

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Ferenczi Annamária

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

DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2016

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Ferenczi Annamária

Témavezető: Dr. Veress György



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2016

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK.....	3
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
3. BEVEZETÉS	8
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
4.1 A papillomavírusok morfológiája.....	9
4.2 A papillomavírusok rendszertana	9
4.3 A papillomavírusok klasszifikációja	9
4.4 A papillomavírus genomjának felépítése, a vírus által kódolt fehérjék jellemzése... 12	
4.4.1 E1 fehérje	14
4.4.2 E2 fehérje	14
4.4.3 E3 és E8 fehérje.....	15
4.4.4 E4 fehérje	16
4.4.5 E5 fehérje	16
4.4.6 E6 fehérje	17
4.4.7 E7 fehérje	19
4.5 LCR (long control region)	21
4.6 A HPV 31 LCR, E6 és E7 genomi régiók polimorfizmusa.....	23
5. CÉLKITŰZÉSEK	26
6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	27
6.1 Sejtvonalak és betegminták	27
6.2 DNS izolálás, HPV DNS kimutatás, tipizálás	27
6.3 HPV 31 LCR, E6 és E7 amplifikáció	27
6.4 Filogenetikai analízis.....	28
6.5 Plazmid konstrukciók.....	29
6.6 Tranziens transzfekció.....	33
6.7 Tranziens kotranszfekció.....	34
6.8 Stabil transzfekció	35
6.9 Fehérje izolálás	35
6.10 Western blot.....	36
6.11 Statisztika.....	36
7. EREDMÉNYEK	37

7.1	A HPV 31 LCR variánsok	37
7.1.1	A klinikai mintákból származó HPV 31 LCR variánsok szekvenciáinak vizsgálata.....	37
7.1.2	A HPV 31 LCR filogenetikai vizsgálata	38
7.1.3	A teljes hosszúságú LCR izolátumok transzkripció aktivitásának vizsgálata ..	41
7.1.4	Az LCR deléció mutánsok aktivitásának vizsgálata.....	42
7.2	A HPV 31 E6 és E7 variánsok.....	44
7.2.1	A klinikai mintákból származó HPV 31 E6 és E7 variánsok szekvenciáinak vizsgálata.....	44
7.2.2	A HPV 31 E6 és E7 régiók filogenetikai vizsgálata	45
7.2.3	A HPV 31 variánsok hatása a p53 transzkripció aktivitására.....	47
7.2.4	A HPV 31 E7 variánsok E2F aktivitásra gyakorolt hatása	48
7.2.5	A HPV 31 E6 és E7 variánsok hatása a celluláris tumorszuppresszor fehérjékre	49
8.	MEGBESZÉLÉS	53
9.	ÖSSZEFOGLALÁS	59
10.	IRODALOMJEGYZÉK	61
11.	TÁRGYSZAVAK.....	77
12.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	78
13.	FÜGGELÉK	79
13.1	A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár által hitelesített publikációs lista.	79

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A	alanin
AP-1	Activator-protein 1
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
BPV	szarvasmarha papillomavírus (bovine papillomavirus)
CBP	CREB (cAMP response element-binding protein) kötő fehérje
CIN	cervikális intraepiteliális neoplázia (cervical intraepithelial neoplasia)
CR	konzervált régió (conserved region)
CRPV	gyapotfarkú nyúl papillomavírus (cottontail rabbit papillomavirus)
DBD	DNS kötő domén (DNA binding domain)
DMEM medium)	Dulbecco-féle módosított Eagle tápfolyadék (Dulbecco's modified Eagle's medium)
E	glutamát
E. coli	Escherichia coli
EDTA	etiléndiamin-tetraacetát
EGF	epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor)
E2BS	E2 fehérje kötőhely (E2 binding site)
E6AP	E6-asszociált fehérje (E6-associated protein, E3 ubiquitin ligase)
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FGF-R2b	fibroblaszt növekedési faktor receptor 2b (fibroblast growth factor receptor 2b)
GAPDH	glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
GM-CSF	granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (granulocyte macrophage - colony stimulating factor)
H	hisztidin
hADA3	élesztő "alteration/deficiency in activation" fehérje humán homológ
HDAC	hiszton deacetiláz (histone deacetylase)
HPV	humán papillomavírus (human papillomavirus)
HR	magas kockázatú (high-risk)
HRP	torma peroxidáz (horseradish peroxidase)
hTERT	humán telomeráz reverz transzkriptáz (human telomerase reverse transcriptase)
IL	interleukin
IFN	interferon
IRF	interferon regulatórikus faktor (interferon regulatory factor)

K	lizin
KGF-R	keratinocita növekedési faktor receptor (keratinocyte growth factor receptor)
LB	Luria-Bertani
LCR	hosszú szabályzó régió (long control region)
LR	alacsony kockázatú (low-risk)
LSIL	alacsony fokú laphámsejtes intraepiteliális neoplázia (low-grade squamous intraepithelial lesions)
MAPK	mitogén-aktivált protein.kináz (mitogen-activated protein kinase)
mRNS	hírvivő (messenger) ribonukleinsav
NF1	nuclear factor-1
Oct-1	octamer binding transcription factor 1
ORF	nyitott olvasási keret (open reading frame)
PBS	foszfát puffer (phosphate buffered saline)
PBST	foszfát puffer Tween 20-szal kiegészítve (phosphate-buffered saline–Tween 20)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PDGFR	vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor (platelet-derived growth factor receptor)
PEF-1	Penta-EF-Hand Domain Containing 1
PEG	polietilén-glikol
pRb	retinoblasztóma fehérje (retinoblastoma protein)
R	arginin
RNáz	ribonukleáz
RT	reverz transzkripció (reverse transcription)
SDS	nátrium-dodecilszulfát (sodium dodecyl sulfate)
Sp1	specifitási fehérje 1 (specificity protein 1)
SV40	majomvírus 40 (simian virus 40)
T	treonin
TBP	TATA-kötő fehérje (TATA-binding protein)
TE	Tris-EDTA puffer
TEF-1	Transcriptional enhancer factor-1
TFIIB	transzkripciós faktor IIB (transcriptional factor IIB)
TFIID	transzkripciós faktor IID (transcriptional factor IID)
TLR	toll-loke receptor
TNFR	tumor nekrozis faktor receptor (tumor necrosis factor receptor)
TopBP1	DNS topoisomeráz kötő protein 1 (DNA-topoisomerase Binding Protein I)

U	egység (unit)
URR	upstream regulatory region=LCR/long control region
V	valin
Y	tirozin
YY1	Yin-yang 1 transzkripciós faktor (Yin-yang 1 transcriptional factor)

3. BEVEZETÉS

Napjainkban a humán papillomavírus (HPV) fertőzés az egyik leggyakoribb szexuális úton terjedő betegség világszerte. A magas rizikó-faktorú humán papillomavírusok (HPV 16, 18, 31, 33, 35 stb.) tehetők felelőssé a méhnyakrák, illetve más anogenitális rákos megbetegedések, valamint fej- és nyaki tumorok kialakításáért. A méhnyakrák a nők második leggyakoribb rákos megbetegedése, mely esetek döntő többségében a perzisztens HPV fertőzés bizonyult a legfontosabb etiológiai ágensnek (zur Hausen és mtsai 1994); Magyarországon is a vezető egészségügyi problémák közé tartozik.

A magas rizikó-faktorú papillomavírusok daganateltő hatásáért az E6 és E7 onkogének a felelősek, illetve közvetetten a két onkogén expresszióját irányító ún. fő szabályzó régió (long control region/LCR). A vírusgenomban az LCR olyan regulatórikus egységeket tartalmaz, amelyek számos virális és celluláris faktort képesek kötni, ezáltal az LCR szabályozza a vírus replikációját és a virális gének transzkripcióját. Az évek során több tanulmányban is leírták, hogy az LCR-ben bekövetkezett mutációk funkcionális különbségeket eredményeznek a replikációs rátában (Hubert, 2005), illetve az E6 promóter transzkripció aktivitásában (Kammer és mtsai, 2002; Park és mtsai, 1999). Ezen változások hátterében az állhat, hogy a nukleotid cserék érinthetnek virális és/vagy celluláris transzkripció faktor kötőhelyeket is, melyeknek ezáltal megváltozhat az affinitása az adott faktorról szemben. A HPV-ok E6 és E7 onkoproteinjei többek között a celluláris p53, ill. retinoblasztóma tumorsuppresszor fehérjével kölcsönhatva fontos szerepet játszanak a daganatos elváltozások indukálásában és fenntartásában, melyet szerteágazó molekuláris mechanizmusok útján valósítanak meg. E fehérjékben bekövetkező mutációk hatással lehetnek a fehérje szerkezetére, és ezáltal a funkciójára is. Azokat a nukleotid polimorfizmusokat, melyek összefüggésbe hozhatók a vírus megváltozott agresszivitásával, fontos megismerni az adott elváltozás kórlefolyása, prognózisa és kezelése szempontjából.

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

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1 *A papillomavírusok morfológiája*

A papillomavírusok (PV) a *Papillomaviridae* családba tartozó, kisméretű (~55nm), lipoprotein burokkal nem rendelkező, ikozahedrális szimmetriájú, duplaszálú, cirkuláris DNS vírusok, fehérjeköpenyük 72 kapszomerből épül fel (Zur Hausen, 1996). A körülbelül 8000 bázispár (bp) nagyságú genomiális DNS a gazdasejt hisztonjaival kromatinszerű struktúrát alkot. A kapszid két struktúrproteint is tartalmaz: az erősen konzervált major kapszid proteint (L1), melynek molekulatömege körülbelül 55 kDa és a vírus fehérjéinek 80%-át alkotja (Pfister és mtsai, 1984), illetve a kevésbé konzervatív minor kapszid proteint (L2), melynek a molekulatömege 70 kDa (Howley és mtsai, 1996). A különböző HPV típusok genomi struktúrája egységes képet mutat, a gének szerepe azonban nem teljesen azonos az egyes típusokban.

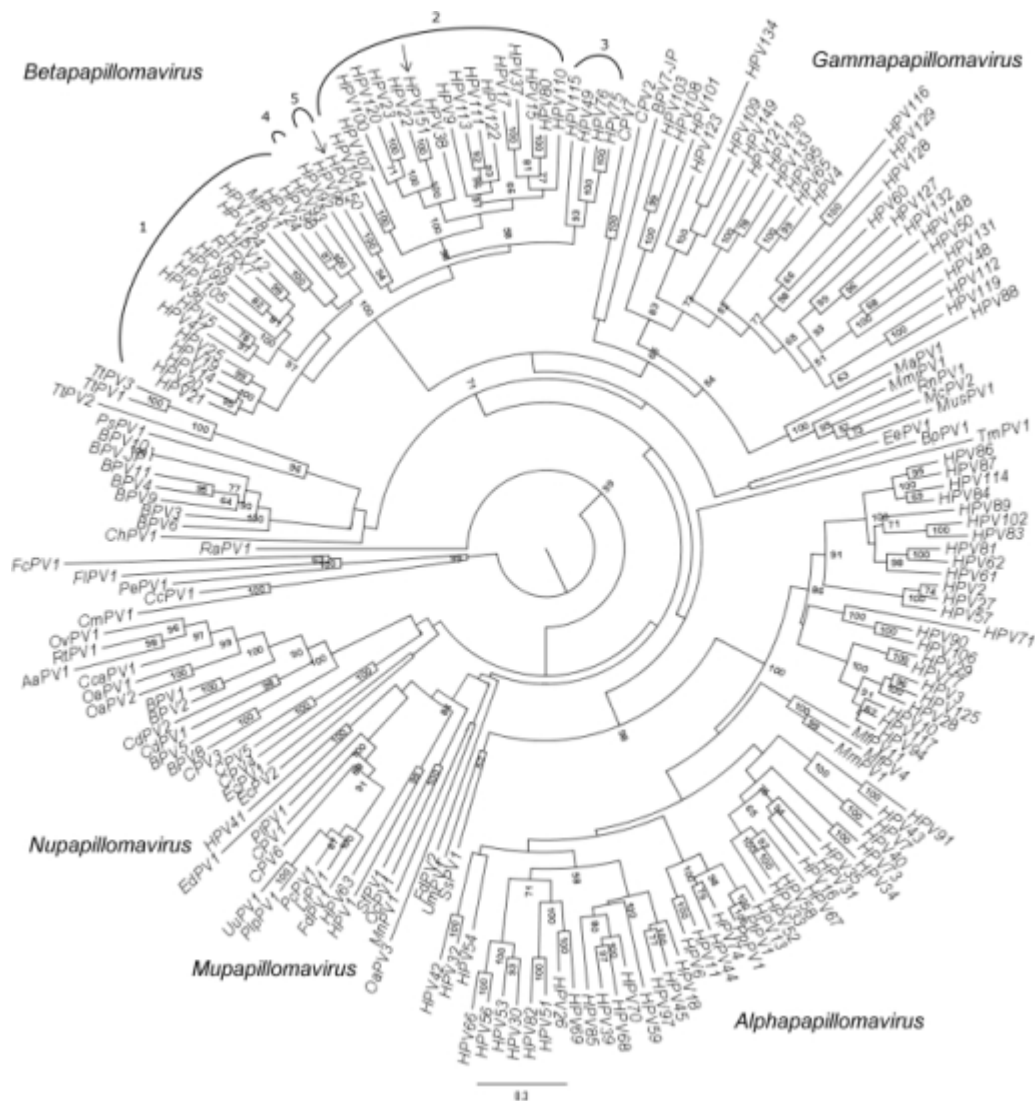
4.2 *A papillomavírusok rendszertana*

A papillomavírusokat korábban a hasonló, burok nélküli kapszidjuk, a kisméretű, duplaszálú, cirkuláris DNS genomjuk, valamint a nukleuszban történő replikációjuk miatt a polyomavírusokkal és a simian vacuolating virussal (majmok vakuolizáló vírusa) sorolták közös egységbe, így alkotva a *Papovaviridae* családot. A legújabb tanulmányok szerint azonban a két víruscsoport nem vonható össze az eltérő genetikai és stuktúrális tulajdonságaik miatt (különböző genom méret és struktúra, eltérő kapszid átmérő, ORF-ek száma). Ennek eredményeként a papillomavírusokat és a polyomavírusokat a Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság (International Committee on the Taxonomy of Viruses/ICTV) két önálló, a *Papillomaviridae* és a *Polyomaviridae* családokba sorolta (de Villers és mtsai, 2004).

4.3 *A papillomavírusok klasszifikációja*

A humán papillomavírusok csoportosítása az evolúciósan erősen konzervált L1 strukturális proteint kódoló ORF alapján történik, melyet 1995-ben a Papillomavirus Workshop (Quebec) hagyott jóvá. Akkor beszélhetünk egy új HPV típusról, ha annak a genomját sikeresen klónozták, illetve ha a legközelebbi rokonságban lévő papillomavírus genomtól legalább 10 %-ban eltér az L1 szekvenciája. Szubtípusról beszélhetünk akkor, ha az L1 ORF szekvencia különbség 2-10%, míg eltérő variánst akkor különböztetünk meg, ha az L1 szekvencia eltérés kevesebb, mint 2 %, illetve a nem-kódoló LCR szekvencia különbség nagyobb, mint 5 % (de Villers és mtsai, 2004; Ho és mtsai, 1993).

A papillomavírusokat 16 genusba lehet sorolni, melyekből öt humán papillomavírus genust különböztetünk meg, ezek az Alpha-, Beta-, Gamma-, Mu- és Nu-papillomavírus genusok (Bernard és mtsai, 2010; de Villers és mtsai, 2004). A napjainkig azonosított humán papillomavírusok csaknem 90 %-a az Alpha-, Beta- és Gamma- papillomavírus genusokba tartozik, míg a többi genusba (Delta-, Epsilon-, Zeta-, Eta-, Theta-, Iota-, Kappa-, Lambda-, Xi-, Omikron-, és Pi-papillomavirus genus) állati patogén papillomavírusok sorolhatók. A humán papillomavírusok klasszifikációját az **1. ábra** és az **1. táblázat** mutatja be.



1. ábra: A humán papillomavírusok konszenzus filogenetikai törzsfája, mely az L1 konzervatív régió szekvenciái alapján készült (Kovanda és mtsai, 2011).

<i>Genus</i>	<i>Species</i>	<i>Típus species</i>	<i>Egyéb típusok</i>	<i>Megjegyzés</i>
Alpha-papillomavírus	1	HPV 32	HPV 42	Benignus léziók az orális vagy genitális nyálkahártyán. Alacsony kockázat.
	2	HPV 10	HPV 3, 28, 29	Kután léziók, alacsony kockázat.
	3	HPV 61	HPV 72, 81, 83	Nyálkahártya léziók, alacsony kockázat.
	4	HPV 2	HPV 27, 57	Szemölcsök a bőrön, gyermekek genitális léziója.
	5	HPV 26	HPV 51, 69, 82	Magas kockázat, mukozális léziók.
	6	HPV 53	HPV 30, 56, 66,	Magas kockázat, mukozális léziók.
	7	HPV 18	HPV 39, 45, 59, 68, 70	Magas kockázat, mukozális léziók.
	8	HPV 7	HPV 40, 43	Alacsony kockázat, kután és mukozális léziók.
	9	HPV 16	HPV 31, 33, 35, 52, 58, 67	Magas kockázat, mukozális léziók.
	10	HPV 6	HPV 11, 13, 44, 74	Alacsony kockázat, benignus mukozális léziók.
Beta-papillomavírus	1	HPV 5	HPV 8, 12, 14, 19, 20, 21, 25	Leginkább kután léziók, epidermodysplasia verruciformis.
	2	HPV 9	HPV 15, 17, 22, 23, 37, 38, 80	Leginkább kután léziók, epidermodysplasia verruciformis.
	3	HPV 49	HPV 75, 76	Benignus kután léziók.
Gamma-papillomavírus	1	HPV 4	HPV 65, 95	Kután léziók.
	2	HPV 48	-	Kután léziók.
	3	HPV 50	-	Kután léziók.
	4	HPV 60	-	Kután léziók.
Mu-papillomavírus	1	HPV 1	-	Verruca plantaris.
	2	HPV 63	-	Verruca plantaris.
Nu-papillomavírus	1	HPV 41	-	Szemölcsök.

