

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

Humán polyomavírusok prevalencia és *in vitro*  
vizsgálata

Katona Melinda

Témavezető: Dr. Csoma Eszter



DEBRECENI EGYETEM

Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2025

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a gyógyszerészeti tudományok  
tudományágban

Írta: Katona Melinda okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola Mikrobiológia  
programja keretében

Témavezető: Dr. Csoma Eszter, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Fehér Enikő, PhD

Dr. Gáll Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Juhász Béla, PhD

tagok: Dr. Fehér Enikő, PhD

Dr. Kaszab Eszter, PhD

Dr. Varga-Kugler Renáta, PhD

Dr. Gáll Tamás, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme  
2025.április, 7., 13 óra

## Rövidítések jegyzéke

BKPyV	BK polyomavírus
E	korai régió
9	HPyV9 referenciaszekvencia
9_E	HPyV9 referenciaszekvencia korai promoterének aktivitása
9_L	HPyV9 referenciaszekvencia korai 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 késő promoterének aktivitása
VP1	vírus protein 1

## Bevezetés

Jelenleg a *Polyomaviridae* víruscsaládon belül 13 vírust sorolunk a humánpatogének közé, de ezek közül mindössze négy esetében ismerjük pontosan, milyen betegséget vagy tünetet okoznak. Az elsőként felfedezett BK és JC polyomavírusokról (BKPyV és JCPyV) tudjuk, hogy a populáció nagy részét megfertőzik, bár ma sem tudjuk biztosan, hogyan terjednek, mi a behatolási kapu. Látens formában élethosszig a szervezetben maradnak, reaktivációjuk az immunszupprimált betegek esetében jelent komoly kockázatot. Genetikai variánsaik földrajzilag elkülönülnek.<sup>1,2</sup> A Merkel sejt polyomavírus (MCPyV) tumorvírusként a Merkel sejt carcinomát okozza, amely ugyan ritka, de rendkívül rossz prognózisú bőrdaganat. Szeroprevalencia adatok alapján a vírus az emberek többségét megfertőzi, az onkogenezis pontos mechanizmusa még nem teljesen ismert. A DNS prevalencia vizsgálatok alapján feltételezhető a bőr-bőr kontaktussal, légúti váladékokkal, nyállal és fekál-orál úton való terjedés. Ugyanakkor továbbra sem tisztázott, hogy a szervezetben pontosan mely sejtekben zajlik a replikációja.<sup>3</sup> A trichodysplasia spinulosa asszociált polyomavírust (TSPyV) egy ritka bőrbetegségből azonosították, amelyet kizárólag immunszupprimált betegekben írtak le. Érdekessége, hogy nemcsak a vírus reaktivációja okozhat klinikai tüneteket, hanem a primer fertőzés is. Bár szerológiai adatok szerint a vírus széles körben elterjedt a populációban, az általa okozott megbetegedést mégis ritkán diagnosztizálják.<sup>4</sup> A patogenezis mellett ebben az esetben is nyitott kérdés marad a terjedési mód és a replikáció pontos helye. 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 virológiai alapkérdések tisztázásához tudnunk kell, hogy mikor történhet a primer infekció, mennyire elterjedtek, vannak-e földrajzi különbségek, esetleg vannak-e olyan betegcsoportok, akik fogékonyabbak a fertőzésre. Ezeknek a kérdéseknek a megválaszolásában a szeroprevalencia vizsgálatok nyújthatnak segítséget. A DNS prevalencia vizsgálatok hozzájárulhatnak a terjedési módok és a replikáció helyének feltérképezéséhez. A genomok szekvenálása és a szekvenanciaelemzés révén meghatározható, hogy ezeknek a vírusoknak vannak-e eltérő genotípusai, és hogy ezek földrajzilag elkülönülnek-e egymástól. A replikációt és génexpressziót szabályozó régiók varianciájának elemzése, majd ezek *in vitro* funkcionális vizsgálata segíthet feltárni az esetleges biológiai különbségeket, valamint azonosítani a vírusok potenciális célsejtjeit is.

## Irodalmi áttekintés

A *Polyomaviridae* család első tagját az 1950-es években izolálták egérből.<sup>5</sup> A polyomavírus (PyV) görög eredetű elnevezés, a tumorkeltő tulajdonságra utal: a sok jelentésű poly és a tumor értelmű oma szavak összetételéből keletkezett. A *Polyomaviridae* családban a Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság jelenleg (ICTV, <https://ictv.global>) 118 emlősöket, így embert is, madarakat és halakat fertőző fajt tart nyilván.

