et al.* Neutralizing Antibodies Targeting BK Polyomavirus: Clinical Importance and Therapeutic Potential for Kidney Transplant Recipients. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 35, 1425-1433, doi:10.1681/ASN.0000000000000457 (2024).
- 43 An, P., Saenz Robles, M. T. & Pipas, J. M. Large T antigens of polyomaviruses: amazing molecular machines. *Annual review of microbiology* 66, 213-236, doi:10.1146/annurev-micro-092611-150154 (2012).
- 44 Topalis, D., Andrei, G. & Snoeck, R. The large tumor antigen: a "Swiss Army knife" protein possessing the functions required for the polyomavirus life cycle. *Antiviral research* 97, 122-136, doi:10.1016/j.antiviral.2012.11.007 (2013).
- 45 DeCaprio, J. A. & Garcea, R. L. A cornucopia of human polyomaviruses. *Nat Rev Microbiol* 11, 264-276, doi:10.1038/nrmicro2992nrmicro2992 [pii] (2013).
- 46 Zuo, F. & Mertz, J. E. Simian virus 40 late gene expression is regulated by members of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8586-8590, doi:10.1073/pnas.92.19.8586 (1995).
- 47 Berrios, C. *et al.* Malawi Polyomavirus Is a Prevalent Human Virus That Interacts with Known Tumor Suppressors. *Journal of virology* 89, 857-862, doi:10.1128/Jvi.02328-14 (2015).
- 48 Bollag, B., Prins, C., Snyder, E. L. & Frisque, R. J. Purified JC virus T and T' proteins differentially interact with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins. *Virology* 274, 165-178, doi:10.1006/viro.2000.0451 (2000).
- 49 Borchert, S. *et al.* High-affinity Rb binding, p53 inhibition, subcellular localization, and transformation by wild-type or tumor-derived shortened Merkel cell polyomavirus large T antigens. *Journal of virology* 88, 3144-3160, doi:10.1128/JVI.02916-13 (2014).
- 50 Harris, K. F., Christensen, J. B. & Imperiale, M. J. BK virus large T antigen: interactions with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins and effects on cellular growth control. *Journal of virology* 70, 2378-2386, doi:10.1128/JVI.70.4.2378-2386.1996 (1996).
- 51 White, M. K. & Khalili, K. Interaction of retinoblastoma protein family members with large T-antigen of primate polyomaviruses. *Oncogene* 25, 5286-5293, doi:10.1038/sj.onc.1209618 (2006).