1. táblázat A humán papillomavírus genusok bemutatása de Villers és mtsai (2004) alapján.

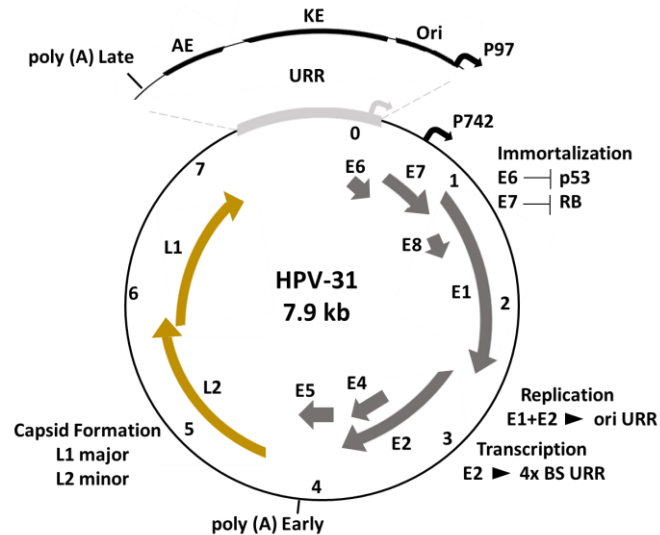
A papillomavírusok a természetben általánosan megtalálhatóak, napjainkra számos magasabb rendű gerincesben, illetve több madárfajban is kimutatták ezeket a vírusokat a teljes genomjuk izolálásával (Pfister et al. 1994). Gazdaszervezet szempontjából szigorú fajspecifitás jellemzi a papillomavírusokat, melyet a vírusok elnevezése is sugall, mint például a CRPV (cottontail rabbit/gyapotfarkú nyúl papillomavírus), BPV

(bovine/szarvasmarha papillomavirus), illetve a HPV (humán papillomavirus). Mindezek mellett a papillomavírusok kifejezett sejttropizmussal bírnak, a bőr vagy a nyálkahártya többrétegű elszarusodó, illetve el nem szarusodó laphám sejtjeit fertőzik (Howley és Lowy, 2001).

Mintegy 200 HPV típust írtak le napjainkig, melyeknek körülbelül az egyharmada az anogenitális traktust fertőzi (de Villers és mtsai, 2004; Bernard és mtsai, 2010), de megtalálhatóak a száj-, a légutak és az emésztőtraktus nyálkahártyáján kialakuló tumorokban is. A mukokutan vagy nyálkahártya-asszociált HPV típusok a mukozális el nem szarusodó laphám sejteket fertőzik, ilyenek például a HPV 6, 16, 18, 31, 33 stb., míg a kután papillomavírusok (HPV 48, 50, 65, 75 stb.) az elszarusodó laphám sejteket. Onkogén potenciáljuk szempontjából a mukokután papillomavírusok esetén megkülönböztetünk alacsony kockázatú (low risk/LR) - például HPV 6, 11, 44, 55, 74 - és magas kockázatú (high risk/HR) papillomavírusokat, mint például a HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45. Az alacsony kockázatú HPV-k főleg benignus elváltozásokból mutathatók ki, mint a condyloma acuminatum, genitális papillomák, légzőszervi, szájüregi és conjunctiva infekciók, míg a magas kockázatú HPV típusok gyakran okoznak invazív rákos elváltozásokat, mint például a méhnyakrák és az anális karcinóma (Bosh és mtsai, 2002; Munoz és mtsai, 2003).

4.4 A papillomavirus genomjának felépítése, a vírus által kódolt fehérjék jellemzése

A teljes genom kb. 8000 bp nagyságú, mely három részre tagolódik: a 4,5 kb nagyságú korai gének (E1, E2, E4, E5, E6 és E7) régiójára, a 3 kb nagyságú késői gének (L1 és L2) régiójára, valamint e két szakasz között található az LCR (long control region), mely 500-1000 bp-ból áll (Gloss et al. 1987). A HPV 31 típus genomjának felépítését a **2. ábra** mutatja be.



2. ábra: A HPV 31 genom szerveződése.

URR: upstream regulatory region= LCR: long control region/ hosszú szabályzó régió, AE: auxiliary enhancer domén, KE: keratinocyte enhancer domén, Ori: replikációs origó, p97 promóter, p742 promóter, E1-E8 fehérjék, L1 és L2 kapszid fehérjék.

<http://labs.feinberg.northwestern.edu/laimins/research/index.html> forrás alapján.

A korai régióban kódolt fehérjék szabályzó funkcióval bírnak, mint például a virális genom replikációjának és transzkripciójának a felügyelete, a sejtciklus és apoptózis befolyásolása, a fertőzött sejtek strukturális módosítása, valamint az immunmoduláció. A késői régió géntermékei L1 és L2 strukturális proteinek, melyek specifikusan az epitélium granuláris rétegében expresszálódnak. E két fehérje alkotja a vírus kapszidját, ezáltal szerepük van a vírus terjedésében, transzmissziójában, illetve a környezetben való túlélésében (Graham, 2010). A három régiót minden papillomavírusban két poliadenilációs hely (pA), a korai pA (A_E) és a késői pA (A_L) helyek választják el. A HPV-knek két fő promóterük van. A korai promóter (p97 a HPV 16 esetében) - mely az E6 ORF előtt helyezkedik el - szabályozza az E6 és E7, illetve egyéb virális gén transzkripcióját, míg az E7 ORF előtt lokalizálódó késői promóter (p670) a keratinocita gazdasejtek differenciációja során aktiválódik és a késői géntermékek, az L1 és L2 fehérjék expresszálódását eredményezi. A HPV 16 és 31 vizsgálata során számos promótert azonosítottak, melyek transzkripció kezdőpontjai a 200-700 nukleotidok között helyezkednek el, és főként a késői génexpresszióban vesznek részt (Rosenstierne és mtsai, 2003; Mar Pena és mtsai, 2001). A HPV 31b esetében négy promótert írtak le Ozbun és mtsai 1998-ban, melyek közül a p99 fő korai promóter valamint a p77 és p3320 konstitutívan expresszálódnak a teljes virális életsiklus során, míg a p742 promóter az epiteliális differenciáció során aktiválódik és a késői gének transzkripcióját iniciálja. A HPV

31 p99 promótere megfelel a HPV 16 p97 promóterének, míg a HPV 31 p742 promótere hasonló aktivitással bír, mint a HPV 16 p670 promóter (Hummel és mtsai, 1992; Ozbun és mtsai, 1997).

A cirkuláris papillomavírus genom transzkripciója több promóter régióról, egy DNS szálról történik, mely során több ORF-et tartalmazó policisztronos pre-mRNS-ek képződnek, melyek alternatív splicing és poliadeniláció útján alakulnak tovább. Milligan és mtsai 2007-ben leírták, hogy a pre-mRNS-ek teljes érési folyamata differenciálódott gazdasejtben tud végbemenni.

4.4.1 E1 fehérje

Az E1 gén terméke egy 65 kDa méretű ATP-dependens DNS helikáz, a papillomavírusok által kódolt egyetlen enzim. Az E1 fehérje erősen konzerválódott a HPV típusok között, mely tükrözi esszenciális szerepét a virális életciklusban. Az E1 fehérje három funkcionális régióból áll: az N-terminális regulatórikus régió, mely nélkülözhetetlen az optimális *in vivo* replikációhoz (Sun és mtsai, 1998; Morin és mtsai, 2011); a centrális DNS kötő domén (DNA binding domain/DBD), mely a replikációs origó specifikus szekvenciáját ismeri fel (Sarafi és McBride, 1995; Chen és Stenlund, 1998); a C-terminális helikáz domén, mely enzimatis aktivitással bír (Enemark és Joshua-Tor, 2006; White és mtsai, 2001). Az E1 klasszikus iniciátor protein, mely funkciójára utal a struktúrája is, mely nagyon hasonló más DNS vírusok iniciátor fehérjéihez, mint például a simian virus 40 (SV40) illetve más polyomavirusok large T-antigénje (LT-Ag) (Clertant és Seif, 1984). A vírus replikációs ciklusában a virális epizómák kópiaszámát emeli és szinten tartja a bazális keratinocitákban, majd a produktív ciklusban irányítja a vírusgenom amplifikációját. Az E1 fehérje az LCR-ben található replikációs origót felismerve és ahhoz bekötődve az E2 fehérjével egy helikáz komplexet alkotva iniciálja a DNS szintézist (Ustav és mtsai, 1991; Thorner és mtsai, 1993). Az E2 fehérje mellett számos, a celluláris DNS replikációban szerepet játszó faktorról is képes kölcsönhatásba lépni, ilyenek például DNS polimeráz α -primáz (Pol α -prim) komplex, és a topoizomeráz I (Topo I).

4.4.2 E2 fehérje

Az E2 fehérje két régióra tagolódik, N-terminálisan egy konzervatív hozzávetőlegesen 200 aminosavból álló transz-aktiváló domén, C-terminálisan egy körülbelül 100 aminosavból álló, a szekvencia specifikus DNS kötéséhez és az E2 homodimerizációhoz szükséges domén, melyeket egy flexibilis kapcsoló szekvencia, a „hinge” köt össze, ennek hossza a különböző

papillomavírus genusokban eltérhet (Giri és Yaniv, 1988). Az E2 fehérje a papillomavírusok legfontosabb transzkripció modulátora (Spalholz, 1985; Chin és mtsai, 1988; Choe és mtsai, 1989). Az E2 egy szekvencia specifikus DNS kötő fehérje, mely az LCR-ben található, 12 bázispárból (ACCGN₄CGGT vagy ACCN₆GGT) álló kötőhelyekhez (E2 binding site/E2BS) képes kötődni és indukálni vagy represszálni a virális transzkripciót az E2 kötőhely környezetétől és az asszociálódott celluláris faktorok természetétől függően. Sok esetben az E2 dózistól függően aktiválódik vagy represszálnodik a transzkripció; alacsony koncentrációban emeli az E6 és E7 gének expresszióját, míg magas koncentrációban represszorként hat (Thierry és Yaniv, 1987; Bouvard és mtsai, 1994; Fujii és mtsai, 2001). Az E2 az E1 fehérjével helikáz komplexet alkotva - fokozva és támogatva az E1 működését - részt vesz a virális replikáció inicializálásában (Mohr és mtsai, 1990; Sanders és Stenlund, 2000; Frattini és Laimins, 1994). Az alfa-papillomavírusok esetén 4 konszenzus E2 kötőhelyet írtak le, melyek az LCR-re lokalizálódnak. Ezek közül az első két E2BS (E2 binding site/E2 kötőhely) a korai promóter régióban, a harmadik E2 kötőhely a replikációs origó előtt (itt található E1 kötőhely is), míg a negyedik E2BS 300-400 nukleotiddal feljebb, az LCR közepén foglal helyet. A különböző E2BS-ek eltérő affinitással képesek kötni az E2 fehérjét. Az E2 kötőhelyek többsége tartalmaz legalább egy CpG dinukleotidot, melyek metilálódásával az E2BS károsodik, így az E2 transzkripció regulátor funkciója is sérül (Thain és mtsai, 1996; Kim és mtsai, 2003). Az E2 képes kölcsönhatásba lépni számos virális és celluláris proteinnel. A virális proteinek közül az L2 minor kapszid proteinnel kölcsönhatva részt vesz a vírusgenom becsomagolásában (Day és mtsai, 1998). Grm és munkatársai 2005-ben leírták, hogy a HPV 16 és 18 E6 fehérjéje az E2 C-terminális doménjével közvetlenül kölcsönhatva megváltoztatja mind az E2, mind az E6 szubcelluláris lokalizációját. A celluláris transzkripció faktorok közül képes kölcsönhatni többek között a Transcription Factor IID /TFIID-vel és a Transcription Factor Binding Protein/TBP-vel (Rank és mtsai, 1995; Carillo és mtsai, 2004), a Transcription Factor IIB/TFIIB-vel (Rank és mtsai, 1995; Benson és mtsai, 1997), a DNA-topoisomerase Binding Protein I/TopBP1-gyel (Boner és mtsai, 2002). Összefoglalva tehát elmondható, hogy az E2 egy multifunkcionális fehérje, mely virális és celluláris proteinnel kölcsönhatva képes transzkripció transzaktivátorként vagy represszorként működni.

4.4.3 E3 és E8 fehérje

Az E3 és E8 gének a korai régióban lokalizálódnak és csak néhány papillomavírus típusnál találhatóak meg (HPV 1, 11, 16, 31, 33), termékük az E8^{E2C} fúziós protein, mely a

virális replikáció és transzkripció negatív regulátoraként funkcionál valószínűleg a vírus kópiaszám szabályozása, illetve a vírus episzómális formájának stabil fenntartása által (Alp Avci, 2012).

4.4.4 E4 fehérje

Az E4 ORF-et a korai vírus gének közé sorolják (Danos és mtsai, 1982; Chen és mtsai, 1982), ugyanis a vírusgenom korai régiójában lokalizálódik azon gének között, melyek a sejtciklust szabályozzák. Ennek ellenére az E4 a vírus szaporodási ciklusának a kései fázisában expresszálódik, nagyjából egy időben a vírusgenom sokszorozódásának iniciálásával. A virális életciklus korai szakaszában az E4 fehérjének még nem írták le bizonyított funkcióját. Az aktív virális infekcióban biomarkerként szolgál az E4, ugyanis nagy mennyiségben akumulálódik a léziók középső és felső epiteliális rétegeiben a produktív fertőzés során (Doorbar és mtsai, 1997, Peh és mtsai, 2002; Maglennon és mtsai, 2011). Az E4 fehérje a gazdasejt citokeratin hálózatához kötődik, mely annak összeomlásához vezet, ezzel segítve a vírus sejtmagból történő kiszabadulását, tehát igen fontos a produktív infekcióban (Doorbar és mtsai, 1991). Davy és Doorbar 2007-es tanulmánya szerint az E4 egyes HPV típusoknál gátolja a sejtproliferációt, illetve részt vesz a hatékony genom amplifikációban és ennek következményeként a vírus szintézisben is (Nakahara és mtsai, 2005; Wilson és mtsai, 2005; Peh és mtsai, 2004). Az E4 fehérje a genom amplifikációjában feltételezhetően kinázokkal és az E2 virális fehérjével történő kölcsönhatás révén vesz részt.

4.4.5 E5 fehérje

A HPV-ok E5 fehérjéje egy kisméretű, 83 aminosavból álló fehérje, melyet a magas hidrofobitása, alacsony expressziós szintje és a membrán-lokalizációja miatt igen nehéz detektálni. Az öt HPV genusból csak néhány kódolja, például az alfa-HPV-ok kódolják és expresszálják is az E5 fehérjét, míg a béta-papillomavírusok nem (Bernard és mtsai, 2010). Magát az E5 ORF-et négy különböző csoportba lehet sorolni: alfa, béta, delta és gamma (Bravo és mtsai, 2004), melyek eltérő onkogén potenciállal és klinikai manifesztációval jellemezhetőek (Schiffman és mtsai, 2005). A HPV E5 ORF a vírus szaporodási ciklusának a korai szakaszában expresszálódik. Az E5 in vitro gyenge transzformáló hatással bír, hatását leginkább más virális onkoproteinekkal kooperálva fejtí ki, például az E6 fehérjével kölcsönhatva elősegíti a koilocyta képződést, mely a HPV infekció jól ismert morfológiai markere (Krawczyk és mtsai, 2008). A magas kockázatú HPV-ok E5 fehérjéje képes önmagában azokat a morfológiai és kromoszómális változásokat indukálni, melyek a normál

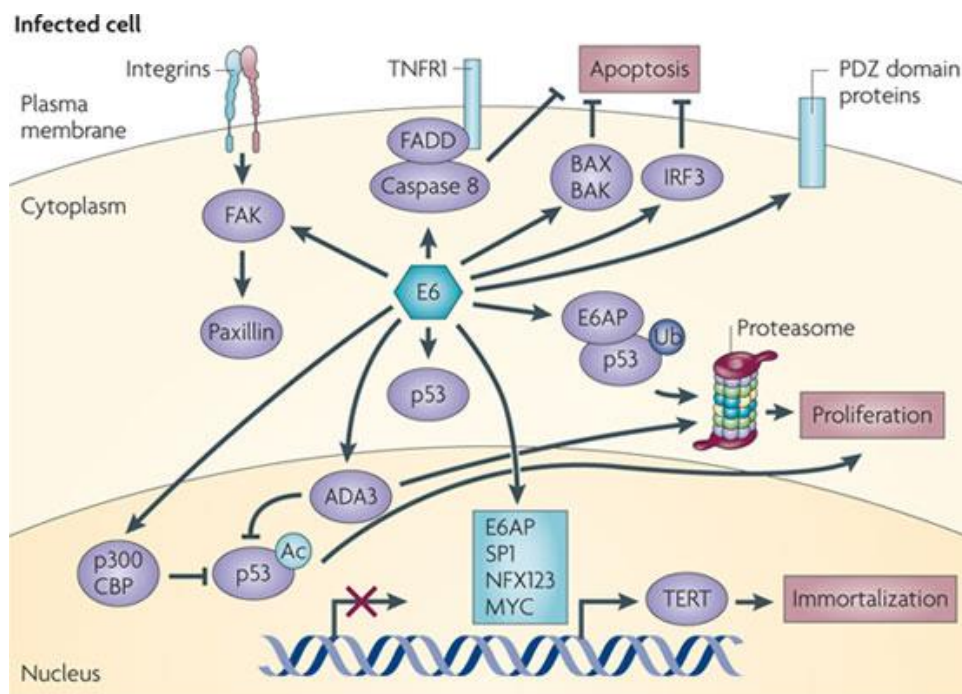
sejt tumoros sejté történő progresszióját kísérik, ilyen például a poliploidia és a binukleáris sejtek képződése (Mittal és mtsai, 1990; Prasad és mtsai, 1993). Az E5 két ellentétes hatással bír a vírus replikációjára nézve, az egyik, hogy képes indukálni az EGF-R szignalizációs útvonalat mind az EGF-dependens és -independens módon. Humán keratinocitákban képes aktiválni a mitogen-activated protein kinase (MAPK) faktorokat (Crusius és mtsai, 1997; Gu és mtsai, 1995), melyek a c-fos és c-jun transzkripciójának fokozásával (Chen és mtsai, 1996) stimulálják a sejtciklust és indukálják az E6/7 onkogének transzkripcióját. Ezzel ellentétben képes alul-szabályozni a KGF-R (keratinocyte growth factor receptor) és FGF-R2b (fibroblast growth factor receptor 2b) expresszióját és szignalizációját, ezzel csökkentve a szuprabazális keratinociták differenciációját, proliferációját (Belleudi és mtsai, 2011). A malignus elváltozás során történő virális genom integráció után az E5 gén nem expresszálódik a cervikális tumorokban, viszont az LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesions) elváltozásokban mind az E5 mRNS, mind az E7 fehérje detektálható (Stoler és mtsai, 1993; Kell és mtsai, 1994), ezzel feltételezve, hogy az E5 a HPV infekció korai szakaszában szerepet játszik a fertőzött sejt apoptózisának megakadályozásában.