Az első humánpatogén vírusokat, a BK és a JC polyomavírust 1971-ben izolálták. 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>1,2</sup> A KI és a WU polyomavírust (KIPyV és WUPyV) is légúti betegségben szenvedő gyerekek orrgarat mintájából írták le 2007-ben. Az azóta zajló kutatások ellenére sem sikerült kóroki szerepüket feltárni.<sup>6,7</sup> 2008-ban egy ritka, de igen rossz prognózisú bőrtumorból, a Merkel sejt carcinomából azonosították az MCPyV-et. Máig az egyetlen humánpatogén polyomavírus, amelyet egyértelműen tumorvírusként tartunk számon.<sup>3,8</sup> A humán polyomavírus 6-ot és 7-et (HPyV6, HPyV7) egészséges személyektől vett bőrmintából írták le 2010-ben.<sup>9</sup> Néhány esettanulmány alapján feltételezik, hogy mindkét vírus immunszupprimáltakban hiperkeratózissal járó bőrtüneteket okozhat. 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>4</sup> Egy évvel később publikálták a következő vírust, a humán polyomavírus 9-et (HPyV9) vesetranszplantált beteg szérumából.<sup>10</sup> 2012-ben az MW polyomavírust (MWPyV),<sup>11</sup> egy évvel később az STL polyomavírust (STLPyV) írták le gyerekek székletmintáiból.<sup>12</sup> 2014-ben egy transzplantált beteg izombiopsziájából azonosított új polyomavírussal, a New Jersey polyomavírussal (NJPyV),<sup>13</sup> majd 2017-ben bőrmintából szekvenált LI polyomavírussal (LIPyV) bővült a víruscsalád.<sup>14</sup> Az utóbbi öt vírus egyikét sem tudjuk jelenleg betegséghez társítani. Néhány éve két újabb, feltételezhetően humánpatogén polyomavírus genomot írtak le, 2019-ben székletből a Quebec polyomavírust (QPyV),<sup>15</sup> 2023-ban bőrmintából a HPyV16-ot.<sup>16</sup> Ezeket az ICTV még nem sorolta be a víruscsaládba. A humán polyomavírus 12 (HPyV12) genomját májszövetből 2013-ban szekvenálták.<sup>17</sup> Mivel majdnem teljesen identikus szekvenciát cickányokból is publikáltak, jelenleg kérdéses a vírus gazdafaja, ezért nem szerepel a humánpatogén vírusok közt.<sup>18</sup>

A polyomavírusok kisméretű, 45–50 nanométer átmérőjű, lipidburokkal nem rendelkező, ikozaéderes szimmetriájú vírusok. Kapszidjuk 72 kapszomerből épül fel, melyek fő komponense a VP1 (vírus protein 1) fehérje, amely pentamereket alkot. A kapszomerek stabilitását a C-terminális régiók közti kapcsolatok biztosítják, amelyeket diszulfid-hidak és kalciumionok tovább erősítenek. Minden kapszomer a virion belseje felé egy VP2 vagy VP3 fehérjével kapcsolódik. Szekvenciaelemzések alapján feltételezik a VP4 fehérje jelenlétét is a BKPyV és JCPyV esetében, hasonlóan néhány állati polyomavírushoz.<sup>19</sup> Mivel a VP1 fehérje helyezkedik el a kapszid külső felszínén, ez határozza meg a vírus receptorspecificitását, vagyis azt, hogy milyen sejtekhez képes kötődni. Továbbá a fertőzésen átesetteknél ez ellen termelődik neutralizáló ellenanyag.<sup>20</sup> A polyomavírusok cirkuláris, duplaszálú DNS genommal rendelkeznek. A genom funkcionális egységei a korai (E), a késői (L) és a kettő közötti, nem kódoló, szabályozó régió (NCCR). Érdekesség, hogy mindkét szálról történik transzkripció ellentétes irányban. A korai régió a tumor antigéneket (TAG) kódolja. A nagy T antigén (LTAg)

konzervált motívumokkal rendelkezik, és számos funkciója van: kulcsszerepet játszik a génextpresszió szabályozásában és a virális genom replikációjában. A késői régió a kapszidot alkotó szerkezeti fehérjéket kódolja, valamint mikroRNS-ek is szintetizálódnak e régióról. Ezenkívül a BKPyV és JCPyV késői régiójáról agnoprotein is keletkezik, amely serkenti a vírus DNS replikációját és a virion összeszerelődését.<sup>21</sup> Az NCCR régió kulcsszerepet játszik a polyomavírusok sejtropizmusának és génextpressziójának szabályozásában, meghatározva, hogy a vírus mely sejtípusokban képes replikálódni. Itt található a replikációs origó, LTA<sub>g</sub> kötőhely(ek), a promoterek és enhancerek mindkét irányban. A különböző vírusfajok NCCR szekvenciái nagyon különbözőek, és hipervariábilis régióként fajon belül is jelentős változékonyságot mutatnak.<sup>22</sup>

### **Humán polyomavírus 9**

A HPyV9-ről eddig megjelent tanulmányok alapján a felnőttkori szeroprevalencia 11% és 47% közti. Az adatok jelentős eltérései mellett az is változó, hogy a pozitív arány miként alakult az egyes korosztályokban. Beszámoltak életkorral folyamatosan növekvő átfertőzöttségről, míg más kutatócsoportok felnőttkorban nem tapasztalták a szeroprevalencia növekedését, sőt, idősek körében csökkenő arányt detektáltak. Mások viszont alacsony, életkorral alig változó adatokat közöltek.<sup>23-26</sup> Az adatok különbözőségeit magyarázhatják a módszertani, a vizsgálati csoportok közti eltérések, de akár földrajzi különbség is állhat a háttérben. HPyV9 DNS-t alacsony prevalenciával mutattak már ki vérből,<sup>10,27-31</sup> vizeletből,<sup>10,28</sup> légúti mintából,<sup>28,31</sup> bőrmintából,<sup>28</sup> garatmandulából<sup>32</sup> és tüdőszövetből is<sup>28</sup>. Mások viszont nem detektálták a vírust vérből,<sup>23,33</sup> vizeletből,<sup>23-25</sup> bőrmintából,<sup>27,34</sup> légúti mintából,<sup>23,35,36</sup> garatmandulából,<sup>37-39</sup> székletből<sup>36</sup> és likvorból<sup>36,40</sup> sem. A HPyV9 terjedési módja továbbra is rejtély, a légúti, a szájon át, esteleg a bőr a bőrrel kontaktus útján való terjedés vizsgálata indokolt. Vizsgálták a HPyV9 jelenlétét különféle tumorokban, minden vizsgálat negatív eredménnyel zárult.<sup>39,41-46</sup> Felmerült, hogy az immunszuppresszió növelheti a vírusfertőzés iránti fogékonyságot, illetve ha látens fertőzés alakul ki, a reaktivációt. Egy tanulmányban a vesetranszplantáltakban szignifikánsan nagyobb arányban mutattak ki virémiát az egészséges véradókhoz képest, sőt, szerokonverziót is nagyobb arányban igazoltak a kontroll csoporttal összevetve.<sup>11</sup> Mások azonban sem vesetranszplantáltak,<sup>47</sup> sem allogén őssejttranszplantáltak esetében nem mutattak ki hasonlót.<sup>48</sup> Egy esetsorozat elemzés kapcsán három szervátültetett beteg több mintájából HPyV9 DNS-t, sőt, mRNS-t is detektáltak, egyéb, ismert kórokozót nem. Mindhárom betegnek kezdetben bőrtünetei jelentkeztek, majd egy éven belül többszervi elégtelenségben elhunytak.<sup>28</sup>