- 52 Furmaga, J. *et al.* BK Polyomavirus-Biology, Genomic Variation and Diagnosis. *Viruses* 13, doi:10.3390/v13081502 (2021).
- 53 Sullivan, C. S., Grundhoff, A. T., Tevethia, S., Pipas, J. M. & Ganem, D. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* 435, 682-686, doi:10.1038/nature03576 (2005).
- 54 Moens, U., Prezioso, C. & Pietropaolo, V. Genetic Diversity of the Noncoding Control Region of the Novel Human Polyomaviruses. *Viruses* 12, doi:10.3390/v12121406 (2020).
- 55 Zhong, S. *et al.* Distribution patterns of BK polyomavirus (BKV) subtypes and subgroups in American, European and Asian populations suggest co-migration of BKV and the human race. *The Journal of general virology* 90, 144-152, doi:10.1099/vir.0.83611-0 (2009).
- 56 Nicol, J. T. *et al.* Seroprevalence and cross-reactivity of human polyomavirus 9. *Emerg Infect Dis* 18, 1329-1332 (2012).
- 57 Nicol, J. T. J. *et al.* Age-Specific Seroprevalences of Merkel Cell Polyomavirus, Human Polyomaviruses 6, 7, and 9, and Trichodysplasia Spinulosa-Associated Polyomavirus. *Clinical and Vaccine Immunology* 20, 363-368, doi:10.1128/Cvi.00438-12 (2013).
- 58 van der Meijden, E. *et al.* Different serologic behavior of MCPyV, TSPyV, HPyV6, HPyV7 and HPyV9 polyomaviruses found on the skin. *PloS one* 8, e81078 (2013).
- 59 van der Meijden, E. *et al.* Human polyomavirus 9 infection in kidney transplant patients. *Emerg Infect Dis* 20, 991-999, doi:10.3201/eid2006.140055 (2014).
- 60 Sroller, V. *et al.* Seroprevalence rates of HPyV6, HPyV7, TSPyV, HPyV9, MWPyV and KIPyV polyomaviruses among the healthy blood donors. *Journal of medical virology* 88, 1254-1261 (2016).
- 61 Gossai, A. *et al.* Seroepidemiology of Human Polyomaviruses in a US Population. *American Journal of Epidemiology* 183, 61-69, doi:10.1093/aje/kwv155 (2016).
- 62 Korup-Schulz, S. V., Lucke, C., Moens, U., Schmuck, R. & Ehlers, B. Large T antigen variants of human polyomaviruses 9 and 12 and seroreactivity against their N terminus. *Journal of General Virology* 98, 704-714, doi:10.1099/jgv.0.000714 (2017).
- 63 Antonsson, A. *et al.* Prevalence and stability of antibodies to thirteen polyomaviruses and association with cutaneous squamous cell carcinoma: A population-based study. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 101, 34-37, doi:10.1016/j.jcv.2018.01.013 (2018).
- 64 Kamminga, S., van der Meijden, E., Feltkamp, M. C. W. & Zaaijer, H. L. Seroprevalence of fourteen human polyomaviruses determined in blood donors. *PloS one* 13, doi:ARTN e020627310.1371/journal.pone.0206273 (2018).
- 65 van Rijn, A. L. *et al.* Impact of HPyV9 and TSPyV coinfection on the development of BK polyomavirus viremia and associated nephropathy after kidney transplantation. *Journal of medical virology* 91, 1142-1147, doi:10.1002/jmv.25397 (2019).
- 66 Trusch, F. *et al.* Seroprevalence of human polyomavirus 9 and cross-reactivity to African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *The Journal of general virology* 93, 698-705, doi:10.1099/vir.0.039156-0 (2012).
- 67 Lednicky, J. A., Butel, J. S., Luetke, M. C. & Loeb, J. C. Complete genomic sequence of a new Human polyomavirus 9 strain with an altered noncoding control region. *Virus genes* 49, 490-492, doi:10.1007/s11262-014-1119-z (2014).
- 68 Wang, Y. *et al.* Multiplex analysis of Human Polyomavirus diversity in kidney transplant recipients with BK virus replication. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 120, 6-11, doi:10.1016/j.jcv.2019.08.012 (2019).