4.4.6 E6 fehérje

Az E6 egy körülbelül 150 aminosavból álló fehérje, melynek ORF-je közvetlenül az LCR folytatásában található a virális genomban. A fehérje két CX₂C-X₂₉-CX₂C cink-ujj domént tartalmaz, melyeket egy 36 aminosavból álló linker domén kapcsol össze. Az E6-tal kölcsönható fehérjék közül az E6 associated protein (E6AP), egy E3 ubiquitin ligáz volt az első, melyet azonosítottak (Huibregste és mtsai, 1991; Scheffner és mtsai, 1993). Az E6AP komplexet alkotva az E6-tal, képes megkötni más fehérjéket, mely kapcsolat a target fehérje ubiquitinálódásához és következményes proteasóma mediált degradációjához vezet (Scheffner és mtsai, 1993). Az E6AP fehérje E6 kötő motívuma az LXXLL (Chen és mtsai, 1998; Elston és mtsai, 1998), pontosabban ELQELLGE. Az LXXLL motívumon keresztüli kötődés számos papillomavírus esetében az E6 fehérje konzerválódott tulajdonsága, míg az E6AP képes kötödni az alpha-papillomavírusok HR és LR genusához, néhány béta-HPV genushoz, illetve a BPV1-hez is (Chen és mtsai, 1998; Kubbala és mtsai, 2007). Az E6 talán legjobban tanulmányozott target fehérjéje a p53 tumorszupresszor, mely a sejtet ért stresszhatások során aktiválódó szignalizációs mechanizmusokban játszik fontos szerepet (Murray-Zmijewski, 2008), mint például az apoptózis vagy a DNS javítás. A magas kockázatú HPV típusok E6 fehérjéje az E6AP-vel képes trimolekuláris komplexbe kötni a p53 proapoptotikus fehérjét, melynek következménye a p53 degradációja az ubiquitin-

proteaszóma útvonalon keresztül (Scheffner és mtsai, 1990; Huibregste és mtsai, 1991; Scheffner és mtsai, 1993; Huibregste és mtsai, 1993a). Az E6AP N-terminális doménjéhez először az E6 fehérje kötődik, majd ezt követően képes komplexbe vinni a p53 tumorszupresszort; az E6AP önmagában nem képes kötni a p53 fehérjét (Huibregste és mtsai, 1993a; Huibregste és mtsai, 1993b). Mind az alacsony, mind a magas kockázatú papillomavírusok E6 proteinje képes kölcsönhatni a p53 C-terminális régiójával, de csak a magas kockázatú HPV-k E6 fehérjéje tud kötődni a p53 'core' régiójához, melynek következménye a p53 degradációja (Crook és mtsai, 1991; Li és Coffino, 1996). Lechner és Laimins 1994-ben leírták, hogy a különböző HPV típusok E6 proteinjei eltérő affinitással képesek gátolni a p53 kötődését a DNS-ben található célszekvenciájához, ennek megfelelően a HPV 16 E6 rendelkezik a legerősebb inhibíciós hatással, míg a HPV 18 E6 és a HPV 31 E6 gátló hatása mérsékeltebb. Ezek a gátló hatások korrelálnak az E6 típusok p53 transzaktivációját gátló hatásával, mely mechanizmus független a p53 E6-E6AP-indukált degradációjától. Mantovani és Banks 2001-ben leírtak egy szintén p53 degradációtól független mechanizmust, mellyel az E6 gátolja a p53 szignalizációt, ez pedig a p53 citoplazmába történő visszavonásán alapul, mely valószínűleg a p53 C-terminálisán található NLS (nuclear localization signal) maszkírozásával, vagy pedig a p53 nukleáris transzportjának a fokozásával valósul meg. Az E6 képes gátolni a p53 aktivitást azáltal is, hogy kölcsönhatva a CBP/p300 vagy hADA3 (histone acetyltransferases) fehérjékkel gátolja a p53 célgének transzaktivációját (Patel és mtsai, 1999; Zimmermann és mtsai, 2000; Kumar és mtsai, 2002). A magas kockázatú E6 esetében leírták, hogy kölcsönhat két olyan fehérjével, melyek a virális fertőzéskor aktiválódott veleszületett immunválasz részei: az egyik az IFR-3 (interferon regulatory factor-3), amellyel történő interakció megakadályozza a virális infekciót követő IFN- β (interferon- β) transzkripciót; a másik fehérje a TLR9 (toll-like receptor 9), melyet kiiktatva az E6 megakadályozza a fertőzéskor bekövetkező citokin-aktivációt (Ronco és mtsai, 1998; Hasan és mtsai, 2007). Az E6 megakadályozza a fertőzött sejtek apoptózisát a p53 degradációjával vagy funkciójának gátlásával, illetve korábbi tanulmányok leírták, hogy az E6 képes blokkolni az apoptózist a p53 hiányában is (Steller és mtsai, 1996; Pan és Griep, 1995). Az E6 gátolja az extrinsic apoptotikus szignalizációt kölcsönhatva különböző 'death' receptorokkal és adapter molekuláikkal, mint például a TNFR-1 (tumor necrosis factor receptor), a FADD és caspase 8. Mind a HR, mind az LR HPV-k E6 onkoproteinje képes blokkolni az intrinsic apoptotikus szignalizációt is a Bak fehérjét megkötve és annak degradációját indukálva (Thomas és Banks, 1998; Thomas és Banks, 1999; Jackson és mtsai, 2000). Klingelhutz és munkatársai 1996-ban leírták, hogy a

magas kockázatú HPV-ok E6 fehérjéje aktiválja a telomeráz aktivitást az epiteliális sejtekben, mely eredményeként a sejtek immortalizálódnak. Az aktivációhoz szükséges az E6AP fehérje jelenléte is (Gewin és mtsai, 2004). A fertőzött sejtek kromoszomális stabilitásának fenntartásában szerepet játszó fehérjékkal is kölcsönhat az E6 fehérje, ilyen például a hMCM7 (human minichromosome maintenance 7). A HPV 18 E6 indukálja az MCM7 proteasomális degradációját az E6AP fehérje közreműködésével (Kuhne és Banks, 1998). Összefoglalva, az E6 onkoprotein a szerkeázó funkciójával (p53 inaktiváció, apoptózis gátlás, telomeráz aktiválás, transzkripciós szabályozások) hozzájárul a fertőzött sejtek rákos elváltozásának a beindításához és fenntartásához. Az E6 fehérje celluláris fehérjékre gyakorolt hatásait a **3. ábra** mutatja be.



Nature Reviews | Cancer

3. ábra: A HPV E6 onkoprotein kölcsönhatásai a celluláris fehérjékkel (forrás:

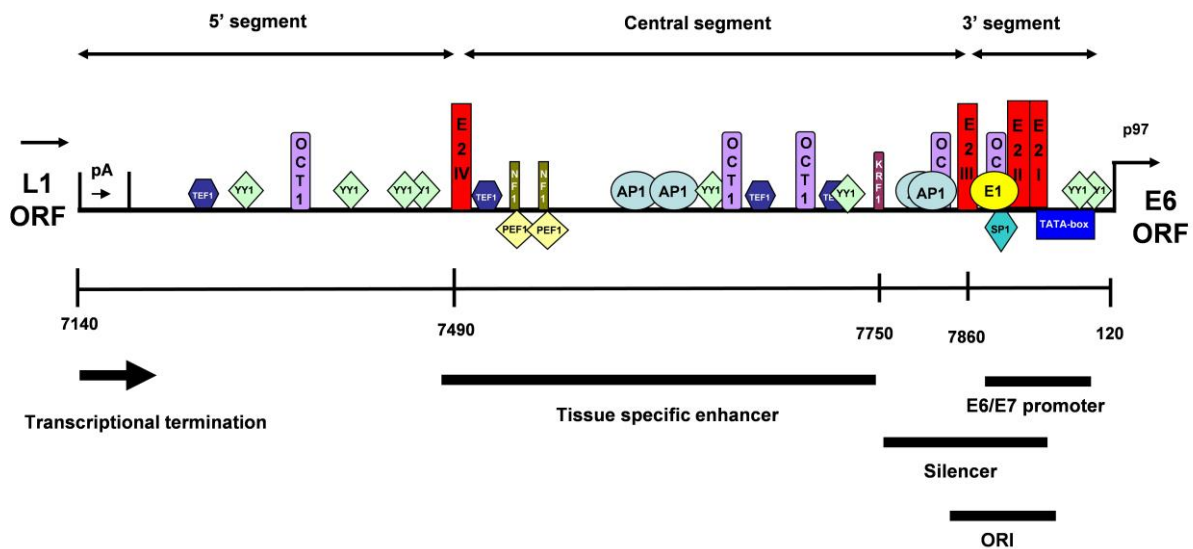
http://www.nature.com/nrc/journal/v10/n8/fig_tab/nrc2886_F4.html)

4.4.7 E7 fehérje

A papillomavírusok E7 fehérjéje egy körülbelül 100 aminosavból álló foszfoprotein. A fehérje N-terminális régiója két doménra tagolódik, ezek a CR1 és a CR2 (conserved region) (Phelps és mtsai, 1988), melyek jól konzerválódtak a különböző HPV típusok között. A C-terminális régió cinkkötő helyet tartalmaz, mely két CXXC motívomot is magában foglal (Barbosa és mtsai, 1989; McIntre és mtsai, 1993). A papillomavírusok CR1 és CR2

doménjeinek szekvenciája nagyfokú homológiát mutat az adenovírus E1A fehérjéjével, melyből kifolyólag funkcionális hasonlóságok is megfigyelhetők (Matlashewski és mtsai, 1987; Phelps és mtsai, 1988). Mivel a papillomavírusok nem kódolnak a replikációjukhoz szükséges DNS polimeráz enzimet, így kénytelenek a gazdasejt enzimszisztémáját illetve transzkripciós útjait használni, melyet az általuk kódolt fehérjék, leginkább az E6 és E7 proteineken keresztül valósítanak meg. Az E7 és az E6 fehérjék fokozott aktivitása viszont a fertőzött sejtek malignus elváltozásaihoz vezethet, melyet e két onkoprotein számos mechanizmus útján valósíthat meg, többek között az apoptózis gátlásával, a sejtciklus beindításával, kontrollálatlan sejtproliferációval, a fertőzött sejtek immortalizációjával. Az E7 onkoprotein egy igen fontos funkciója, hogy képes az E2F-pRb represszor komplexben lévő retinoblasztoma (Rb) fehérjét kötni és degradációját indukálni (Frolov és mtsai, 2004; Munger és mtsai, 1989). E represszor komplex, melyet az Rb, E2F és a járulékos 'pocket p107 és p130' fehérjék alkotnak, a sejtek G1 fázisból S fázisba történő átlépését gátolja a sejtciklus során. Az E7 retinoblasztoma kötésének eredményeképpen szabaddá válik az E2F transzkripciós faktor, melynek hatására a sejtek átlépnek az S fázisba. Az E7 fehérje indukálja a pRb ubiquitin-proteaszóma útvonalon keresztül történő degradációját (Boyer és mtsai, 1996). Dyson és munkatársai 1989-ben kimutatták, hogy a HPV 16 E7 onkoprotein a CR2 domén konzervatív LXCXE motívumán keresztül képes asszociálódni a pRb-vel. Az E7 fehérje hatással van a mitotikus folyamatokra is, a magas kockázatú HPV E7 aberráns centroszóma duplikációt illetve multipoláris mitózist okoz (Duensing és mtsai, 2000; Duensing és Munger, 2003). Hatással van a sejtek differenciálódási folyamataira: Muller és munkatársai 1999-ben leírták, hogy az E7 fokozza a C/EBP α -mediált differenciációt. Az E7 szerepet játszik a citokinek modulációjában is, például gátolja az IFN- α -sejtválaszt (Barnard és mtsai, 2000), gátolja az IRF-1 mediált transzaktivációt (Park és mtsai, 2000), emeli a VEGF és IL-8 expressziót (Walker és mtsai, 2011). Az E7 transzkripciósan szabályozza számos gén promóterét, például transzaktiválja az adenovírus E2 (AdE2) promótert (Edmonds és Vousden, 1989; Phelps és mtsai, 1992), aktiválja a c-fos promótert, stimulálja az MPP2 (M phase phosphoprotein 2)-mediált transzkripciót (Luscher-Firzlaff és mtsai, 1999), represszálja az MHC I promótert (Li és mtsai, 2009). Összefoglalva, az E7 fontos szerepet játszik a papillomavírusok életciklusában, mint transzformáló protein, számos mechanizmus útján (sejtproliferáció stimulálás, differenciálódási folyamatok késleltetése, sejtciklus bekapcsolása stb.) a celluláris környezet átprogramozásával elősegíti a virális replikációt és hozzájárul a papillomavírusok által indukált karcinogenezis folyamatához. Az E7 fehérje kölcsönhatásait a celluláris fehérjékkel a **4. ábra** mutatja be.

negatív szabályzó elemeket tartalmaz (Furth és Baker, 1991; Kennedy és mtsai, 1991). Az LCR centrális szegmense egy körülbelül 400 bázispáros szakasz, mely a IV. és a III. E2 kötőhelyek között foglal helyet, mely egy epitélium specifikus transzkripciós enhancerként funkcionál (Chin és mtsai, 1989; Cid és mtsai, 1993; Cripe és mtsai, 1987; Gloss és mtsai, 1987), és ez a szövet specifikus enhancer felelős a HPV-okra jellemző epitél sejttropizmusért (Roden és mtsai, 1994; Müller és mtsai, 1995). A centrális szegmensben található III. E2 kötőhely a replikáció inicializálásában, illetve az E6 és E7 gének transzkripciós szabályozásában vesz részt (Chiang és mtsai, 1992; Russel és Botchan, 1995; Sverdrup és Khan, 1995; Romanczuk és mtsai, 1990). Az LCR 3' szegmense hozzávetőlegesen 140 bp hosszúságú szakasz, melyet a III. E2 kötőhely és az E6 gén határol. Ez a szegmens hordozza az E1 kötőhelyet, mely a replikációs origót határozza meg. Az LCR ezen szakasza két E2 kötőhelyet (I. és II.), egy SP1 transzkripciós faktor kötőhelyet és egy TATA boxot tartalmaz, melyek együttesen szabályozzák az E6/E7 promóter aktivitását. Az LCR számos celluláris transzkripciós faktor kötőhelyet – AP1, cEBP, NF1, Oct-1, PEF-1, TEF-1, TEF-2, YY1, glukokortikoid receptor, progeszteron receptor – (Chan és mtsai, 1989; 1990; Chong és mtsai, 1990; 1991; Cuthill és mtsai, 1993; Garcia-Carranca és mtsai, 1988; Ishiji és mtsai, 1992; Kyo és mtsai, 1993; O'Connor és Bernard, 1995) és virális fehérje (E2 és E1) kötőhelyet tartalmaz több ismétlődésben. Ezen kötőhelyek döntő többsége a centrális és a 3' szegmensre lokalizálódnak. Az egyes transzkripciós faktorok hatása eltérő, vannak melyek simulátorként, mások represszorként működnek. Az NF1 faktor (nuclear factor 1), melyet először az adenovírus genom replikációjában betöltött szerepe alapján azonosítottak, a HPV-ok esetében represszor funkcióval bír (Kyo és mtsai, 1993). Az AP1 faktor (activator protein 1) EGF és KRF növekedési faktorok hatására stimulálja a virális génexpressziót (Chan és mtsai, 1990). Az Oct-1 (octamer binding transcription factor 1) a POU faktor család tagjaként számos virális és celluláris gén működésére hatással van, a papillomavírusok esetében represszorként funkcionál (Hoppe-Seyler és mtsai, 1991). Az YY1 (yin and yang 1) faktor működhet aktivátorként és represszorként egyaránt (Lee és mtsai, 1992). Az LCR-ben bekövetkező mutációk érinthetnek transzkripciós faktor kötőhelyeket is, melyek hatással lehetnek az érintett faktor bekötődésére, ennek eredményeként változhat a faktor aktivációs vagy repressziós hatása, mely végső soron befolyásolhatja az E6 illetve E7 onkogének expresszióját. Az LCR sematikus felépítését és a benne található celluláris és virális faktorok lehetséges kötőhelyeit az **5. ábra** foglalja össze.