A HPyV9 *in vivo* sejtropizmus ismeretlen.<sup>49</sup>

### **MW polyomavírus**

A vírus kóroki szerepe, a terjedési mód, a replikáció helye nem ismert, jelenleg viszonylag kevés DNS és szeroprevalencia adat áll rendelkezésre.

A szeroprevalencia vizsgálatok meglehetősen ellentmondóak, az eddigi közleményekben a felnőttkori szeropozitív arány 41–99%.<sup>34,50-54</sup> A gyermekeket is vizsgáló kutatások eredményei szerint a primer fertőzések jelentős része gyermekkorban történik.<sup>53,54</sup> A világ különböző pontjairól származó, eltérő adatok mögött ebben az esetben is állhatnak módszertani

különbségek, de az átfertőzöttség földrajzi eltérése sem zárható ki. Sőt, akár földrajzilag eltérő vírusok, geno-, akár szerotípusok is létezhetnek.

A MWPyV DNS-t egészséges, valamint gasztrointesztinális tünetekkel rendelkező gyermekek és felnőttek székletmintáinak 0,5–12,8%-ában mutatták ki, ami arra utal, hogy a vírus fekál-orál úton terjedhet.<sup>55,56</sup> Légúti minták 0,7–9,2%-ában is detektálták, döntően gyermekek mintáiban.<sup>56,57</sup> Ez alapján a légúti terjedés is feltételezhető. A munkacsoportunk által végzett korábbi kutatások során tüdőszöveti mintákban nem sikerült kimutatnunk a vírus genomját.<sup>58</sup> Azonban MWPyV DNS jelenlétét igazolták már garat- és orrmandulában is.<sup>38,39</sup> A vírust kimutatták továbbá condylomában<sup>59</sup> és egyéb bőrmintában is.<sup>60,61</sup> A vírus szervezeten belüli disszeminációját vizsgálva vér-, vizelet- és likvor mintákat is elemeztek, de MWPyV DNS-t csupán egy egészséges véradó vérmintájában mutattak ki.<sup>30</sup> Így jelenleg kérdéses, hogy a vírus a behatolás, majd a célsejtekben történő replikáció után disszeminálódik-e a szervezetben, kialakul-e perzisztens, látens fertőzés.

### **STL polyomavírus**

Az STLPyV-vel kapcsolatban még kevesebb adattal rendelkezünk. 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>62-64</sup>

A fekál-orál módon történő terjedés lehetősége felmerült. A vírust tünetmentes és hasmenéssel rendelkező gyermekek székletmintáinak 0,26–4,4%-ában mutatták ki.<sup>65,66</sup> A vírus leírói vesetranszplantáltak orrgarati és plazmamintáiban nem detektálta a vírust, mindössze egy vizeletben igazolta a vírusgenom jelenlétét.<sup>12</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>67</sup> Egy kínai kutatócsoport gyermekek garatmandulájának 2%-ában azonosított STLPyV DNS-t,<sup>38</sup> egy német kutatócsoport viszont nem detektált STLPyV-et sem tumoros, sem tumormentes mandulaszövetben.<sup>60</sup> A vírus és a bőr kapcsolatát két csoport vizsgálta. Egy immunszupprimált beteg condylomájából STLPyV DNS-t azonosítottak. A vírus DNS-ét egészséges felnőttek homlokáról és kezéről vett bőrminták 7,3%, illetve 8,3%-ában detektálták.<sup>62-64</sup>

## Célkitűzések

A kutatómunkát három fő irányvonalban terveztük.

1. HPyV9, MWPyV és STLPyV szeroprevalenciájának vizsgálatához az alábbi célokat tűztük ki:
  - immunkompetens gyermekektől és felnőttektől származó szérumminták gyűjtése;
  - VP1 fehérjék előállításának bakteriális fehérjeexpressziós rendszerben;
  - ELISA módszer tervezése és optimalizálása;
  - szeroprevalencia vizsgálatok elvégzése és analízise.
2. HPyV9, MWPyV és 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 mintákból polyomavírus genomok, genomrészletek 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.

## Anyagok és módszerek

### Szeroprevalencia vizsgálatok

#### Minták

A szeroprevalencia vizsgálatához szükséges szérummintákat 2016 és 2021 között a Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológia diagnosztikai vizsgálataira érkezett minták közül gyűjtöttük.

A HPyV9 szeroprevalencia vizsgálatot összesen 1038, 0,7 és 93 év közti egyénektől származó szérummintával végeztük, melyből 718 minta felnőttől (>18év) és 320 gyerektől (<18év) származott. Az MWPyV és STLPyV szeroprevalencia vizsgálatokat azonos mintaállománnyal, 618–618 szérummintával végeztük. A mintákat 0,8 és 90 év közti gyermekektől (n=235) és felnőttektől (n=383) gyűjtöttük.