- 69 Kamminga, S., van der Meijden, E., de Brouwer, C., Feltkamp, M. & Zaaijer, H. Prevalence of DNA of fourteen human polyomaviruses determined in blood donors. *Transfusion* 59, 3689-3697, doi:10.1111/trf.15557 (2019).
- 70 Csoma, E., Sapy, T., Meszaros, B. & Gergely, L. Novel human polyomaviruses in pregnancy: higher prevalence of BKPyV, but no WUPyV, KIPyV and HPyV9. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 55, 262-265 (2012).
- 71 Mishra, N. *et al.* Human Polyomavirus 9-An Emerging Cutaneous and Pulmonary Pathogen in Solid Organ Transplant Recipients. *JAMA dermatology* 158, 293-298, doi:10.1001/jamadermatol.2021.5853 (2022).
- 72 Sauvage, V. *et al.* Human polyomavirus related to African green monkey lymphotropic polyomavirus. *Emerg Infect Dis* 17, 1364-1370 (2011).
- 73 Hampras, S. S. *et al.* Natural history of polyomaviruses in men: the HPV infection in men (HIM) study. *The Journal of infectious diseases* 211, 1437-1446, doi:10.1093/infdis/jiu626 (2015).
- 74 Purdie, K. J. *et al.* The Role of Human Papillomaviruses and Polyomaviruses in BRAF-Inhibitor Induced Cutaneous Squamous Cell Carcinoma and Benign Squamoproliferative Lesions. *Frontiers in microbiology* 9, 1806, doi:10.3389/fmicb.2018.01806 (2018).
- 75 Bopp, L. *et al.* Natural History of Cutaneous Human Polyomavirus Infection in Healthy Individuals. *Frontiers in microbiology* 12, 740947, doi:10.3389/fmicb.2021.740947 (2021).
- 76 Dona, M. G. *et al.* Prevalence of 13 polyomaviruses in actinic keratosis and matched healthy skin samples of immunocompetent individuals. *Infectious agents and cancer* 17, 59, doi:10.1186/s13027-022-00472-w (2022).
- 77 Wieland, U. *et al.* Human polyomaviruses 6, 7, 9, 10 and Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in HIV-infected men. *The Journal of general virology* 95, 928-932, doi:10.1099/vir.0.061259-0 (2014).
- 78 Kourieh, A. *et al.* Prevalence and risk factors of human polyomavirus infections in non-malignant tonsils and gargles: the SPLIT study. *The Journal of general virology* 99, 1686-1698, doi:10.1099/jgv.0.001156 (2018).
- 79 Imajoh, M., Hashida, Y., Taniguchi, A., Kamioka, M. & Daibata, M. Novel human polyomaviruses, Merkel cell polyomavirus and human polyomavirus 9, in Japanese chronic lymphocytic leukemia cases. *J Hematol Oncol* 5, 25 (2012).
- 80 Rockett, R. J. *et al.* Detection of novel polyomaviruses, TSPyV, HPyV6, HPyV7, HPyV9 and MWPyV in feces, urine, blood, respiratory swabs and cerebrospinal fluid. *PloS one* 8, e62764 (2013).
- 81 Franzen, J. *et al.* Studies of human polyomaviruses, with HPyV7, BKPyV, and JCPyV present in urine of allogeneic hematopoietic stem cell transplanted patients with or without hemorrhagic cystitis. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* 18, 240-246, doi:10.1111/tid.12500 (2016).
- 82 Dolci, M. *et al.* Particulate matter exposure increases JC polyomavirus replication in the human host. *Environ Pollut* 241, 234-239, doi:10.1016/j.envpol.2018.05.044 (2018).
- 83 Wieland, U. *et al.* Human polyomaviruses 6, 7, 9, 10 and Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in HIV-infected men. *The Journal of general virology* (2014).
- 84 Bergallo, M. *et al.* DNA from Human Polyomaviruses, MWPyV, HPyV6, HPyV7, HPyV9 and HPyV12 in Cutaneous T-cell Lymphomas. *Anticancer research* 38, 4111-4114, doi:10.21873/anticancer.12701 (2018).

- 85 Sadeghi, M. *et al.* Multiplex detection in tonsillar tissue of all known human polyomaviruses. *Bmc Infectious Diseases* 17, 409, doi:10.1186/s12879-017-2479-5 (2017).
- 86 Peng, J., Li, K., Zhang, C. & Jin, Q. MW polyomavirus and STL polyomavirus present in tonsillar tissues from children with chronic tonsillar disease. *Clinical Microbiology and Infection* 22, doi:10.1016/j.cmi.2015.08.028 (2016).
- 87 Herberhold, S. *et al.* Human polyomavirus and human papillomavirus prevalence and viral load in non-malignant tonsillar tissue and tonsillar carcinoma. *Med Microbiol Immunol* 206, 93-103, doi:10.1007/s00430-016-0486-6 10.1007/s00430-016-0486-6 [pii] (2017).
- 88 Delbue, S. *et al.* Human Polyomaviruses in the Cerebrospinal Fluid of Neurological Patients. *Microorganisms* 8, doi:10.3390/microorganisms8010016 (2019).
- 89 Scola, N. *et al.* Prevalence of human polyomaviruses in common and rare types of non-Merkel cell carcinoma skin cancer. *Br J Dermatol* 167, 1315-1320 (2012).
- 90 Ramqvist, T., Nordfors, C., Dalianis, T. & Ragnarsson-Olding, B. DNA from Human Polyomaviruses, TSPyV, MWPyV, HPyV6, 7 and 9 Was Not Detected in Primary Mucosal Melanomas. *Anticancer research* 34, 639-643 (2014).
- 91 Schrama, D. *et al.* Presence of human polyomavirus 6 in mutation-specific BRAF inhibitor-induced epithelial proliferations. *JAMA dermatology* 150, 1180-1186, doi:10.1001/jamadermatol.2014.1116 (2014).
- 92 Hashida, Y. *et al.* Prevalence of human cytomegalovirus, polyomaviruses, and oncogenic viruses in glioblastoma among Japanese subjects. *Infectious agents and cancer* 10, 3, doi:10.1186/1750-9378-10-3 (2015).
- 93 Csoma, E., Bidiga, L., Mehes, G. & Gergely, L. No Evidence of Human Polyomavirus 9, WU and KI DNA in Kidney and Urinary Bladder Tumour Tissue Samples. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 83, 252-257, doi:10.1159/000445120000445120 [pii] (2016).
- 94 Gihbid, A. *et al.* Prevalence of Polyomaviruses and Herpesviruses in Moroccan Breast Cancer. *Pathogens* 12, doi:10.3390/pathogens12050640 (2023).
- 95 Kamminga, S. *et al.* JC and Human polyomavirus 9 after kidney transplantation: An exploratory serological cohort study. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 143, 104944, doi:10.1016/j.jcv.2021.104944 (2021).
- 96 Bialasiewicz, S. *et al.* Detection of Recently Discovered Human Polyomaviruses in a Longitudinal Kidney Transplant Cohort. *American Journal of Transplantation* 16, 2734-2740, doi:10.1111/ajt.13799 (2016).
- 97 Zanella, M. C. *et al.* Longitudinal Detection of Twenty DNA and RNA Viruses in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients Plasma. *Viruses* 15, doi:10.3390/v15040928 (2023).
- 98 Bergallo, M. *et al.* MW Polyomavirus in diarrheal Italian infants. *Minerva pediatrica* 75, 327-330, doi:10.23736/S2724-5276.18.04991-5 (2023).
- 99 Pinheiro, M. S., Mendes, G. S. & Santos, N. Human polyomaviruses 10 and 11 in faecal samples from Brazilian children. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]* 51, 585-591, doi:10.1007/s42770-019-00166-3 (2020).
- 100 Yu, G. *et al.* Discovery of a novel polyomavirus in acute diarrheal samples from children. *PloS one* 7, e49449 (2012).
- 101 Ma, F. L., Li, D. D., Wei, T. L., Li, J. S. & Zheng, L. S. Quantitative detection of human Malawi polyomavirus in nasopharyngeal aspirates, sera, and feces in Beijing,