5. ábra A HPV 31 fő szabályzó régiójának tagolódása a benne található putatív virális és celluláris transzkripciós faktor kötőhelyekkel O'Connor és munkatársai alapján (1995).

4.6 A HPV 31 LCR, E6 és E7 genomi régiók polimorfizmusa

A magas kockázatú HPV 31 filogenetikai szempontból közeli rokonságban áll a HPV 16-tal, ennek ellenére különböznek mind agresszivitás, mind intratípusos variabilitás szempontjából. Napjainkban a legmélyrehatóbban tanulmányozott típus a HPV 16, melynek sikerült feltárni számos, a tumorképződéshez vezető molekuláris mechanizmusát, természetes genetikai variabilitását, a variánsok sokszor különböző biológiai hatását. A HPV 31 esetében is egyre több tanulmány születik világszerte, melyekben számos intratípusos variánst sikerült detektálni az L1, E6, E7 és LCR régiókban (Calleja-Macias és mtsai, 2004; Gagnon és mtsai, 2005; Raiol és mtsai, 2009; Chagas és mtsai, 2011, 2013; Cento és mtsai, 2011;), viszont ezen típus molekuláris mechanizmusainak felderítése, a variánsok funkcionális különbségeinek vizsgálata még sok kihívást állít a kutatók elé. A HPV 16 esetén földrajzi régiók szerinti intratípusos megoszlást lehet megfigyelni (európai, afrikai, ázsiai, ázsiai-amerikai és észak-amerikai), mely intratípusok esetében epidemiológiai vizsgálatok kimutatták, hogy az eltérő populációkban különbségek vannak például a vírus perzisztáló képessége vagy az agresszivitása szempontjából (Berumen és mtsai, 2001; Xi és mtsai, 2006). Funkcionális vizsgálatok kimutatták, hogy az E6 illetve E7 onkogénekben bekövetkező aminosav mutációk

hatással lehetnek a HPV variánsok karcinogenitására, például az *in vitro* p53 degradációt indukáló hatásra (Stoppler és mtsai, 1995) vagy a specifikus virális epitópok immunogenitására (Ellis és mtsai, 1995). Ezzel ellentétben, a HPV 31 esetében három intratípusos csoport (*A*, *B* és *C*) különböztethető meg, melyek nem mutatnak földrajzi régiók szerinti eloszlást, hanem egy adott populáción belül mutatkozik meg ez a heterogenitás. Ez a jelenség megfigyelhető a HPV-33, 35, 52, 58 és 67 típusok esetében is (Chen és mtsai, 2011). Ennek háttérében az állhat, hogy a HPV-ok evolúciós mechanizmusa másabb, mint a többi vírusé, melyek a gazdasejtrel párhuzamosan evolválódtak, ugyanis a virális genom evolúciójára nem volt szignifikáns hatással semmilyen földrajzi, szexuális, vagy faji szeparáció. A HPV 31 prevalenciája esetében földrajzi variabilitást figyeltek meg: az USA-ban Xi és munkatársai 2012-ben 1,1%-os HPV 31 prevalenciát írtak le, míg Ázsiában ez az érték 0,3%, Európában 2,3%, míg Latin-Amerikában 1,2%; mely valószínűleg a kontinensek között fenálló etnikai különbségekkel magyarázható. Jóllehet számos epidemiológiai tanulmány jelent meg a HPV 31 variánsok biológiai hatásainak különbségéről, mégis fontos azoknak az aminosav mutációknak a felderítése, melyek ezeket a különbségeket okozzák, különösen az E6, E7 régiókban, ugyanis e két onkoprotein nélkülözhetetlen a HPV által okozott malignus folyamatok beindításához és fenntartásához. A HPV 31 esetében számos tanulmány ír az E6 és E7 régiókat érintő aminosav cserékről, viszont ezen mutációk hatását funkcionális szempontból még nem vizsgálták. A HPV 16 E6 és E7 mutánsokat viszont már többen tanulmányozták, melyből kiderült, hogy az E6-ban található H60Y és az A138V mutáció a putatív p53 degradációs és kötőhely közelében található meg (Foster és mtsai, 1994; Crook és mtsai, 1991). Az E7 vizsgálatai során leírt H23Y aminosavcsere az Rb kötő doménben foglal helyet, míg az E46K mutáció az Rb kötő domén és a cink ujj motívum között található (Barbosa és mtsai, 1990; Dyson és mtsai, 1992). Mivel az E7 egyik fontos funkciója az Rb/E2F útvonalon keresztül történő immortalizáció, úgy azok a variánsok, melyek az Rb kötő helyükben mutációt hordoznak, megváltozott immortalizációs képességgel rendelkezhetnek. Az E7 onkogénben található K62E mutáció a prototípust kivéve extrém magas százalékban detektálható a HPV 31 esetében (Chagas és mtsai, 2013; Gagnon és mtsai, 2005), mely arra enged következtetni, hogy ez a mutáció szinte az összes HPV 31-ben megtalálható. Az LCR szekvencia variánsainak vizsgálata szintén a HPV 16 esetében volt mélyrehatóbb. Ezen tanulmányokban leírták, hogy az LCR-ben bekövetkezett mutációk funkcionális különbségeket eredményeztek a replikációs rátában (Hubert, 2005), illetve az E6 promóter transzkripció aktivitásában (Veress és mtsai, 1999; Kammer és mtsai, 2002; Park és mtsai, 1999) a HPV 16 LCR prototípushoz képest. Több kutatócsoport is leírta, hogy az

LCR-ben bekövetkezett mutációk hatással vannak a transzkripciós faktor kötőhelyekre, mint például az NF1, AP-1, Oct-1, TEF-1 vagy az YY1, melyet a HPV 18 esetében is megfigyelték (Londesborough és mtsai, 1996; Rose és mtsai, 1998; Sichero, 2005). Európában izolált HPV 16 variánsok esetében kimutatták, hogy az E6 génben bekövetkező mutációk nagyobb mértékben megváltoztatják a vírus patogén potenciálját, mint az LCR-ben bekövetkező mutációk (Kammer és mtsai, 2002). Összefoglalva tehát a papillomavírusok kódoló vagy regulatórikus régióiban bekövetkező nukleotid és/vagy aminosav mutációi a vírusvariánsok patológiai diverzitásához vezethetnek; például a cisz-válasz elemeket érintő változások hatással lehetnek a vírus transzkripciós és replikációs rátájára, az E6 és E7 onkogénekből kialakult mutációk megváltoztathatják a vírus transzformáló hatását. Ezen megváltozott folyamatok molekuláris mechanizmusainak feltárása a HPV 16 és HPV 18 esetében előrehaladott, míg a kisebb prevalenciájú HPV típusok - például HPV 31 - esetében még számos kérdés megválaszolásra vár.

5. CÉLKITŰZÉSEK

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

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

6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

6.1 Sejtvonalak és betegminták

A *méhnyakrák* illetve *mellrák* eredetű epiteliális sejtvonalakat (C-33A, MCF-7) DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma) tápfolyadékban tenyésztettük, amelyhez 2 mM L-glutamint 10% borjúsavót, és 1 % antibiotikumot adtunk (100 U/ml penicillin és 100 µg/ml streptomycin végkoncentrációban). Egyik sejtvonal sem tartalmaz HPV DNS-t. Az MCF-7 sejtvonal p53 és Rb fehérjét natív állapotban hordozza; míg a C-33A sejtvonal p53 fehérjéje a 273 kodonnál pontmutációt hordoz, melynek eredménye egy Arg->Cys szubsztitúció; míg a retinoblasztóma fehérjét deficiens (trunkált) formában tartalmazza. A sejteket 37 C°-on, 5%-os CO₂ koncentráció és 95%-os páratartalom mellett tenyésztettük.

Mintagyűjtés: 2005 és 2009 között 41 darab HPV 31 típusra pozitív, exfoliált sejteket tartalmazó mintát gyűjtöttünk be a Debreceni Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájáról Prof. Dr. Tóth Zoltán és Prof. Dr. Hernádi Zoltán közreműködésével. A mintákat olyan nőktől vették le, akiknél a kolposzkópos vizsgálat során premalignus vagy malignus elváltozást tapasztaltak. A nők átlag életkora 34,9 év volt (21,0-51,0).

6.2 DNS izolálás, HPV DNS kimutatás, tipizálás

Az exfoliált sejtekből származó DNS izolálásához High Pure Viral Nucleic Acid Kit-et (Roche) használtunk követve a gyártó utasításait. A preparált DNS minőségét humán β-globin génre specifikus PCR módszerrel ellenőriztük (belső kontroll), míg a HPV fertőzés kimutatása az MY09-MY11-HMB01 L1 régióra specifikus konszenzus PCR technikával történt. A HPV-k tipizálása az amplimerek restrikciós analízisével történt (RFLP/Restriction Fragment Length Polymorphism) (Kónya és mtsai, 2000).

6.3 HPV 31 LCR, E6 és E7 amplifikáció

Az izolált betegmintákból a HPV 31 fő szabályzó régióját (LCR) illetve a két onkogénjét (E6, E7) specifikusan tervezett primerekkel (**2. táblázat**) sokszorosítottuk a további vizsgálatok elvégzéséhez. Az LCR szakasz amplifikálásához használt forward primer *KpnI* hasítási helyet, míg a reverz primer *HindIII* hasítási helyet tartalmaz. A PCR elegy végtérfogata 50 µl volt, mely 2 µl DNS mintából, 2,5 U Gene Amp High Fidelity Enzim Mix-ből (Life Technologies), 5 µl Gene Amp High Fidelity 10xPCR pufferből (mely 1,5 mM

MgCl₂-ot tartalmaz), 200 µM dNTP-ből illetve 0,5-0,5 µM primerekből állt. Az amplifikációs reakciók a 2720 Thermal Cycler (Life Technologies) készülékekkel lettek elvégezve. Az alkalmazott PCR hőprofil az alábbi volt: 94°C 2 perc, melyet 35 ciklus követett 94°C-on 30 másodpercig, 55°C-on 30 másodpercig és 72°C-on 60 másodpercig, melynek az utolsó 25 ciklus mindegyikében a 72°C-os extenziós lépést megnöveltük 5 másodperccel. Az amplifikációs termékek azonosítása agaróz gélben való elektroforézissel történt. A kiválasztott PCR termékek Gel Extraction Kit (Qiagen) felhasználásával történő tisztítása után BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) segítségével, ABI PRISM 17D 3100-Avant Genetic Analyzer készülékekkel (Life Technologies) lettek megszekvenálva a PCR primerekkel, illetve az LCR esetében belső szekvenáló primerekkel is. A minták szekvenálását Dr. Póliska Szilárd végezte el. A HPV 31 LCR variánsok szekvenciái JQ693766-től JQ693807-ig ellátott Accession number-rel lettek feltöltve a GenBank-ba.

Célgén		Primer szekvenciája	Primer pozíciója
LCR	F	5'-GCAC <u>GGTACCT</u> TATGTGTGTGTTTGTGTGTT-3'	nt 7122–179
	R	5'-GCACA <u>AAGCTT</u> ATCGTAGGGTATTTCCAATG-3'	nt 7122–7141
LCR Del 3	F	5'-GCGCA <u>AAGCTT</u> CCTAGTATAAAAAAGTAGGG-3'	nt 14–33
	F	5'-GCGCA <u>AAGCTT</u> CCTGTTATAAAAAAGTAGGG-3'	nt 14–33
E6	F	5'-AACCTACAGACGCCATGTTC-3'	nt 94-104
	R	5'-ATCCTCCTCATCTGAGCTGT-3'	nt 628-648
E7	F	5'-TGGAGAAGACCTCGTACTGA-3'	nt 525-545
	R	5'-AGTTACAGTCTAGTAGAACA-3'	nt 819-839

F: forward primer, R: reverz primer

2. táblázat: A HPV 31 LCR szakaszainak, E6 és E7 onkogénjeinek amplifikálására alkalmazott, PRIMER2 programmal tervezett PCR primerek

6.4 Filogenetikai analízis

MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 5 Software (Tamura és mtsai, 2011) segítségével a HPV 31 LCR, illetve E6 és E7 onkogének szekvenciáiból multi szekvencia analízis, majd filogenetikai törzsfák készültek maximum likelihood (ML) módszerrel. A törzsfa megbízhatóságának ellenőrzésére 'bootstrap' (500x) analízist végeztünk, mely során a változók 'bootstrap' újramintavételezésével előállított alternatív fákat egyesíti a program, majd %-ban fejezi ki, hogy hányszor helyezi a fában azonos helyre a mintákat. Az elvégzett filogenetikai elemzést akkor szokás megbízhatónak tekinteni, ha ezek a százalékos értékek 70-80%-nál nagyobbak, ekkor a választott filogenetikai módszer és a vizsgált szekvenciák alkalmasak a leszármazási viszonyok felderítésére. A szekvenciák elemzése és a törzsfák elkészítése Dr. Veress György segítségével történtek.

6.5 Plazmid konstrukciók

Reprezentatív LCR, E6 és E7 szekvencia variánsokat választottunk ki a filogenetikai törzsfák alapján minden intratípusból a funkcionális vizsgálatokhoz, melyeket luciferáz riporter illetve expressziós vektorba klónoztunk.

A teljes LCR szakaszokat pGL2-Basic promóter nélküli luciferáz riporter vektorokba építettük be az amplifikációhoz szükséges primereken található *KpnI* és *HindIII* restrikciós enzim felismerő helyek segítségével. Ehhez először a PCR termékeket agaróz gélelektroforézist követően preparatív 1%-os agaróz gélből kivágtuk és tisztítottuk Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével a gyártó utasításainak megfelelően. A ligálási reakcióhoz a tisztított amplimereket, illetve a pGL2-Basic vektorból 5 µg-nyi mennyiséget hasítottunk ragadós végeket eredményező *KpnI* és *HindIII* (20-20 U) restrikciós enzimekkel 37°C-on 4 órán át. Az emésztést követően Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) felhasználásával tisztítottuk a hasított termékeket. A tisztított PCR termékeket a pGL2-Basic vektorba (Promega) ligáltuk T4 DNS ligáz (New England Biolabs) enzim segítségével. Az 1 µl pGL2-Basic vektort, 1 U T4 ligáz enzimet, 10 µl tisztított PCR terméket tartalmazó 20 µl végtérfogatú reakcióelegyet éjszakán át inkubáltuk 16 °C-on. A következő nap a ligációs, valamint az inzertet nem tartalmazó csak vektort hordozó (kontroll) elegyet 0°C-ra lehűtöttük olvadó jégen, majd *Escherichia coli* (*E. coli*) XL1 baktérium törzset transzformáltunk. A transzformálás során 100-100 µl kompetens baktériumszuszpenziót mértünk a 20 µl ligálási elegyekhez, majd 30 percig 0°C-on inkubáltuk. Ezt követően 900 µl glükózzal kiegészített TSB (Trypton Soy Broth) [Luria-Bertani (LB) tápfolyadék, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂, 2,0 mM glükóz, 5 % DMSO 10 % polietilén-glikol] tápoldatot mértünk a mixekhez, majd 37°C-on inkubáltuk 350 rpm-en rázatva 1 órán át. A transzformált baktériumokat 13000 rpm-en történő centrifugálással összegyűjtöttük, majd a felülúszó részleges leöntését és az üledék alapos szuszpenzióját követően 100-100 µl-t szélesztettünk 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB agar szelektív táptalajra és 37°C-os termosztátba helyeztük a csészéket éjszakára a baktériumok növekedéséhez. Másnap a kinőtt telepekből mintánként legalább 10-10 db izolált telepet leoltottunk 2-2 ml ampicillin (100 µg/ml) tartalmú folyékony LB médiumba és 37°C –on 200 rpm-mel rázatva 6 órán át tenyésztettük a baktériumokat. A plazmid DNS izolálásához 1-1 ml baktériumszuszpenziót kimértünk Eppendorf-csővekbe, majd centrifugáltuk 1 percig 13000 rpm-mel. A felülúszó maradéktalan eltávolítása után az üledéket alaposan felszuszpendáltuk 100-100 µl P1 oldatban (10 mM EDTA, 25 mM TrisHCl pH 8,0, 50 mM glükóz, 0,1 mg/ml RNáz), ezt követően

hozzámértünk 200-200 µl P2 oldatot (1 % SDS 0,2 N NaOH,) és 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten lassú összeforgatással. Ezután a reakcióelegyhez adtunk 150-150 µl P3 oldatot (3M kálium-acetát, pH 4,8) és 2 másodpercig vortexeltük. Centrifugálással (13000 rpm, 5 perc) elválasztottuk a plazmid DNS-t tartalmazó tiszta fázist és a csapadékként keletkezett sejttörmelékét. A tiszta fázist átmértük tiszta Eppendorf-csővekbe, majd 800-800µl 96%-os etanol hozzáadásával precipitáltuk a DNS-t. Egy 13000 rpm, 5 perces centrifugálási lépés után a felülúszókat leöntöttük és 70%-os etanollal mostuk a pelletet, majd ismét centrifugáltuk (13000 rpm, 5 perc). A felülúszók alapos eltávolítása után az üledéket beszárítottuk szobahőmérsékleten, majd 30-30 µl TE-pufferben oldottuk fel a DNS-t. *KpnI* és *HindIII* restriktív enzimekkel történő hasítás, majd a hasított minták agaróz gélelektroforézise után megállapítottuk, hogy mely transzformánsokba épültek be az inzertek. Az inzerteket hordozó baktérium klónokból plazmid DNS-t izoláltuk nagy mennyiségben: 100 ml ampicillin (100 µg/ml) tartalmú LB folyékony médiumba oltottunk 100 µl baktériumszuszpenziót és éjszakán át 37 °C-on, 200 rpm-mel rázatva tenyésztettük, másnap Wizard Plus Midipreps DNA Purification System (Promega) felhasználásával a gyártó utasításainak megfelelően plazmid DNS-t preparáltunk. A plazmid DNS-t 100 µl TE pufferbe oldottuk be, a koncentrációt spektrofotométerrel határoztuk meg. Az inzertált DNS fragmentumokat két irányból történő szekvenálással ellenőriztük a GLprimer1 (5'-d(TGTATCTTATGGTACTGTAAGT)-3') és a GLprimer2 (5'-d(CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA)-3') szekvenáló primerek (Promega) segítségével.