#### VP1 expressziós plazmidok előállítása

Minden vizsgált vírus esetében a VP1 fehérjét kódoló gént szintetizáltattuk a referencia szekvenciák alapján. Az MWPyV és HPyV9 szekvenciákat kodonoptimalizáltuk, az STLPyV szekvenciát nem, az N-terminális végekre 6xHis tag szekvenciát illesztettünk. Az inzerteket pTriEx-4 Neo (Novagen) expressziós vektorba klónoztuk. 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 fehérjék tisztítását affinitás kromatográfiával (Protino NI-TED Packed Columns, Macherey Nagel) a 6xHis tag segítségével végeztük denaturáló körülményeket alkalmazva. Az urea eltávolítása dialízissel történt. A fehérjéket felhasználásig -20 °C-on tároltuk. A tisztított fehérjék mennyiségi és minőségi analizisét BCA assay-vel, Western-blottal, valamint Coomassie Brilliant Blue festéssel végeztük.

#### ELISA

A polyomavírus kapszidfehérjék elleni IgG antitestek kimutatására indirekt, kolorimetriás ELISA módszert terveztünk és optimalizáltunk. Az ELISA méréseket HPyV9 esetében 50 ng, míg MWPyV és STLPyV esetében 100 ng VP1 fehérjével végeztük. 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 OD értékeket 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.

#### DNS prevalencia vizsgálatok

##### Minták

DNS prevalencia vizsgálatainkhoz 2016 májusa és novembere között garat- és/vagy orrmandula műtéten áteső betegek mintáit gyűjtöttük. Valamennyi betegtől közvetlenül a műtét előtt tamponnal torokváladékot (n=146), valamint, ha a betegnek a műtét idején szerózus otitis

mediája volt, középfülvéladékokat is (n=15) vettek. Összesen 100 garatmandula és 100 orrmandula szöveti mintát gyűjtöttünk, 54 betegől mindkét mintatípust, 46–46 betegől csak az egyik mintát. A nukleinsavat DNeasy Blood and Tissue kittel (Qiagen) izoláltuk. 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. MWPyV és STLPyV DNS prevalencia vizsgálatát 1130 beteg orrgarati mintájából végeztük, míg a HPyV9 DNS kimutatásához 919 orrgarati mintát használtunk. A nukleinsav izolálása 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 történt. A HPyV9 DNS jelenlétét tumoros és nem tumoros tüdőszöveti mintákban is vizsgáltuk. Ehhez 143 betegől származó 147 tüdőszöveti mintát vizsgáltunk, amelyek közül 100 minta tüdőkarcinomás betegől származott, 47 kontroll minta nem tumoros szövet volt. A mintákat 2012 és 2016 között küldték patológiai vizsgálatra a Debreceni Egyetem Patológiájára. A nukleinsav izolálása High Pure FFPE DNA Isolation Kittel (Roche) történt a gyártói utasítást követve.

### **Valós idejű PCR**

A valós idejű PCR-eket Applied Biosystems 7500 real-time PCR és QuantStudio 5 (Applied Biosystems) készülékekkel TaqMan Universal PCR Master Mix felhasználásával végeztük. Az MWPyV és STLPyV DNS kimutatása multiplex, valós idejű PCR-rel történt (Applied Biosystems) korábban publikált primerek és próbák felhasználásával.<sup>11</sup> A HPyV9 DNS kimutatásához a primereket és próbát magunk terveztük. A PCR protokollok az alábbiak szerint zajlottak: 50 °C 2 p, 95 °C 10 p, 45 ciklus: 95°C 15 mp és 60°C 1 perc. A fluoreszcencia jel detektálása 60°C-on zajlott. A HPyV9 pozitivitást az LTA<sub>g</sub> régió amplifikációjával és szekvenálásával is megerősítettük.

A valós idejű PCR pozitív mintákból MWPyV és STLPyV NCCR régiót, valamint STLPyV és HPyV9 teljes genomot amplifikáltunk. Az amplikonok Sanger szekvenálása után a szekvenciákat analizáltuk: filogenetikai és haplotípus hálózat elemzést végeztünk, illetve az NCCR régió mutációit vizsgáltuk.

### **HPyV9 promotor aktivitásainak *in vitro* vizsgálata**

#### **Vektorok**

A referencia HPyV9 genom és az UF-1 izolátum teljes NCCR szekvenciáját pGL4Luc-RLuc (Addgene) kétirányú riporter vektorba klónoztuk. Az NCCR vektorba illesztése után a polyomavírus kétirányú promotere szabályozza a vektor ellentétes irányban kódolt firefly és *Renilla* luciferáz génjeinek expresszióját. A HPyV9 LTA<sub>g</sub>-t kódoló gént pcDNA3.1+ vektorba (Thermo Fisher Scientific) klónoztuk.

#### **Sejtkultúrák**

Az *in vitro* kísérleteinket különböző sejttípusokkal végeztük: primer, légúti epitél sejtet, MRC-5 tüdő fibroblaszt sejtet, A549 tüdőepitél sejt vonalat, HEK-293 veseepitél sejtet, Caco2-bélepitél sejtet és SK-HEP1 endotél sejtet használtunk. Az ATCC-től származó sejteket a megfelelő tápfolyadékokban tartottuk fenn.