- China, using real-time TaqMan-based PCR. *Virology journal* 14, 152, doi:10.1186/s12985-017-0817-2 (2017).
- 102 da Silva, A. S. *et al.* Viral metagenomics unveils MW (Malawi) polyomavirus infection in Brazilian pediatric patients with acute respiratory disease. *Journal of medical virology* 95, e28688, doi:10.1002/jmv.28688 (2023).
- 103 Csoma, E., Bidiga, L., Mehes, G., Katona, M. & Gergely, L. Survey of KI, WU, MW, and STL Polyomavirus in Cancerous and Non-Cancerous Lung Tissues. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, doi:10.1159/000481174 (2017).
- 104 Buck, C. B. *et al.* Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus. *Journal of virology* 86, 10887 (2012).
- 105 Papa, N., Zanotta, N., Knowles, A., Orzan, E. & Comar, M. Detection of Malawi polyomavirus sequences in secondary lymphoid tissues from Italian healthy children: a transient site of infection. *Virology journal* 13, doi:ARTN 97 10.1186/s12985-016-0553-z (2016).
- 106 Nicol, J. T. J. *et al.* Seroprevalence of Human Malawi Polyomavirus. *Journal of clinical microbiology* 52, 321-323, doi:10.1128/Jcm.02730-13 (2014).
- 107 Cason, C. *et al.* Antibody response to polyomavirus primary infection: high seroprevalence of Merkel cell polyomavirus and lymphoid tissue involvement. *Journal of Neurovirology* 24, 314-322, doi:10.1007/s13365-017-0612-2 (2018).
- 108 Li, K. *et al.* The prevalence of STL polyomavirus in stool samples from Chinese children. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 66, 19-23, doi:10.1016/j.jcv.2015.02.017 (2015).
- 109 Pastrana, D. V. *et al.* A divergent variant of the eleventh human polyomavirus species, saint louis polyomavirus. *Genome announcements* 1, doi:10.1128/genomeA.00812-13 (2013).
- 110 Lim, E. S., Meinerz, N. M., Primi, B., Wang, D. & Garcea, R. L. Common Exposure to STL Polyomavirus During Childhood. *Emerging Infectious Diseases* 20, 1559-1561, doi:10.3201/eid2009.140561 (2014).
- 111 Gaboriaud, P. *et al.* Age-specific seroprevalence of human polyomavirus 12 and Saint Louis and New Jersey polyomaviruses. *Emerging microbes & infections* 7, 22, doi:10.1038/s41426-018-0026-0 (2018).
- 112 Kamminga, S., van der Meijden, E., Feltkamp, M. C. W. & Zaaijer, H. L. Seroprevalence of fourteen human polyomaviruses determined in blood donors. *PLoS one* 13, e0206273, doi:10.1371/journal.pone.0206273 (2018).
- 113 Jeles, K., Katona, M. & Csoma, E. Seroprevalence of Four Polyomaviruses Linked to Dermatological Diseases: New Findings and a Comprehensive Analysis. *Viruses* 14, doi:10.3390/v14102282 (2022).
- 114 Sroller, V. *et al.* Seroprevalence rates of BKV, JCV, and MCPyV polyomaviruses in the general Czech Republic population. *Journal of medical virology* 86, 1560-1568, doi:10.1002/jmv.23841 (2014).
- 115 Nicol, J. T. *et al.* Age-specific seroprevalence of Merkel cell polyomavirus, Human polyomaviruses 6, 7 and 9 and Trichodysplasia Spinulosa-associated polyomavirus. *Clin Vaccine Immunol* (2013).
- 116 Kamminga, S. *et al.* Development and evaluation of a broad bead-based multiplex immunoassay to measure IgG seroreactivity against human polyomaviruses. *Journal of clinical microbiology*, doi:10.1128/JCM.01566-17 (2018).
- 117 Csoma, E. *et al.* Study of Karolinska Institutet and Washington University polyomaviruses in tonsil, adenoid, throat swab and middle ear fluid samples. *Future Microbiology* 13, 1719-1730, doi:10.2217/fmb-2018-0280 (2018).