Az LCR Del 1 és Del 2 deléciós mutánsokat a teljes LCR szakaszokat tartalmazó pGL2-Basic vektorokból nyertük. A Del 1 konstruktokat *KpnI* és *RsrII* restriktív enzimekkel, míg a Del 2 mutánsokat *KpnI* és *PmeI* enzimekkel hasítottuk, 1%-os preparatív agaróz gélen elektroforetizáltuk, majd a kivágott szakaszokat már nem tartalmazó vektorok gélből történő kivágása után a mintákat Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) segítségével tisztítottuk. A hasított plazmid végeinek foszforilálására és tompa végek kialakítására Fast DNA End Repair Kit-et (Thermo Scientific, Waltham, MA) használtunk a gyártói utasításoknak megfelelően, majd a kezelt plazmidokat tisztítottuk a Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) felhasználásával. A plazmidok újraligálása T4 DNS ligáz enzim (Thermo Scientific) alkalmazásával történt: 50 µl térfogatban 10 µg lineáris plazmid, 5 U ligáz enzim és 5 µl PEG (polietilén-glikol) felhasználásával 22 °C-on 10 percig. Ezt követően az újraligált plazmidokat azonnal felhasználtuk *E. coli* XL1 törzsbe történő transzformáláshoz a TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Scientific) felhasználásával, a gyártói

utasításoknak megfelelően. A transzformált baktériumokat 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB agarra szélesztettük steril üvegbottal, majd 37°C-os termosztátba tettük növekedni másnapig. A Del 3 mutáns konstruktok az LCR 14-179 nukleotidjáig terjedő szakaszát *HindIII* restrikciós enzim felismerő helyeket tartalmazó primerekkel (**3. táblázat**) és a már korábban ismertetett PCR kondíciókkal amplifikáltuk. A PCR-t követően preparatív agaróz gélben történt az amplimerek azonosítása, kivágása és gélből való tisztítása Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) segítségével. A tisztított PCR termékeket és 5 µg-nyi pGL2-Basic vektort 20 U *HindIII* restrikciós enzim alkalmazásával 37°C-on 4 órát emésztettük, majd tisztítottuk Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) felhasználásával. T4 DNA ligáz enzim (Thermo Scientific) segítségével ligáltuk be az inzerteket: 20 µl végtérfogatban 1 µl hasított pGL2-Basic, 10 µl hasított PCR termék és 2 U ligáz enzim bemérésével 10 percig 22 °C-on. Ezt követően a ligált plazmidokat TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Scientific) segítségével azonnal felhasználtunk az *E. coli* XL1 törzsbe történő transzformáláshoz. Ampicillin (100µg/ml) tartalmú LB agarra szélesztettük a transzformált baktériumokat, másnapig 37°C-on növesztettük. A deléciós mutánsok esetében a sikeres transzformációk ellenőrzésére kolónia PCR-t használtunk. Ehhez a transzformálás után kinőtt baktérium telepekből mintánként legalább 10-10 izolált telepet átoltottunk steril kacsokkal ampicillines (100µ/ml) LB agarra, majd éjszakára 37°C-os termosztátba tettük növekedni. A másnap kinőtt baktérium telepekből Red Taq Ready Mix (Sigma-Aldrich) felhasználásával és a **4. táblázatban** található primerekkel és PCR kondíciókkal detektáltuk, hogy mely transzformáns hordozza az inzerteket. A deléciós mutáns konstruktok nagy mennyiségű felszaporítása és tisztítása a korábban leírtak szerint történt Wizard Plus Midipreps DNA Purification System (Promega) felhasználásával a gyártói utasításokat követve. Az elkészült plazmid konstruktok inzertált DNS fragmentjeit két irányból történő szekvenálással ellenőriztük a Del 1 és Del 2 mutánsok esetén a G1primer1 és G1primer2 szekvenáló primerek, míg a Del 3 mutánsok esetében a PCR primerek használatával.

Primer neve		Primer szekvenciája (5' → 3')	Amplifikált régió
HPV31-14AG	F	GCGCAAGCTTCTTAGTATAAAAAAGTAGGG	nt 14-179
HPV31-14GT	F	GCGCAAGCTTCTTGTATAAAAAAGTAGGG	
HPV31-1011H	R	CACAAGCTTATCGTAGGGTATTCCAATG	
HPV 31 E6 HISTAG Forward	F	AACCTACAGACGCCATGTTT	nt 94-554
HPV 31 E6 HISTAG Reverse	R	CACTTGGGTTTCAGTACGAG	
HPV 31 E7 HISTAG Forward	F	TGGAGAAGACCTCGTACTGA	nt 525-868
HPV 31 E7 HISTAG Reverse	R	CAGCCATTGTAGGGACAGTC	
HPV 16 E6 Histag Forward	F	GAACCGAAACCGTTAGTAT	nt 48-556
HPV 16 E6 Histag Reverse	R	ACAGCTGGGTTTCTCTACGT	
HPV 16 E7 Histag Forward	F	CCAGCTGTAATCATGCATGG	nt 550-855
HPV 16 E7 Histag Reverse	R	ATGGTTTCTGAGAACAGATGGG	

F: forward primer, R: reverz primer

3. táblázat: A Del 3 LCR deléziós mutánsok és az E6, E7 expressziós vektorok készítéséhez szükséges PRIMER2 programmal tervezett primerek

A HPV 31 E6, E7 illetve a HPV 16 E6 és E7 onkogének esetében az inzertek amplifikációját a **3. táblázatban** található primerekkel végeztük el Gene Amp High Fidelity Enzim Mix segítségével a már korábban ismertetett kondíciók mellett. Ezt követően a PCR termékekhez Taq polimeráz enzim segítségével egy-egy túlnyúló adenint adtunk (A-addíció: 5U Taq DNA Polymerase from *Thermus aquaticus* [Sigma-Aldrich], 1 µl 100 mM. dATP [Fermentas], 5 µl 10x puffer, 40 µl PCR termék felhasználásával 20 percig inkubáltuk 72°C-on). Ezután tisztítottuk a reakcióelegyet Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) segítségével. pcDNATM3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit felhasználásával, a gyártói utasításoknak megfelelően ligáltuk az inzerteket az expressziós vektorba, illetve transzformáltuk a kítchez mellékelt kompetens *E. coli* baktériumokba. A sikeres transzformánsok szűrését kolónia PCR segítségével, a **4. táblázatban** felsorolt primerek és hőprofil alkalmazásával végeztük el, mely módszerrel nemcsak az inzert jelenléte, de az orientációja is ellenőrizhető. Az inzertet tartalmazó plazmidok felszaporítása és nagy mennyiségben történő preparálása az LCR plazmidok esetében már ismertetett módon zajlott. Az elkészült vektor konstruktokat szekvenálással ellenőriztük.

Az adenovírus E2-t és luciferáz gént tartalmazó pAdE2luc vektor konstruktot Dr. Ann Roman-tól kaptuk (Amstrong és Roman, 1997), a p53 luciferáz riporter vektort, mely luciferáz gént és több kópia p53 kötőhelyet hordoz, az Agilent Technologies-től szereztük be.

Primer neve		Primer szekvenciája (5' → 3')	Amplimer neve	PCR kondíciók	
				Hőmérsékleti profil	Ciklus szám
GLprimer1	F	TGTATCTTATGGTACTGTAAGT	Del 1 és	1. 94°C 10 perc 2. 94°C 30 mp 3. 55°C 30 mp 4. 72°C 30 mp 5. 72°C 2 perc 6. 4°C ∞	30 (2.-5. lépések)
HPV31-1011H	R	CACAAGCTTATCGTAGGGTATTTCCAATG	Del 2		
HPV31-14AG	F	GCGCAAGCTTCTTAGTATAAAAAAGTAGGG	Del 3		
HPV31-14GT	F	GCGCAAGCTTCTTGTATAAAAAAGTAGGG			
GLprimer2	R	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA			
HPV 16 E6 Histag Forward	F	GAACCGAAACCGTTAGTAT	HPV 16 E6		
BGH Reverse	R	TAGAAGGCACAGTCGAGG			
HPV 16 E7 Histag Forward	F	CCAGCTGTAATCATGCATGG	HPV 16 E7		
BGH Reverse	R	TAGAAGGCACAGTCGAGG			
E6 HISTAG Forward	F	AACCTACAGACGCCATGTTC	HPV 31 E6		
BGH Reverse	R	TAGAAGGCACAGTCGAGG			
E7 HISTAG Forward	F	TGGAGAAGACCTCGTACTGA	HPV 31 E7		
BGH Reverse	R	TAGAAGGCACAGTCGAGG			

F: forward primer, R: reverz primer

4. táblázat: Az LCR deléciós mutánsok és az E6, E7 transzformánsok szűrésére használatos kolónia PCR-hez szükséges primerek és hőprofil

6.6 Tranziens transzfekeció

A pGL2-Basic plazmid konstruktok, melyeket az LCR variánsok vizsgálatához használtunk, a luciferáz enzimet kódoló *luc* gént tartalmazzák, amelynek átíródását, ezzel együtt a luciferáz aktivitását is a *luc* gén elé beépített inzert aktivitása határozza meg (riporter vektor). A *luc* gén a szentjánosbogár luciferáz enzimét kódolja, mely enzim egy kemilumineszcens reakciót katalizál, amely során az enzim a luciferin nevű szubsztrátjával ATP jelenlétében oxidációs reakcióban reagál, mely – luminométerrel mérhető - fotonfelszabadulással jár. Ez a módszer alkalmas arra, hogy megvizsgáljuk a *luc* gén elé klónozott inzertek transzkripció aktivitását.

A méhnyakrák eredetű, HPV negatív C33-A sejteket DMEM-ben (Dulbecco's modified Eagle's medium) tenyésztettük, melyet kiegészítettünk 10% FBS-sel (foetal bovine serum), 2 mM L-glutaminnal, illetve 100 U/ml penicillin és 100 mg/ml streptomycin antibiotikumokkal. 3×10^5 darab sejtet tettünk ki lyukanként 6 lyukú tenyésztő plate-re és növesztettük, amíg elérték a kb. 70%-os konfluenciát. A C33-A sejteket kalcium-foszfát módszerrel transzfekektáltuk. A transzfekeciós mix a következőket tartalmazta: 2 µg luciferáz

riporter plazmid, 0.05 µg pRL-TK Control Vector (Promega), mely vektor a *Renilla reniformis* Renilla luciferáz (Rluc) génjét kódolja; 6.5 µl 2.5 M CaCl₂ és 65 µl desztillált víz. Ehhez a mixhez adtunk 75 µl 2x HeBS puffert (50 mM HEPES [pH 7.1], 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄), 10 másodpercig vortexeltük, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk a transzfekciós mixet 30 percig. Közben a sejteket mostuk egyszer 2-2 ml PBS-sel (phosphate buffered saline), majd ráértünk 2-2 ml DMEM-et. Ezt követően a sejtekhez adtuk a transzfekciós mixet és 24 óráig 37°C-on CO₂-os termosztátban inkubáltuk, majd lecseréltük a tápfolyadékot friss DMEM-re. A transzfekciót követő 48 óra múlva a sejteket lizáltuk 250 µl Passive Lysis Buffer (Promega) hozzáadásával, illetve egy fagyasztás-olvasztás lépéssel. A sejtlyizátumok luciferáz aktivitásának a mérésére Dual Luciferase Reporter (DLR) Assay (Promega) rendszert használtuk, mely rendszer azon alapul, hogy egy mintában párhuzamosan lemérjük először a szentjánosbogár (*Photinus pyralis*), majd a renilla (*Renilla reniformis*) luciferáz aktivitását, melyre a transzfekció hatékonyságát standardizálhatjuk. Minden transzfektálást legalább három, egymástól független alkalommal elvégeztünk.

6.7 *Tranziens kotranszfekció*

A HPV 31 E6 és E7 variánsok aktivitásának vizsgálatához HPV negatív, mellrák eredetű MCF-7 epithel sejteket is DMEM-ben tenyésztettük a fent leírt módon. Transzfektáláshoz a 6 lyukú plate minden lyukára 5x10⁵ darab sejtet tettünk és 70 %-os fedettségig növesztettük őket. Az MCF-7 sejtek lipid mediált transzfekciójához Lipofectamine 2000 (Life Technologies) reagenst használtunk. A transzfekciós mix a következőket tartalmazta: 0,75 µg expressziós vektor (E6, E7); 2µg riporter vector (p53, pAdE2) 500 µl Opti-MEM® I Reduced Serum Medium, GlutaMAX™ és 8 µl Lipofectamine reagens (Life Technologies). A transzfekciós mixet 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Eközben előkészítettük a sejteket: egyszer mostuk 2-2 ml PBS-sel, egyszer mostuk 2-2 ml Opti-MEM-mel, majd 2-2 ml Opti-MEM-et mértünk a sejtekre, végül hozzáadtuk a transzfekciós mixet, melyet 5 óráig inkubáltunk a sejteken 37°C-on CO₂-os termosztátban. Ezt követően tápfolyadékot cseréltünk friss DMEM-re. 48 óra múlva a sejteket feltártuk Reporter Lysis Buffer (RLB) (Promega) segítségével, illetve egy fagyasztás-olvasztás lépéssel. Centrifugálást követően (12500 rpm, 10 perc, 4°C) Luciferase Assay System (Promega) felhasználásával lemértük a sejtlyizátumok luciferáz aktivitását. A sejtek összfehérje mennyiségét Bradford-protein assay segítségével határoztuk meg, ezen értékekre standardizáltuk a luciferáz értékeket. Minden kísérletet legalább három, egymástól független ismétlésben elvégeztünk.

6.8 *Stabil transzfekció*

Az E6 és E7 gének stabil expressziójához MCF-7 sejtvonalat transzfectáltunk, melyhez 6 lyukú plate-re 5×10^5 darab sejtet tettünk ki lyukanként és kb. 75-80%-os konfluenciáig növesztettük. A transzfectálás a fentebb leírt, lipidmediált módszerrel zajlott azzal a kivétellel, hogy ebben az esetben csak az expressziós vektorokkal transzfectáltunk, melyet a transzfectió előtt linearizáltunk *MfeI* restriktív enzimmel, mely segítségével elérjük azt, hogy az expressziós plazmid jó helyen nyíljon fel és így épüljön be a gazdasejt genomjába. A transzfectiót követően 48 óra múlva a tápfolyadékot lecseréltük 600 µg/µl Geneticin (GIBCO) tartalmú szelekciós DMEM-re és a sejteket ebben tenyésztettük legalább 3 hétig, amíg kiszelektálódtak az E6 illetve E7 géneket expresszáló sejtek. A kiszelektálódott sejtpopulációk poolozása után tovább tenyésztettük a sejteket T-25-ös tenyésztő flaskákon.

RNS izolálás és RT-PCR

A totál RNS-t Tri-Reagent (Sigma) alkalmazásával izoláltuk a stabilan transzfectált MCF-7 sejtekből. Körülbelül 2×10^6 db sejtet 500 µl Tri-Reagent-ben felfuszpendáltunk, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltunk. Ezt követően 100 µl kloroformot adtunk a mintához és ismét inkubáltunk szobahőmérsékleten 10 percig. Ezután a mintákat 13000 g fordulatszámra, 15 percig, 4 °C -on centrifugáltuk. A centrifugálás végére a minta három fázisra vált szét, a felső vizes fázisból az RNS-t 250 µl izopropanollal precipitáltuk 10 percen át, szobahőmérsékleten. Centrifugálást (13000 g, 15 perc, 4 °C) és a felülúszó leöntését követően az RNS üledéket mostuk 96%-os etanollal, szárítottuk, végül 50 µl dietil-pirokarbonátot tartalmazó desztillált vízben oldottuk fel. Spektrofotométerrel határoztuk meg az izolált RNS koncentrációját.

Az E6 és E7 mRNS expresszió vizsgálatához a reverz transzkripció reakciót 2 µg RNS mintából random hexamer oligonukleotidokkal a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) segítségével végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. A PCR reakcióhoz RedTaq DNA polymerase (Sigma) enzimet alkalmaztunk. A konstitutívan expresszálódó GAPDH detektálása szolgált kontrollként (Borbély és mtsai. 2006).