### **Transzfekció**

A sejteket a transzfekció előtt 24 órával 12 lyukú tenyésztőlemezre szélesztettük, majd 1 µg riporter vektort (pGL4Luc-RLuc HPyV9 NCCR-rel vagy anélkül) Lipofectamine 2000 reagenssel (Thermo Fisher Scientific) transzfektáltunk a sejtekbe. Kotranszfekció során a riporter vektor mellett 200 ng LTA<sub>g</sub>-t expresszáló vagy üres pcDNA3.1(+) kontroll vektort is alkalmaztunk. A kísérleteket minden esetben három párhuzamos sejttenyészettel végeztük, és három független alkalommal ismételtük. A promoter aktivitást 24 óra elteltével Dual-Luciferase Reporter Assay Kittel (Promega) mértük. A firefly luciferáz a késői (L), míg a *Renilla* luciferáz a korai (E) promoter aktivitást reprezentálta, az értékeket fehérjekoncentrációra normalizáltuk. Az LT fehérje expresszióját Western blottal ellenőriztük.

### **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.

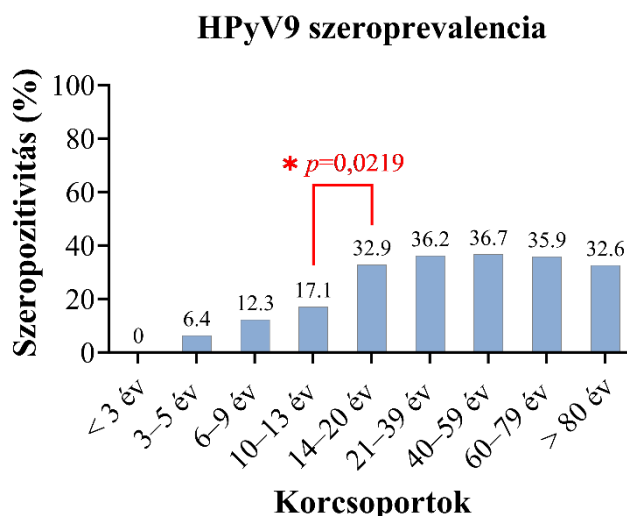
## Eredmények és megbeszélés

Az antigéneket mindhárom polyomavírus esetén megfelelőnek ítéltük a szerológiai reakciók elvégzéséhez. Specificitási vizsgálatokat homológ és heterológ fehérjékkel végeztünk, amely alapján az ELISA vizsgálatokat szintén megfelelőnek értékeltük.

### HPyV9 szeroprevalencia vizsgálat eredményei

Adatainkat korcsoportokra bontva is elemeztük. Az egymást követő korcsoportok szeroreaktivitásában statisztikailag szignifikáns növekedést csak a 10–13 éves és a 14–20 éves korcsoportok között figyeltünk meg ( $p=0,0151$ ; Mann-Whitney U teszt). Kruskal-Wallis, Dunn post hoc analízis alapján a szeroreaktivitás statisztikailag is igazolhatóan növekedett az életkor előrehaladtával egészen fiatal felnőtt korig. A HPyV9 szeroprevalencia a teljes kohorszban 30,6%-nak bizonyult, a felnőttek ( $>18$  év) közt 36,2% volt a fertőzésen már átesettek aránya. Az eltérő vizsgálati módszerek ellenére az általunk mért HPyV9 szeroprevalencia több kutatócsoport eredményével egyezik. A szeroprevalenciát, a szeropozitívok arányát korcsoportonkénti bontásban mutatja az **1. ábra**.

**1.ábra:** HPyV9 szeropozitivitás korcsoportonként

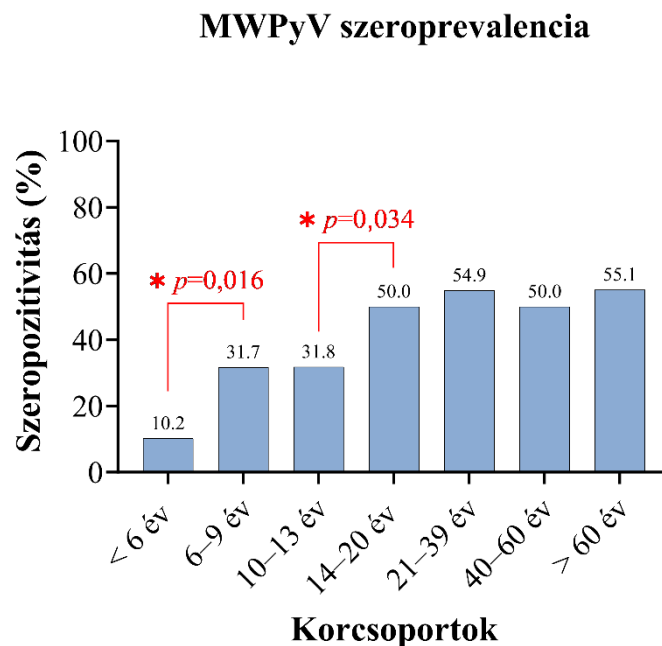


A legfiatalabb, 3 év alatti korcsoportban nem mutattunk ki HPyV9 elleni antitesteket. Az antitest-pozitivitási arány 3 év felett az életkor előrehaladtával a 21–39 éves korcsoportig szignifikánsan növekedett. Hasonlóan a szeroreaktivitáshoz, a 10–13 éves és a 14–20 éves korcsoportok között a szeroprevalencia szignifikáns növekedését tapasztaltuk ( $p=0,0219$ ; Fisher egzakt teszt), illetve a fiatal felnőtt korig tartó átfertőzöttségi arány növekedést  $X^2$  trend teszttel is alátámasztottuk ( $p<0,0001$ ). Nemek közti különbséget az átfertőzöttségi adatokban nem mutattunk ki. Eredményeink alapján a vírus jelen van hazánkban, viszont a felnőttek jelentős aránya fogékony a vírusfertőzésre

## MWPyV szeroprevalencia vizsgálat eredményei

A szeroreaktivitásban szignifikáns eltérést, növekedést a két legfiatalabb korcsoport közt, valamint a 10–13 éves és a 14–20 éves korcsoport között detektáltunk. 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;  $p=0,182$ ). Az MWPyV szeropozitivitási arányokat korcsoportonként a **2. ábra** mutatja. 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. A szeroreaktiváshoz hasonlóan 21 éves kor felett az antitest-pozitivitási arány nem mutatott jelentős változást (50–55,1%).