- 118 Martel-Jantin, C. *et al.* Molecular epidemiology of merkel cell polyomavirus: evidence for geographically related variant genotypes. *Journal of clinical microbiology* 52, 1687-1690, doi:10.1128/JCM.02348-13 (2014).
- 119 Hashida, Y. *et al.* Genetic Variability of the Noncoding Control Region of Cutaneous Merkel Cell Polyomavirus: Identification of Geographically Related Genotypes. *The Journal of infectious diseases* 217, 1601-1611, doi:10.1093/infdis/jiy070 (2018).
- 120 Moens, U., Song, X., Van Ghelue, M., Lednicky, J. A. & Ehlers, B. A Role of Sp1 Binding Motifs in Basal and Large T-Antigen-Induced Promoter Activities of Human Polyomavirus HPyV9 and Its Variant UF-1. *Int J Mol Sci* 18, doi:10.3390/ijms18112414 (2017).
- 121 Ajuh, E. T. *et al.* Novel Human Polyomavirus non-coding control regions differ in bi-directional gene expression according to host cell, large T-antigen expression, and clinically occurring rearrangements. *Journal of virology*, doi:10.1128/JVI.02231-17 (2018).
- 122 Moens, U., Van Ghelue, M., Ludvigsen, M., Korup-Schulz, S. & Ehlers, B. Early and late promoters of BK polyomavirus, Merkel cell polyomavirus, Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus and human polyomavirus 12 are among the strongest of all known human polyomaviruses in 10 different cell lines. *Journal of General Virology* 96, 2293-2303, doi:10.1099/vir.0.000181 (2015).
- 123 Biazik, J. M., Jahn, K. A., Su, Y., Wu, Y. N. & Braet, F. Unlocking the ultrastructure of colorectal cancer cells in vitro using selective staining. *World journal of gastroenterology* 16, 2743-2753, doi:10.3748/wjg.v16.i22.2743 (2010).
- 124 Moens, U., Seternes, O. M., Johansen, B. & Rekvig, O. P. Mechanisms of transcriptional regulation of cellular genes by SV40 large T- and small T-antigens. *Virus genes* 15, 135-154, doi:10.1023/a:1007962908248 (1997).
- 125 Schmitt, M. K. & Mann, K. Glycosylation of simian virus 40 T antigen and localization of glycosylated T antigen in the nuclear matrix. *Virology* 156, 268-281, doi:10.1016/0042-6822(87)90407-7 (1987).
- 126 Klockmann, U. & Deppert, W. Acylation: a new post-translational modification specific for plasma membrane-associated simian virus 40 large T-antigen. *FEBS letters* 151, 257-259, doi:10.1016/0014-5793(83)80081-7 (1983).
- 127 Grasser, F. A., Scheidtmann, K. H., Tuazon, P. T., Traugh, J. A. & Walter, G. In vitro phosphorylation of SV40 large T antigen. *Virology* 165, 13-22, doi:10.1016/0042-6822(88)90653-8 (1988).