6.9 *Fehérje izolálás*

A HPV 16 E6, E7 illetve a HPV 31 E6 és E7 fehérjék expressziójának vizsgálatára, illetve az E6 és E7 fehérjéknek a celluláris p53 illetve retinoblasztoma fehérjékre kifejtett

hatásának vizsgálatára a stabilan transzfektált MCF-7 sejteket mostuk kétszer PBS-sel, majd tripszines kezeléssel elválasztottuk a tenyésztőedények aljától, majd a teljes celluláris fehérjetartalom izolálását végeztünk RIPA lízis pufferrel (150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5% (w/v) Na-dezoxikolat, 0,1% (w/v) SDS, 0,01% Na-azid (pH 7.4), 1,0 mM EDTA), mely proteáz gátlót (Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche) és foszfatáz gátlót (1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF) tartalmazott. A sejteket 15 percig jégen inkubáltuk a lízis pufferben, majd 13000 rpm-en 15 percig 4 °C -on centrifugáltuk. A sejt-lizátumok összfehérje koncentrációját Bradford teszt segítségével határoztuk meg.

6.10 Western blot

A fehérje izolátumokat 6x-os töltőpufferrel (Laemli pufferrel) (SDS 1,2 g; brómfenol kék 6mg; glycerol 4,7 ml; 0,5 M Tris pH 6,8 1,2 ml; desztillált víz 2,1 ml; DTT 0,93g) inkubáltuk 95°C -on 5 percig, majd a fehérjéket 10%-os SDS-poliakrilamid gélben elektroforézissel választottuk el Bio-Rad Mini Protean II készülék alkalmazásával. Ezt követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra (GE Healthcare) transzferáltuk Bio-Rad transzfer rendszer segítségével 90 V-on, 90 percig [blottoló puffer: 192 mM glicin; 25 mM Tris-HCl (pH 8,3), 10% (v/v) metanol]. A nitrocellulóz membrán apecifikus kötő helyeit az 5% tejpport tartalmazó PBST oldattal [PBS (pH 7,2), 0,05% (v/v) Tween20] blokkoltuk. Ezt követően a membránokat éjszakán át 4 °C-on vagy két órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a 5% tejpport tartalmazó PBST oldatban hígított elsődleges antitestekkel (egér monoklonális anti-p53 [Santa Cruz], egér monoklonális anti-Rb [Cell Signaling], egér monoklonális anti-His [Santa Cruz], nyúl poliklonális anti-aktin [Sigma]). A membránokat 3×10 percig mostuk PBST-vel, majd 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a torna-peroxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel [Santa Cruz]. Az immunreakciók detektálását nagy érzékenységű, kemilumineszcens detektáláson alapuló előhívó oldatokkal végeztük SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) illetve SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Pierce) ChemiDoc MP készülék segítségével.

6.11 Statisztika

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

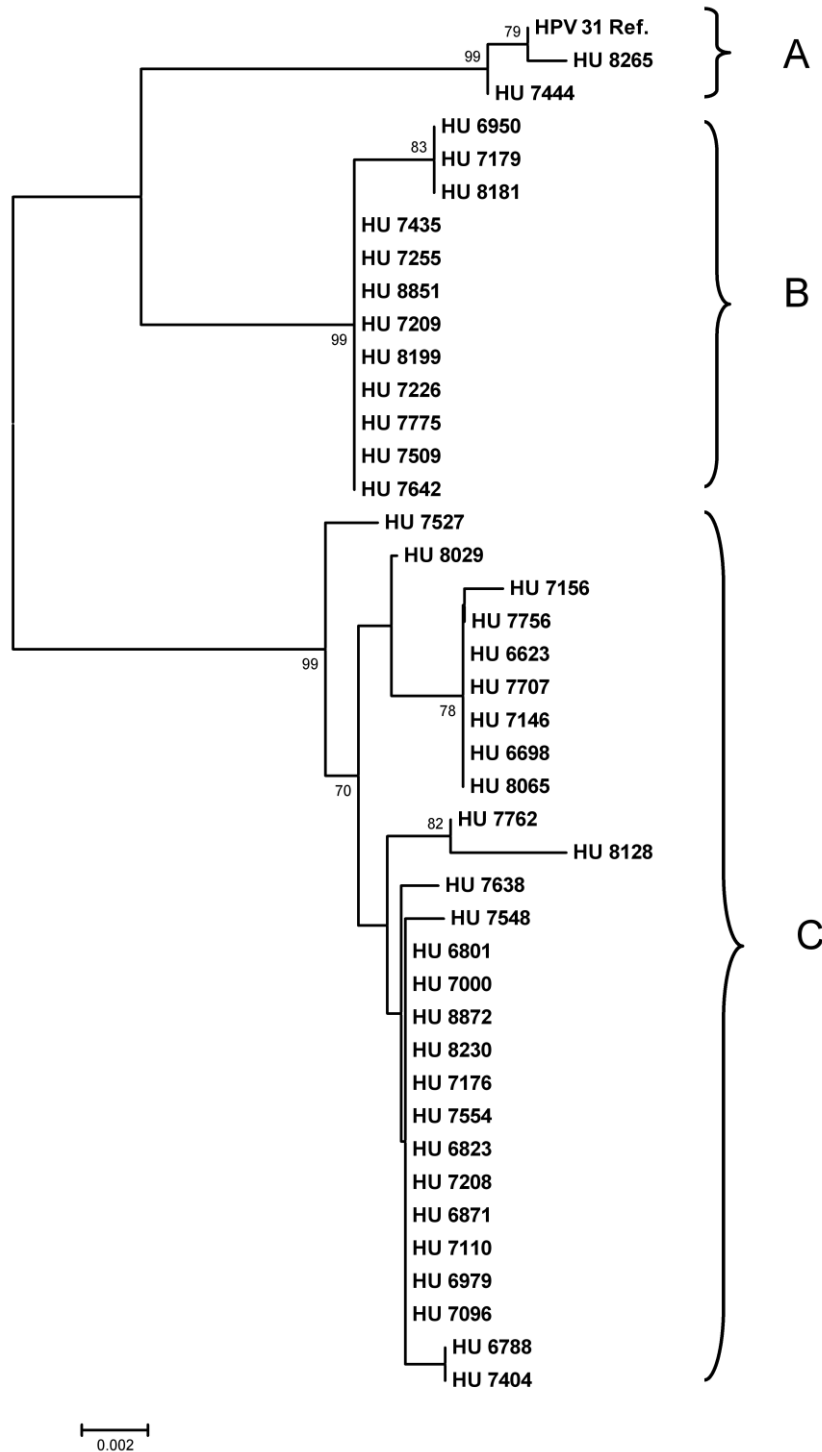
7. EREDMÉNYEK

7.1 A HPV 31 LCR variánsok

7.1.1 A klinikai mintákból származó HPV 31 LCR variánsok szekvenciáinak vizsgálata

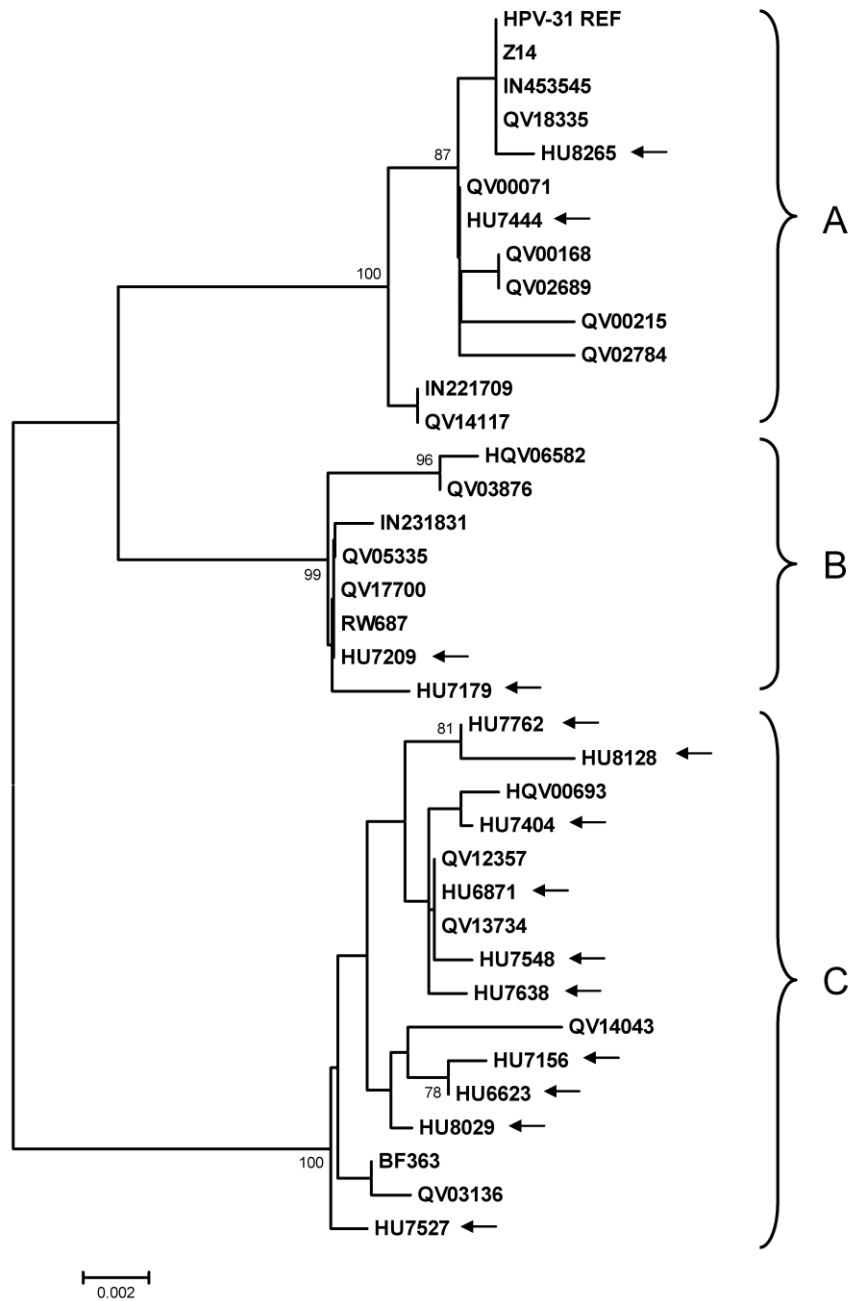
Az LCR régió közel teljes hosszúságú szakaszát (nt 7122-179) 41 darab HPV 31 pozitív klinikai mintából amplifikáltuk. Az LCR izolátumok a referencia 31 izolátumhoz (GenBank J04353) és egymáshoz képest is mutattak eltéréseket. A referencia HPV 31 szekvenciához viszonyított összesen 42 nukleotid cserét az **5. táblázatban** foglaltuk össze. 12 mintában találtunk egy 10 bázispáros deléciót (5'-CTATTTTATA-3') a 7299-7308 pozícióban, illetve egy minta esetében egy 6 bázispárból álló deléciót (nt 7187-7192) is detektáltunk. A deléciókat hordozó minták a B intratípusba tartoznak (lásd később). 35 olyan nukleotid cserét detektáltunk, melyek több mintában is megtalálhatóak voltak, ezekből kettő (G7326A és A7402G) volt egyedi nukleotid polimorfizmus, melyeket korábban még nem publikáltak. 7 minta esetében találtunk egyedi nukleotid cseréket, melyekből csak kettőt (A7517G és G7764A) írtak le más tanulmányokban. A korábban még nem publikált nukleotid változásokat, illetve az egyedi nukleotid cseréket hordozó klinikai minták (HU 7156, 7404, 7527, 7548, 7762, 8128 és 8265) amplifikálását és szekvenálását újra elvégezve erősítettük meg a nukleotid cserék jelenlétét. Vizsgálataink során a referencia szekvenciában (GenBank J04353) egy extra 10 bázispár hosszúságú szakaszt (nt 7314-7323) azonosítottunk, melyet sem az általunk vizsgált klinikai mintákban, sem a referencia szekvenciánkban (Lorincz és munkatársai, 1986) nem találtunk meg, ezért a GenBank-ban található referencia szekvencia vélhetően szekvenálási hibát tartalmaz ebben a régióban.

viszonyítva. A *B* intratípus két különböző variáns 12 izolátumából áll, melyek egy 10 bázispárból álló deléció és 15 illetve 17 nukleotid cserét tartalmaznak a referencia izolátumhoz hasonlítva. A legnagyobb polimorfizmust mind mintaszámokban, mind genetikai variabilitásban a *C* intratípus mutatta, melyet 10 különböző variáns 27 izolátuma képvisel, melyek 22-27 nukleotidcserét tartalmaznak.



6. ábra: A HPV 31 LCR izolátumok maximum likelihood analizisével készített filogenetikai törzsfája. A bootstrap konszenzus törzsfá maximum likelihood analizissel készült, a 70%-os vagy attól nagyobb bootstrap értékeket a törzsfá elágazásainál tüntettük fel.

Az általunk vizsgált 14 féle variáns és a GenBank-ban található HPV LCR szekvenciák (Chen és munkatársai, 2011) alapján készített törzsfá (7. ábra) jól mutatja az intratípusos eloszlást még akkor is, ha az egyes izolátumok más földrajzi régiókból származtak.



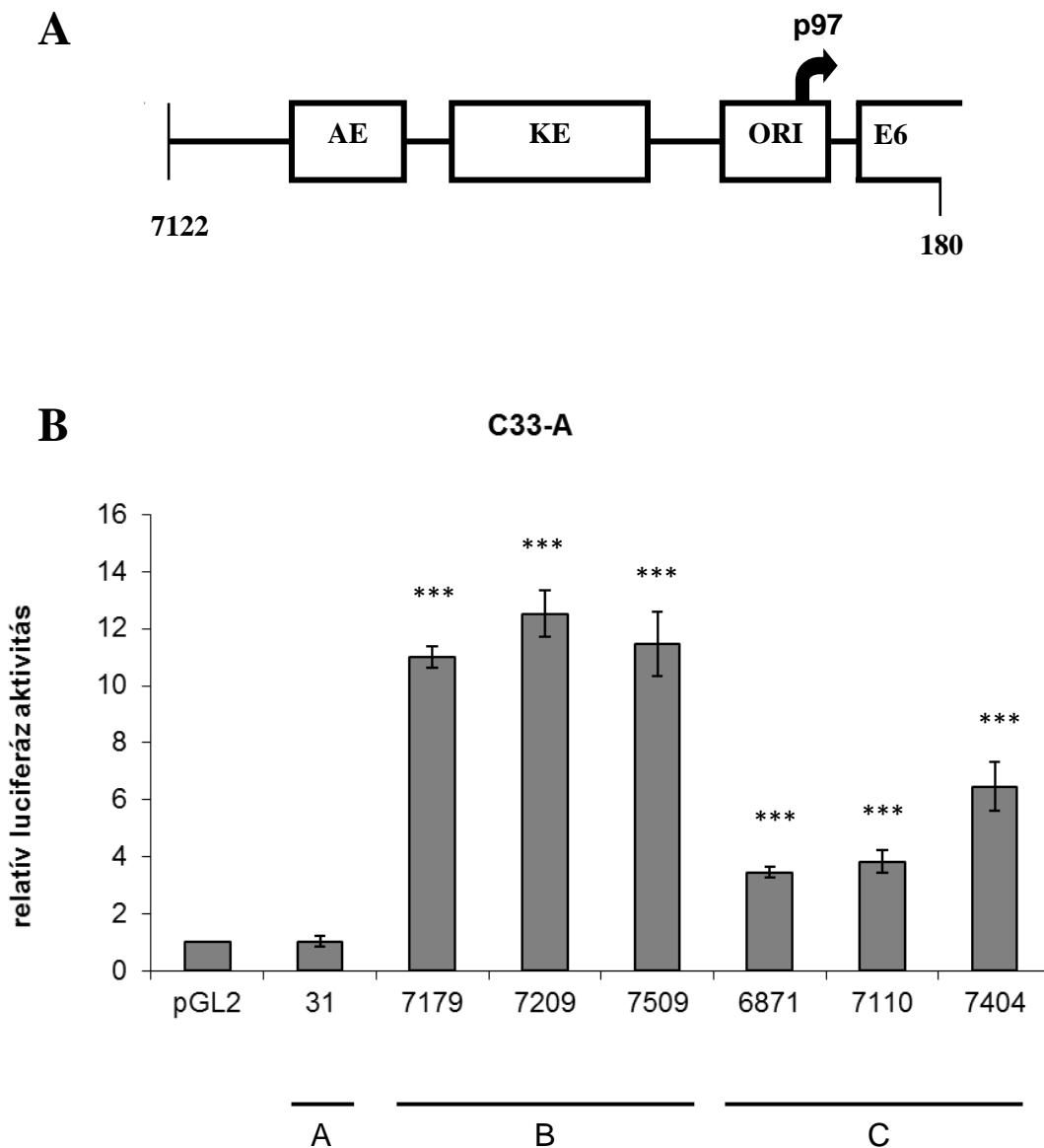
7. ábra: A HPV 31 LCR magyar variánsok illetve Chen és munkatársai által publikált LCR variánsok filogenetikai analízise.

A bootstrap konszenzus törzsfá maximum likelihood analízissel készült, az általunk vizsgált izolátumokat a nyilak jelzik. A 70%-os vagy attól nagyobb bootstrap értékeket a törzsfá elágazásainál tüntettük fel.

7.1.3 A teljes hosszúságú LCR izolátumok transzkripció aktivitásának vizsgálata

Vizsgálataink során találtunk néhány nukleotidcserét, melyek virális (E2) illetve celluláris feltételezett kötőhelyeket érintenek. A HPV 31 LCR feltételezett transzkripció faktor kötőhelyeit a TFSEARCH és a DNAMAN adatbázisokból határoztuk meg.