2. ábra: MWPyV szeropozitivitás korcsoportonként



Eredményeink hasonlóak egy olaszországi tanulmányban közölt adatokhoz, bár ők magasabb gyermekkori átfertőzöttségről számoltak be.<sup>68</sup> Egy másik, szintén olasz vizsgálat a 8–17 évesek közt igen magas, 91%-os szeropozitivitási arányt mutatott ki.<sup>69</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 tapasztaltnak.<sup>50</sup> Ugyanakkor felnőttek közt (>20 év) magasabb szeropozitivitási arányt, 65,7%-ot mértek, ami az idősebbek körében csökkenést mutatott. Néhány kutatócsoport jóval magasabb felnőttkori átfertőzöttségi adatot közölt: Csehországban

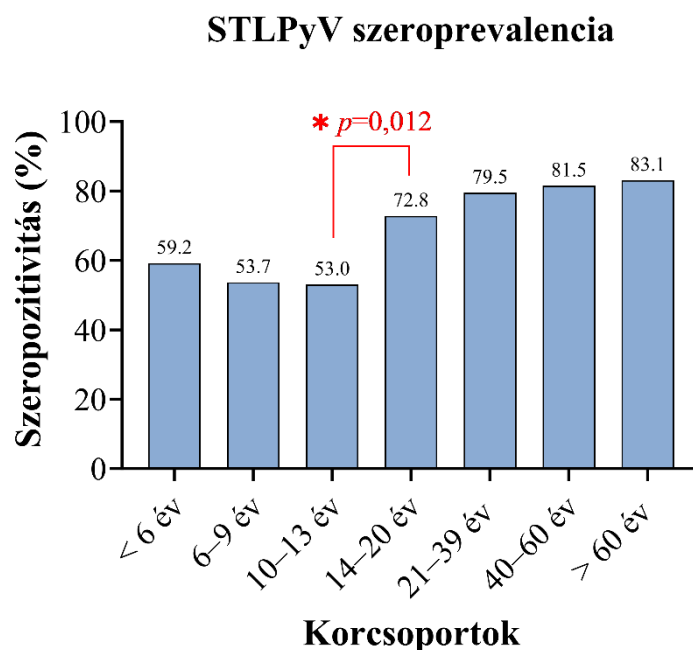
a felnőtt (>20 év) szeroprevalencia 85,6% volt, míg Hollandiában, az USA-ban és Ausztráliában ennél is magasabb, 97%-ot meghaladó.<sup>34,51,52,64</sup>

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 variánsai 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.

### STLPyV szeroprevalencia vizsgálat eredményei

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 alapján fiatal felnőtt korig az életkorral növekvő, 21 éves kor felett pedig viszonylag stabil szeroreaktivitást figyeltünk meg egy korábbi vizsgálatához hasonlóan. 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 szeronegatívakéhoz 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 **3. ábrán** láthatók.

3. ábra: STLPyV szeroprevalencia korcsoportonként



Hasonlóan más tanulmányok adataihoz, a 6 évesnél fiatalabb korcsoportban az STLPyV szeropozitivitás közel 60% volt, vagyis a primer fertőzés gyermekkorban gyakori.<sup>62,63</sup> 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 feletti korcsoportjában mértük. Bár az eddigi néhány tanulmány némiképp eltérő átfertőzöttségi mértéket, 68%–98% szeropozitivitást tárt fel,<sup>62-64</sup> eredményeink hasonlóak, és alátámasztják, hogy az STLPyV ubikviter vírus.

## **DNS prevalencia eredmények**

### **HPyV9 DNS prevalencia**

Ugyan megfelelő minőségű és mennyiségű DNS-t sikerült izolálni a 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>28</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%). A teljes vírusgenomot amplifikáltuk és szekvenáltuk (GenBank azonosító: MH844627). A COVID-19 világjárvány alatt gyűjtött orrgarati minták 5,2%-ában mutattuk ki a HPyV9 DNS-ét. Valamennyi valós idejű PCR pozitív mintából sikeresen amplifikáltuk és szekvenáltuk a vírus LTag szekvenciariészletét is, megerősítve ezzel az eredményeket. 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 gyermekekből (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 toroktörlethől 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>31</sup> Az, hogy a koronavírus világjárvány 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, iskolai 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.

### **HPyV9 szekvenanciaanalízis eredményei**

Jelenleg az általunk publikálttal együtt hét teljes HPyV9 genom szekvenciája érhető el a GenBank adatbázisban, amelyekkel filogenetikai és haplotípus hálózat elemzést végeztünk.

Mind a filogenetikai fa, mind a haplotípus hálózat elemzés alapján a genomok négy klasztere különült el. Az európai izolátumok egy klasztert alkottak. A szekvenciák NCCR régiói jelentősen különböznek.

### **MWPyV DNS prevalencia**

Sem orr-, sem garatmandulából nem detektáltunk MWPyV DNS-t. 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>38,70</sup> Két másik tanulmány azonban a miénkhez hasonlóan, negatív eredménnyel zárult.<sup>32,39</sup> A mandulaműtét során vett egy középfül váladékban, illetve a torokváladékok 2,7%-ában mutattuk ki az MWPyV DNS-t. A koronavírus világjárvány alatt gyűjtött orrgarati minták 4,9%-ában detektáltunk MWPyV DNS-t. 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.