## 11. TÁRGYSZAVAK

szeroprevalencia; DNS prevalencia; humán polyomavírusok; HPyV9; MWPyV; STLPyV; SARS-CoV-2; NCCR; *in vitro* promoter aktivitás

### KEYWORDS

seroprevalence; DNA prevalence; human polyomaviruses; HPyV9; MWPyV; STLPyV; SARS-CoV-2; NCCR; *in vitro* promoter activity

## **12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Elsősorban témavezetőmnek dr. Csoma Eszternek tartozom hálával, amiért mindig türelemmel és készséggel állt rendelkezésemre. Valamint köszönöm neki, hogy a PhD éveim alatt hozzájárult szakmai ismereteim bővítéséhez.

Köszönettel tartozom dr. Kónya József intézetvezetőnek a lehetőségért, hogy doktori kutatómunkám az Orvosi Mikrobiológia Intézetben végezhettem.

Köszönet illeti dr. Gergely Lajos professzor urat, kutatócsoportunk korábbi tagját. Külön köszönettel tartozom még dr. Jeles Krisztinának, hogy a számomra nehéz időszakokban is mindig megértően és örömmel segítette a közös munkánkat.

Az Orvosi Mikrobiológia Intézet valamennyi munkatársát is köszönet illeti, aki bármilyen formában hozzájárult a kutatómunkánkhoz.

Nagy köszönettel tartozom minden vizsgálatba bevont személynek, hiszen nélkülük a munka sem valósulhatott volna meg.

Végül pedig rendkívüli hálával és szeretettel köszönöm a Férjemnek, aki az élet nehézségein keresztül is támogattott, és Családom minden további tagjának, hogy mindig támogattak és bíztattak a PhD munkám elkészülésében.

### **A munka támogatói**

A munka a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal FK128533 számú pályázati finanszírozásával, valamint a TKP2021-EGA-19 számú projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a TKP2021-EGA pályázati program finanszírozásában valósult meg.

## 13. FÜGGELÉK



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/592/2024.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Katona Melinda  
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10069547

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Katona, M.**, Jeles, K., Takács, P., Csoma, E.: DNA and seroprevalence study of MW and STL polyomaviruses.  
*J. Med. Virol.* 96 (8), 1-10, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.29860>  
IF: 6.8 (2023)
2. **Katona, M.**, Jeles, K., Takács, P., Csoma, E.: Prevalence and in vitro study of human polyomavirus 9.  
*Sci. Rep.* 14, 1-16, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-024-80806-3>  
IF: 3.8 (2023)

### További közlemények

3. **Katona, M.**, Jeles, K., Kovács, R. L., Csoma, E.: KI and WU Polyomaviruses: seroprevalence Study and DNA Prevalence in SARS-CoV-2 RNA Positive and Negative Respiratory Samples.  
*Microorganisms.* 10 (4), 1-12, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10040752>  
IF: 4.5
4. Jeles, K., **Katona, M.**, Csoma, E.: Seroprevalence of Four Polyomaviruses Linked to Dermatological Diseases: New Findings and a Comprehensive Analysis.  
*Viruses-Basel.* 14 (10), 1-16, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/v14102282>  
IF: 4.7
5. Steuer-Hajdu, K., Ványai, B., **Katona, M.**, Szegedi, A.: Az atópiás dermatitisz.  
*Orvostovábbk. Szle.* 25 (2), 64-68, 2018.





**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

6. Gáspár, K., **Katona, M.**, Szegedi, A.: Az atópiás dermatitisz modern szemlélete: új, komplex, több támadáspontú terápiák.  
*Med. Tribune. 2018, 15-16, 2018.*
7. Csoma, E., Bidiga, L., Méhes, G., **Katona, M.**, Gergely, L.: Survey of KI, WU, MW and STL polyomavirus in cancerous and non-cancerous lung tissues.  
*Pathobiology. 85 (3), 179-185, 2018.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000481174>  
IF: 1.831

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 21,631**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
10,6**

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

Debrecen, 2024.12.16.