Azzal a céllal, hogy kiderítsük, hogy mely nukleotid cserék okoznak az általunk vizsgált izolátumokban a referencia LCR szekvenciához képest eltérő transzkripció aktivitást, pGL2-Basic promóter nélküli luciferáz riporter vektorba klónoztunk reprezentatív, a filogenetikai törzsfa alapján kiválasztott HPV 31 LCR izolátumokat. A plazmid konstruktokat ezt követően két irányból történő szekvenálással ellenőriztük, hogy kizárhassuk az esetlegesen PCR során generálódott mutációkat, majd HPV negatív méhnyakrákos C33-A sejtvonalba transzfektáltuk a referencia LCR izolátum mellett. A luciferáz tesztek eredményei azt mutatják, hogy az eltérő intratípusba tartozó variánsoknak különbség van a transzkripció aktivitásában (**8. ábra**). A *B* illetve *C* intratípusba tartozó variánsok transzkripció aktivitása szignifikánsan magasabb volt ($p < 0,001$), mint a prototípus HPV 31 LCR aktivitás. Érdekes volt, hogy az *A* intratípusú referencia HPV 31 LCR aktivitása nem volt magasabb az üres pGL2 vektor aktivitásánál. További érdekes eredmény volt az is, hogy a *B* csoport variánsainak transzkripció aktivitása szignifikánsan magasabb volt, mint a *C* intratípus tagjaié ($p < 0,001$).



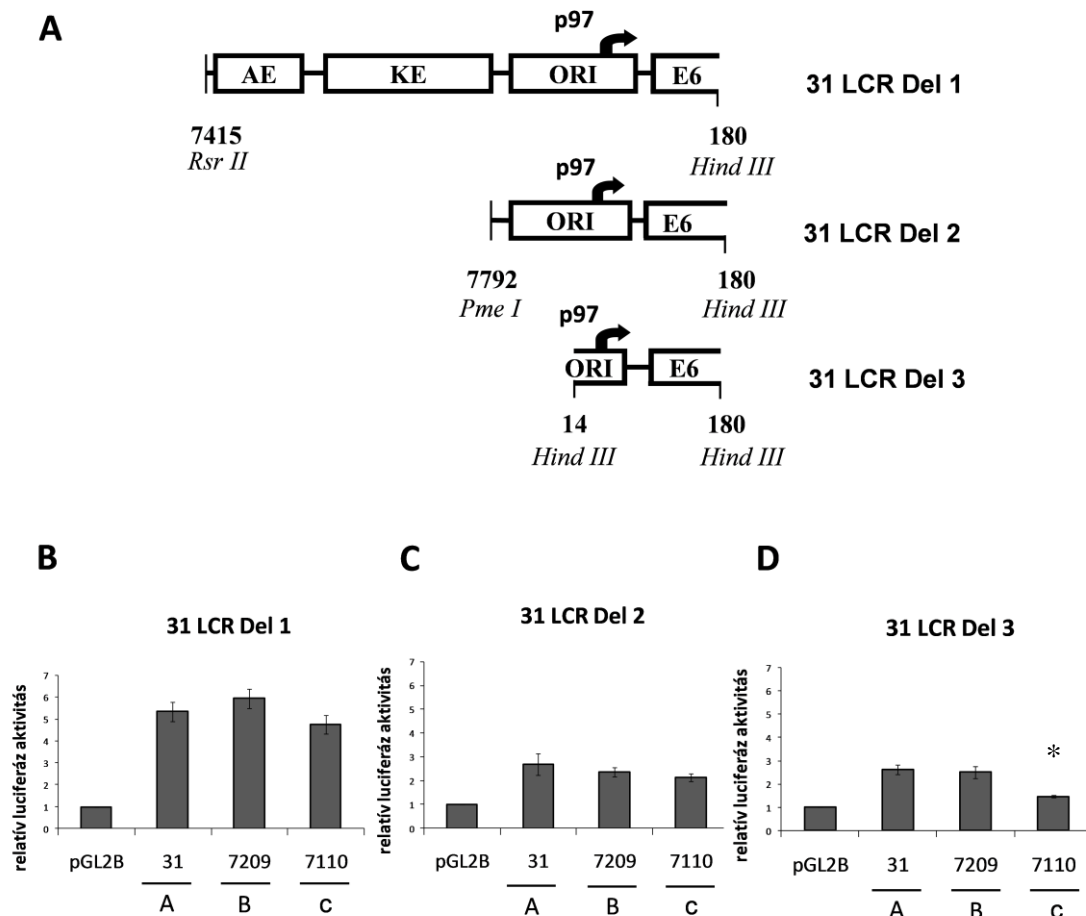
8. ábra: A teljes hosszúságú HPV 31 LCR variánsok transzkripciós aktivitásai.

Az ábra **A** része a luciferáz gén elé klónozott teljes hosszúságú LCR izolátumok sematikus ábráját mutatja. (AE: auxiliary enhancer domain, KE: keratinocyte-specific enhancer domain, ORI: origin of replication of HPV 31 circular genome) Az ábra **B** része az egyes HPV 31 variánsok illetve a referencia LCR transzkripciós aktivitásait mutatja az inzertert nem tartalmazó pGL2-Basic vektorhoz viszonyítva a tranziensen transzfektált C33-A sejtekben. Az A, B és C feliratok a különböző intratípusokat jelölik. Az ábrán feltüntetett adatok legalább három, egymástól független mérés eredményei, a hibasávok a SEM (standard error of mean) értékeket mutatják. (***) $p < 0,001$.

7.1.4 Az LCR deléciós mutánsok aktivitásának vizsgálata

Azért, hogy lokalizálni tudjuk, hogy az LCR mely szakaszán lévő nukleotidcserék felelősek a variánsok transzkripciós aktivitásbeli különbségeiért, deléciós mutánsokat hoztunk létre a meglévő, teljes hosszúságú LCR inzertert hordozó konstruktok felhasználásával

mindhárom intratípusból, majd C33-A sejteket transzfektáltunk a különböző hosszúságú LCR-deléció mutánsokkal (9. ábra).



9. ábra: A HPV 31 LCR deléció mutánsok transzkripció aktivitása.

Az LCR deléció mutánsok sematikus ábrái, melyeket pGL2-Basic vektor luciferáz génje elé klónoztunk (A). A C33-A sejtekbe tranziensen transzfektált 31 LCR Del 1 (B), 31 LCR Del 2 (C), 31 LCR Del 3 (D) variánsok relatív luciferáz aktivitásai. Az A, B és C feliratok a különböző intratípusokat jelölik. Az eredmények legalább három, egymástól független mérésekből származnak, a hibasávok a SEM (standard error of mean) értékeket mutatják. (* $p < 0,01$).

Ellentétben a teljes hosszúságú LCR variánsok eltérő transzkripció aktivitásával, a HPV 31 Del 1 variánsok (7122-7415 deléció) relatív luciferáz aktivitásai között nem volt szignifikáns különbség. Ebből arra lehet következtetni, hogy azok a nukleotidcserék, amelyek a teljes hosszúságú LCR aktivitásbeli különbségeiért felelősek, az LCR ezen szakaszára (nt 7122-7415) lokalizálódnak. Az eltérő HPV 31 LCR Del 2 variánsok (7122-7792 deléció) transzkripció aktivitásaiban nem volt szignifikáns különbség, míg a HPV 31 Del 3 variánsok esetében a C intratípusba tartozó variáns relatív luciferáz aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt ($p < 0,01$), mint az A és B csoportú variánsoké. Ez a

különbség a Del 3 mutánsok esetében azt jelzi, hogy a C intratípus minimal promóter régiójában található nukleotid cserék transzkripció aktivitás-csökkenést okoznak az A és B intratípushoz viszonyítva. Érdekesség, hogy minél hosszabb a deléció, annál alacsonyabb a transzkripció aktivitás mind a három intratípus esetében.

7.2 A HPV 31 E6 és E7 variánsok

7.2.1 A klinikai mintákból származó HPV 31 E6 és E7 variánsok szekvenciáinak vizsgálata

A HPV 31 E6 és E7 régióinak szekvenciaanalízisét az LCR variabilitásának vizsgálata alapján végeztük, mely során az egyes intratípusokba tartozó mintákból választottunk néhány reprezentatív izolátumot. Az összehasonlító filogenetikai vizsgálataink azt mutatták, hogy a fehérjéket kódoló E6 illetve E7 régiók genetikai variabilitása kisebb mértékű, mint az LCR polimorfizmusa, ugyanakkor az intratípusos eloszlás ugyanúgy megfigyelhető az E6/E7 variánsok esetében is. A HPV 31 referencia izolátumhoz (Genbank J04353) viszonyított E6/E7 nukleotid és aminosav cseréket a **6. és 7. táblázatokban** foglaltuk össze. Az E6 génben összesen 8 nukleotid változást azonosítottunk a referencia izolátumhoz képest, melyek közül 4 eredményezett aminosav cserét (H60Y, T64A, K123R, A138V) a referencia HPV 31 izolátum aminosav szekvenciájához viszonyítva. Az E7 onkogénben 5 bázis cserét detektáltunk, melyek közül 3 eredményezett aminosav cserét (H23Y, E46K, K62E).

Intratípus	Minta	E6 konstrukt	248	285	297	320	404	428	475	520
A	Ref.	31E6Ref.	T	C	A	A	G	A	A	C
	7444	
	8265	
B	8199	E6V1a	C	.	G	T	.	.	G	T
	7255		C	.	G	T	.	.	G	T
C	6950	E6V1b	C	.	G	T	.	.	G	T
	6698	E6V2	.	T	.	T	A	G	.	T
	7110		.	T	.	T	A	G	.	T
	7156		.	T	.	T	A	G	.	T
	7404		.	T	.	T	A	G	.	T
	7638		.	T	.	T	A	G	.	T
	7527		.	T	.	T	A	.	.	T
	Ref.aminosav			H	T				K	A
	Aminosav pozíció			60	64				123	138
	Aminosav csere			Y	A				R	V

6. táblázat: A HPV 31 E6 onkogén variánsok nukleotid és aminosav cseréi.

A referencia HPV 31 izolátumhoz (Genbank J04353) viszonyítva az alábbi nukleotid pozíciókban azonosítottunk nukleotid változást. A táblázat alsó sorában az aminosav cseréket, illetve azok pozícióit tüntettük fel. (A: alanin, H: hisztidin, K: lizin, R: arginin, T: treonin, V: valin, Y: tirozin)

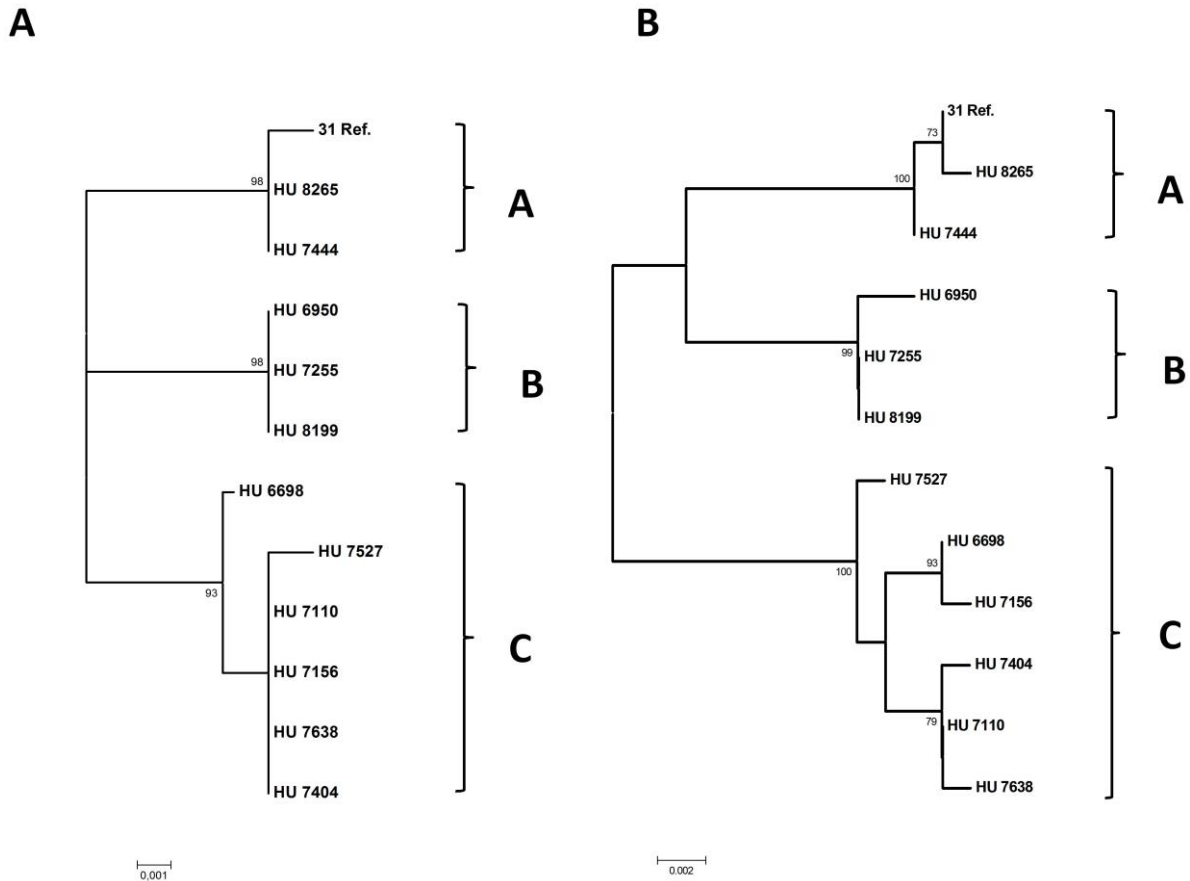
Intratípus	Minta	E7 konstrukt	580	626	670	695	743
A	Ref.	31E7Ref.	G	C	C	G	A
	7444		G
	8265		G
B	8199		.	T	T	A	G
	7255	E7V1	.	T	T	A	G
	6950		.	T	T	A	G
C	6698		.	.	T	A	G
	7110		A	.	T	A	G
	7156		A	.	T	A	G
	7404	E7V2	A	.	T	A	G
	7638		A	.	T	A	G
	7527		A	.	T	A	G
	Ref. aminosav			H		E	K
	Aminosav pozíció			23		46	62
	Aminosav csere			Y		K	E

7. táblázat A HPV 31 E7 onkogén variánsok nukleotid és aminosav változásai.

Az alábbi nukleotid pozíciókban azonosítottunk nukleotid változást a referencia HPV 31 izolátumhoz (Genbank J04353) viszonyítva. A táblázat alsó sorában az aminosav cseréket, illetve azok pozícióit tüntettük fel. (E: glutamát, H: hisztidin, K: lizin, Y: tirozin).

7.2.2 A HPV 31 E6 és E7 régiók filogenetikai vizsgálata

Akárcsak az LCR esetében, az E6 illetve E7 variánsok filogenetikai vizsgálatai alapján is jól elkülöníthető a három intratípusos csoport (A, B, C), (**10. ábra A**). Az A intratípust 2 variáns képviseli, melybe a referencia HPV 31 izolátum és két, általunk vizsgált azonos szekvenciájú izolátum tartozik bele. A B intratípusba 1 szekvencia variáns 3 izolátuma sorolható be, míg a C intratípusba 3 féle variáns 6 izolátuma tartozik, tehát akárcsak az LCR esetében, úgy az E6/E7 genomi régiók vizsgálata során is a C intratípus volt a legvariábilisabb csoport. Ha az azonos E6/E7 illetve LCR izolátumok alapján készített filogenetikai törzsfákat összehasonlítjuk (**10. ábra B**), akkor látható, hogy az egyes izolátumok mindkét régiót vizsgálva ugyanabba az intratípusba tartoznak, tehát a HPV 31 intratípusba történő besorolása úgy tűnik, hogy bármely régió alapján megtörténhet. Az LCR polimorfizmusához viszonyítva az E6/E7 fehérjéket kódoló régiók nagyobb fokú konzerváltságot mutatnak.



10. ábra: A HPV 31 E6/7 variánsok filogenetikai vizsgálata.

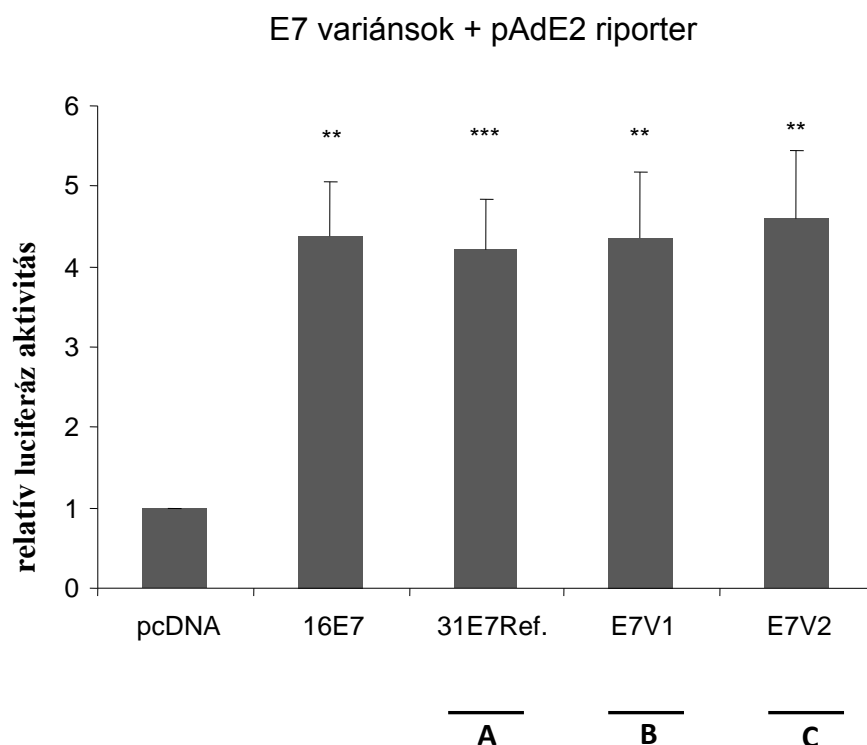
Az általunk vizsgált E6/7 variánsok szekvenciái alapján a referencia HPV 31 szekvencia bevonásával készítettük a bootstrap konszenzus filogenetikai törzsfát (A). A törzsfa elágazásainál tüntettük fel a 70 %-os vagy annál nagyobb bootstrap értékeket. A B törzsfa az E6/E7 izolátumokkal azonos LCR izolátumok szekvenciái alapján készült, mely jól mutatja, hogy az intratípusba való besorolás mindezen régiók alapján ugyanúgy lehetséges.