A COVID-19 pandémia alatt gyűjtött nazofaringeális mintákban vizsgáltuk a SARS-CoV-2 és az MWPyV együttes jelenlétét is. A MWPyV DNS pozitivitás 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.

Az MWPyV patogenezise, terjedési módja, behatolási kapuja, a replikáció helye továbbra is ismeretlen, ahogy azt sem tudjuk, látens fertőzés létrejön-e a szervezetben. A fekély-orál terjedés mellett a vírusok légúti terjedése, szájon át behatolása is felmerül. Eredményeink ezt a felvetést erősítik. 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.

### **MWPyV szekvenálási eredményei**

A teljes NCCR régiót 21 MWPyV pozitív mintából amplifikáltuk és szekvenáltuk. Négy új pontmutációt írtunk le, egy izolátumban pedig egy 13 bázispáros deléciót. Bár az MWPyV NCCR szekvenálási varianciáinak biológiai jelentősége még nem tisztázott, feltételezhető, hogy ezek a mutációk befolyásolhatják a transzkripció faktor kötőhelyeket, valamint a promoterek és enhancerek működését.<sup>22</sup> Haplotípus hálózat elemzéssel vizsgáltuk, hogy az NCCR szekvenálási varianciák összefüggenek-e a mintatípusokkal, amelyekből izolálták vagy a földrajzi

régióval, ahonnan származnak. Azonban a haplotípusok sem a mintatípusokkal, sem a földrajzi régióval nem mutattak összefüggést, a haplotípusok nem rendeződtek klaszterekbe.

### **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. Az STLPyV pozitívitas 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. 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. 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.

Eredményeink alapján az STLPyV légúti terjedése felmerül, sőt, a vírus a középfülbe is behatolhat.

### **STLPyV szekvenenciaanalízis eredményei**

Munkánk során két teljes STLPyV genomot szekvenáltunk. Majd a GenBank további szekvenciáival együtt filogenetikai elemzést végeztünk. Megállapítottuk, hogy mind a filogenetikai fa, mind a hálózatelemzés 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.

Teljes NCCR régiót 11 STLPyV pozitív mintából amplifikáltunk és szekvenáltunk. Három új variánst és három új pontmutációt azonosítottunk. A haplotípus hálózat elemzés eredményei alapján az STLPyV NCCR szekvenciák két csoportba rendeződtek, azonban földrajzi és mintatípus szerinti elkülönülést STLPyV esetében sem tapasztaltunk.

### **HPyV9 in vitro funkcionális genomvizsgálata**

A HPyV9 promoterek különböző sejtípusokban történő funkcionális analízise segíthet azonosítani a vírus célsejtjeit. Emellett a jelentősen eltérő szekvenciavariánsok biológiai

különbözéseit is tanulmányozhatjuk. *In vitro* kísérleteinkben két HPyV9 izolátum (a referencia szekvencia, azaz 9, illetve az UF-1) promoter aktivitásait vizsgáltuk különböző sejtekben. A vírus lehetséges légúti terjedése és replikációja miatt választottuk a primer, légúti epitél sejtet, az MRC-5 tüdő fibroblaszt sejtet, valamint az A549 tüdőepitél sejt vonalat kutatásainkhoz. A HEK-293 veseepitél sejtet, ahogy az A549-cel is végeztek hasonló kísérleteket, ami lehetővé tette az eredmények összehasonlítását.<sup>71-73</sup> 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 szervezeten belüli terjedésében kulcsszerepet játszhat az erek endotélje.

A transzfekciós hatékonyságban mutatkozó különbségeket kiküszöbölve, eredményeinket úgyis elemeztük, hogy minden sejt típusban a 9\_E promoter aktivitáshoz viszonyítottuk a többi promoter aktivitását. Mindkét izolátum promoter aktivitásai az A549 sejtben voltak a legerősebbek, míg a leggyengébbek az MRC-5 fibroblasztban. A referencia szekvencia 9\_E promotere szignifikánsan erősebb aktivitást mutatott, mint a 9\_L a Caco-2, a primer légúti epitél, az SK-HEP-1 és MRC-5 sejtekben. Ezt A549 sejtek esetében nem tapasztaltuk, míg HEK-293 sejtekben a 9\_L aktivitása volt szignifikánsan erősebb. Ez utóbbit figyelte meg két másik kutatócsoport is.<sup>71,72</sup> Az UF-1 promotereinek aktivitása Caco-2 sejtekben közel azonos volt, azonban 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>71,72</sup> Légúti epitél és fibroblaszt sejtekben az UF-1\_L aktivitása szignifikánsan gyengébb volt az UF-1\_E-hez képest. Az UF-1 promoterei a HEK-293 kivételével, minden vizsgált sejt típusban magasabb aktivitást mutattak. Kotranszfekciós kísérletünkben az LTA<sub>g</sub> minden sejt típusban 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>74</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 sejt típusban 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 sejt típusától 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. Mindössze két kutatócsoport végzett hasonló kísérleteket A549 és HEK-293 sejtekkel. Hasonló, de eltérő eredményeket is publikáltak.<sup>71,72</sup> Ez utóbbi háttérben a nagyon eltérő módszertani különbségek állhatnak.

Bár a primer légúti epitél sejtekben alacsony promoter aktivitást mértünk, a legmagasabb értéket az A549 sejt vonalban tapasztaltuk. Ez arra utal, hogy a HPyV9 replikálódhat a tüdőben, és prevalencia adataink alapján a légutak a vírus behatolási kapuját jelenthetik. Eredményeink szerint az A549 és HEK-293 sejtek alkalmasak lehetnek a HPyV9 replikáció további vizsgálatára.

## 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 sejtípusokban 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 pozitívitás 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 riporter vektorral tanulmányoztuk légúti, vese- és bélepitél, valamint endotél sejtvonalon, 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 promotérének aktivitása egy kivétellel minden sejtben erősebbnek bizonyult. A vírus nagy T antigénje minden sejtben fokozta a késői promotor aktivitásokat. Az *in vitro* kísérletek alapján az A549 légúti epitél sejt vonal, illetve a HEK-293 veseepitél alkalmas lehet a HPyV9 vírusreplikációjára.

## 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.

## **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 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 támogatott, 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.



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.



## Irodalomjegyzék

- 1 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, doi:10.1016/s0140-6736(71)91776-4 (1971).
- 2 Padgett, B. L., Walker, D. L., ZuRhein, G. M., Eckroade, R. J. & Dessel, B. H. Cultivation of papovavirus-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1, 1257-1260 (1971).
- 3 Feng, H., Shuda, M., Chang, Y. & Moore, P. S. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319, 1096-1100 (2008).
- 4 van der Meijden, E. *et al.* Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromised patient. *PLoS pathogens* 6, e1001024, doi:10.1371/journal.ppat.1001024 (2010).
- 5 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).
- 6 Gaynor, A. M. *et al.* Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS pathogens* 3, e64 (2007).
- 7 Allander, T. *et al.* Identification of a third human polyomavirus. *Journal of virology* 81, 4130-4136, doi:10.1128/JVI.00028-07 (2007).
- 8 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. *Front Oncol* 12, 868781, doi:10.3389/fonc.2022.868781 (2022).
- 9 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).
- 10 Scuda, N. *et al.* A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *Journal of virology* 85, 4586-4590, doi:10.1128/JVI.02602-10 (2011).
- 11 Siebrasse, E. A. *et al.* Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. *Journal of virology* 86, 10321-10326 (2012).
- 12 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* 436, 295-303, doi:10.1016/j.virol.2012.12.005 (2013).
- 13 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  
jiu250 [pii] (2014).
- 14 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).
- 15 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).
- 16 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).
- 17 Korup, S. *et al.* Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. *PloS one* 8, e58021 (2013).
- 18 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).
- 19 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).
- 20 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.000000000000457 (2024).

- 21 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).
- 22 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).
- 23 Nicol, J. T. *et al.* Seroprevalence and cross-reactivity of human polyomavirus 9. *Emerging infectious diseases* 18, 1329-1332, doi:10.3201/eid1808.111625 (2012).
- 24 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).
- 25 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).
- 26 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).
- 27 van der Meijden, E. *et al.* Human polyomavirus 9 infection in kidney transplant patients. *Emerging infectious diseases* 20, 991-999, doi:10.3201/eid2006.140055 (2014).
- 28 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).
- 29 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).
- 30 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).
- 31 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, doi:10.1016/j.jcv.2012.07.009 (2012).
- 32 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).
- 33 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).
- 34 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).
- 35 Sauvage, V. *et al.* Human polyomavirus related to African green monkey lymphotropic polyomavirus. *Emerging infectious diseases* 17, 1364-1370 (2011).
- 36 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).
- 37 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).
- 38 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).
- 39 Herberhold, S. *et al.* Human polyomavirus and human papillomavirus prevalence and viral load in non-malignant tonsillar tissue and tonsillar carcinoma. *Medical microbiology and immunology* 206, 93-103, doi:10.1007/s00430-016-0486-6 (2017).
- 40 Delbue, S. *et al.* Human Polyomaviruses in the Cerebrospinal Fluid of Neurological Patients. *Microorganisms* 8, doi:10.3390/microorganisms8010016 (2019).
- 41 Bergallo, M. *et al.* DNA from Human Polyomaviruses, MWPyV, HPyV6, HPyV7, HPyV9 and HPyV12 in Cutaneous T-cell Lymphomas. *Anticancer Res* 38, 4111-4114, doi:10.21873/anticancer.12701 (2018).

- 42 Scola, N. *et al.* Prevalence of human polyomaviruses in common and rare types of non-Merkel cell carcinoma skin cancer. *The British journal of dermatology* 167, 1315-1320 (2012).
- 43 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 Res* 34, 639-643 (2014).
- 44 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).
- 45 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).
- 46 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* 83, 252-257, doi:10.1159/000445120000445120 [pii] (2016).
- 47 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).
- 48 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).
- 49 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. *The Journal of general virology* 98, 704-714, doi:10.1099/jgv.0.000714 (2017).
- 50 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).
- 51 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).
- 52 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).
- 53 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).
- 54 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).
- 55 Bergallo, M. *et al.* MW Polyomavirus in diarrheal Italian infants. *Minerva Pediatr (Torino)* 75, 327-330, doi:10.23736/S2724-5276.18.04991-5 (2023).
- 56 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).
- 57 Yu, G. *et al.* Discovery of a novel polyomavirus in acute diarrheal samples from children. *PloS one* 7, e49449 (2012).
- 58 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*, doi:10.1159/000481174 (2017).
- 59 Buck, C. B. *et al.* Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus. *Journal of virology* 86, 10887 (2012).
- 60 Bopp, L. *et al.* Natural History of Cutaneous Human Polyomavirus Infection in Healthy Individuals. *Front Microbiol* 12, 740947, doi:10.3389/fmicb.2021.740947 (2021).
- 61 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).
- 62 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).

- 63 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).
- 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, e0206273, doi:10.1371/journal.pone.0206273 (2018).
- 65 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).
- 66 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).
- 67 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).
- 68 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).
- 69 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).
- 70 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 9710.1186/s12985-016-0553-z (2016).
- 71 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. *International journal of molecular sciences* 18, doi:10.3390/ijms18112414 (2017).
- 72 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).
- 73 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).
- 74 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).