A HPV 31 E6 és E7 variánsok funkcionális vizsgálatai

Azzal a céllal, hogy megvizsgáljuk, hogy az E6 és E7 onkogéneket kódoló régióban bekövetkező természetes aminosav csere okoz-e ezen fehérjék esetében funkcionális különbségeket, az E6 illetve E7 kódoló régiókat eukarióta expressziós vektorba építettük, melyek azonos nyitott olvasási keretben in frame vannak egy C-terminális poli-hisztidin-taggal. Az expressziós konstruktok neveit, illetve azt a klinikai izolátumot, amelyből klónozva lettek a **6. és 7. táblázatban** mutattuk be. Kísérleteinkben kontrollként a már jól ismert funkciójú HPV 16 E6 és E7 onkogéneket expresszáló vektorokat használtunk, melyet egyidejűleg klónoztunk a HPV 31 E6 variánsokkal, illetve a HPV 31 referencia E6, E7 génekkel. Az *in vivo* tranziens kotranszfekciós teszteket MCF-7 sejtvonalon végeztük, melyben az p53 és Rb fehérjék funkcionálisan aktívak (Borbély és mtsai, 2006; Varma és Conrad, 2000).

7.2.4 A HPV 31 E7 variánsok E2F aktivitásra gyakorolt hatása

A magas rizikófaktorú HPV-k E7 onkoproteinjének egy jól ismert tulajdonsága, hogy képes kötődni a represszor komplexben lévő celluláris retinoblasztóma fehérjéhez, illetve annak társfehérjéihez, mely eredményeképpen a szabaddá váló E2F faktor aktiválódásával indukálódik a sejtciklus (McLaughlin-Drubin és Munger, 2009). A HPV 31 E7 prototípus és az eltérő intratípusba tartozó E7 variánsok e funkcióját tranziens kotranszfekciós kísérletekben vizsgáltuk, mely során MCF-7 sejteket transzfektáltunk E7 expressziós vektorokkal és adenovírus E2 promóter riporter vektorral (pAd-E2F), mely E2F transzkripciós faktor kötőhelyeket tartalmaz. Viszonyításképpen a már jól ismert funkciójú HPV 16 E7 expressziós vektort használtuk a kísérletekben. Az eredményeink (**12. ábra**) azt mutatják, hogy akár csak a HPV 16 E7, a HPV 31 E7 különböző intratípusú variánsai is megemelik az E2F transzkripciós aktivitást a kontrollként használt üres pcDNA vektorhoz képest ($p < 0,001$ és $p < 0,005$). Ez a potencírozó hatás mindhárom intratípus variánsai esetén közel azonos mértékű volt, ebben az esetben szignifikáns különbség nem volt mérhető.



12. ábra: A HPV 31 E7 variánsok transzkripciós aktivitása

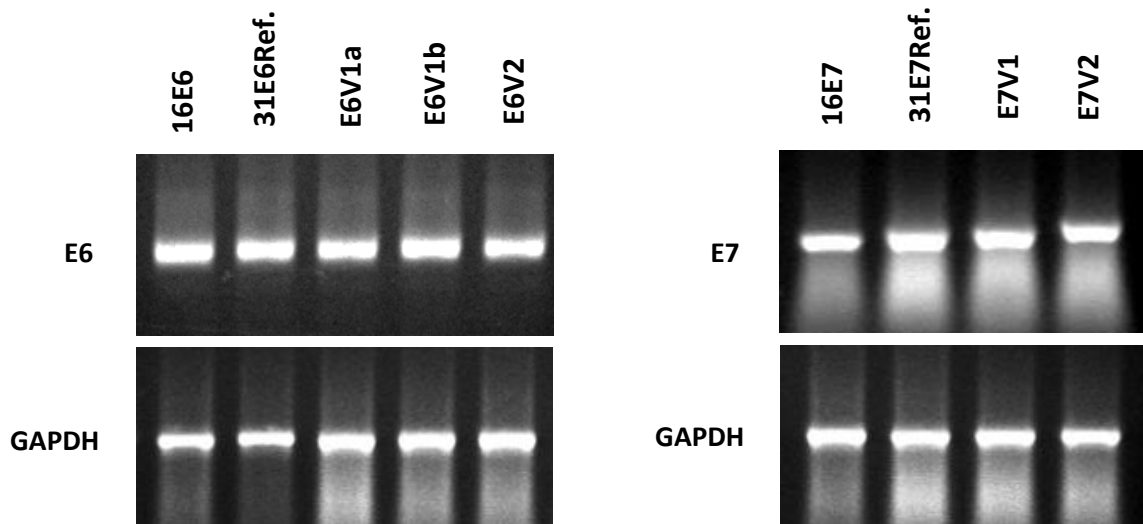
pAdE2 riporter és HPV 16 illetve HPV 31 E7 expressziós vektorokkal tranziensen kotranszfektált MCF-7 sejtek standard luciferáz aktivitásai. Az A, B és C feliratok a különböző intratípusokat jelölik. Az eredmények legalább három, egymástól független mérésből származnak, a hibásávok a SEM (standard error of mean) értékeket mutatják. (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,005$).

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

A magas kockázatú HPV E6 fehérjék egy jól ismert funkciója, hogy indukálják a celluláris p53 fehérje ubiquitin-proteaszóma rendszeren keresztül történő degradációját. Korábbi tanulmányok (Howie és mtsai, 2009; Vande Pol és Klingelutz, 2013) leírták, hogy irányított mutagenézissel készült HPV 16 E6 fehérjék esetében az E6 p53 degradációt indukáló képessége és a p53 transzkripció aktivitását gátló hatása egymástól függetlenek is lehetnek. Az E7 onkoproteinek egy fontos funkciója, hogy képesek csökkenteni a celluláris retinoblasztóma fehérjék stabilitását (Boyer és mtsai, 1996).

Azért, hogy tanulmányozni tudjuk a HPV 31 E6 és E7 variánsok hatását a celluláris p53 és Rb fehérjékre, olyan MCF-7 sejt vonalakat hoztunk létre stabil transzfeccióval, melyek expresszálják az E6 illetve E7 variánsokat. A transzfecció hatékonyságát többféle módszerrel ellenőriztük, különböző passzázsú sejtekből.

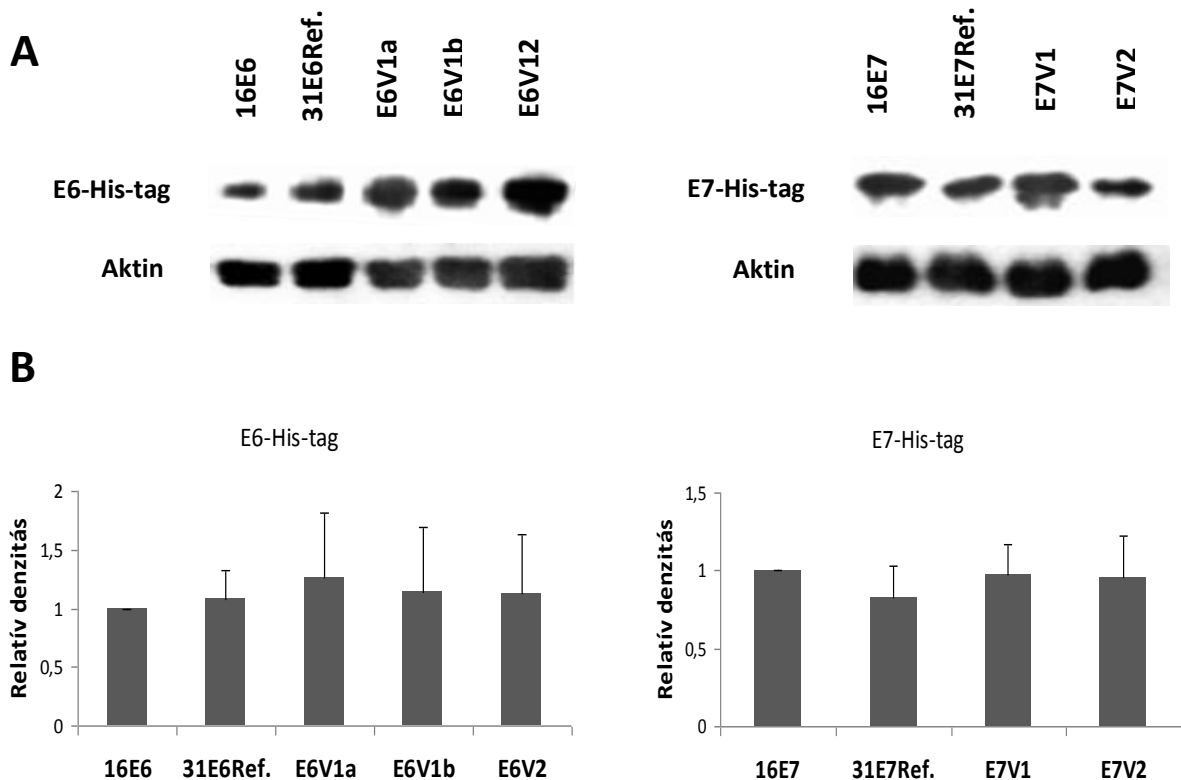
Az mRNS szintű expressziót RNS izolálást, majd reverz-transzkripció-PCR-t követő E6, E7 specifikus PCR segítségével detektáltuk (**13. ábra**). A kísérletben belső kontrollként a GAPDH szintjét ellenőriztük specifikus PCR segítségével. Az eredmények azt mutatták, hogy a stabilan transzfecciótált sejtekben az E6 és E7 onkogének hasonló mértékben kifejeződnek mRNS szinten különböző passzázs számú sejtekben egyaránt.



13. ábra: A HPV 16 és 31 E6 illetve E7 fehérjék mRNS szintű expressziója

Az E6 illetve E7 expressziós vektorokról átíródott mRNS-ek, illetve GAPDH belső kontroll detektálása stabilan transzfecciótált MCF-7 sejtekben.

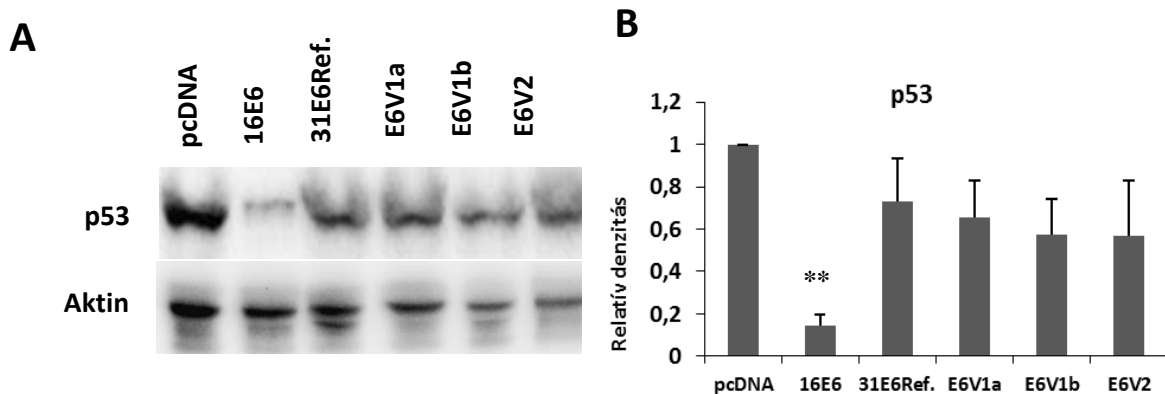
Ezt követően E6 és E7 variánsok fehérje szintű kifejeződését igazoltuk a stabilan transzfektált sejtvonalakban. A sejtekből történő fehérje izolálást követően Western blot kísérleteket végeztünk, mely során anti-hisztidin antitesttel mutattuk ki az expresszáldó E6 illetve E7 fehérjéket, melyek a C-terminális végükön poli-hisztidin tag-et hordoznak (**14. ábra**). Az E6 és E7 fehérjék hisztidin tag fúziójára/jelölésére egyrészt azért volt szükség, mert a HPV 31 E6 és E7 fehérjék ellenes antitest nem volt elérhető kereskedelmi forgalomban, másrészt az aminosav mutációkat hordozó E6/E7 fehérjék konformációjában változás lehet a referencia E6/E7 fehérjékhez képest, mely miatt a vad típusú E6/E7 fehérjék ellen termeltetett antitestek azokat esetleg nem ismernék fel. A kísérletekben kontrollként az aktin háztartási fehérje szintjét vizsgáltuk anti-aktin antitest használatával, a denzitometráls során az E6 és E7 intenzitás értékeket a megfelelő aktin intenzitás értékekre standardizáltuk. A vizsgálatok alapján mind az E6 mind az E7 variánsok közel azonos szinten expresszáldódtak.



14. ábra: A HPV 16 és 31 E6 illetve E7 fehérjék expressziója

A stabilan transzfektált MCF-7 sejtekben expresszáldó E6 és E7 onkoproteinek detektálása anti-hisztidin antitesttel Western-blot analízissel (A). Az E6 és E7-His-tag fehérjék mennyiségét denzitometrállással határoztuk meg Imagine Lab szoftver segítségével és az aktin fehérje értékekre standardizáltuk (B). A HPV 16 E6 és E7 standardizált denzitás értékeit tekintettük 1-nek, a többi denzitás értéket ezekhez viszonyítottuk. Az eredmények legalább három, egymástól független mérésből származnak, melyekből egy reprezentatív blot kép látható az ábrán. A hibásávok a SEM (standard error of mean) értékeket mutatják.

Ezután megvizsgáltuk, hogy a HPV 31 E6 variánsok endogén p53 fehérjére kifejtett hatásában van-e különbség. Ehhez Western-blot analíziseket végeztünk, mely során monoklonális p53 ellenes antitesttel detektáltuk az endogén p53 szinteket. Mennyiségi kontrollként ebben az esetben is az aktin fehérje szintje szolgált. A denzitometriás számítások során az üres pcDNA vektor standardizált denzitás értékeit vettük 1-nek, az egyes E6 értékeket ehhez viszonyítottuk. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy mindhárom intratípusba tartozó variánsok közel azonos mértékben képesek csökkenteni a p53 stabilitását. A denzitometrási értékek alapján szignifikáns különbség nem volt mérhető az üres pcDNA vektorhoz képest a HPV 31 E6 variánsok esetében, ellentétben a HPV 16 E6-tal ($p < 0,005$). Következtetésképpen elmondható, hogy HPV 16 E6-hoz viszonyítva, a HPV 31 E6 variánsok p53 stabilitásra gyakorolt hatása mérsékelt (**15. ábra**), melyet már korábbi tanulmányokban is leírtak (Mesplede és mtsai, 2012).

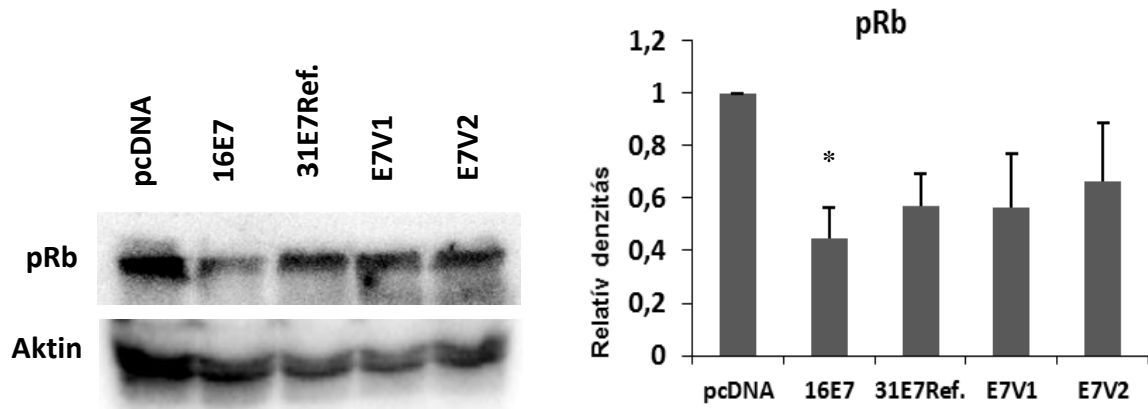


15. ábra: A HPV 16 és 31 E6 fehérjék hatása a p53 celluláris fehérjére

A stabilan transzfektált MCF-7 sejtekben expresszálódó E6 onkoproteinek hatását az endogén p53 tumorszuppresszorra anti-p53 antitest használatával vizsgáltuk Western-blot analízissel (A). A p53 fehérjék mennyiségét denzitometrálással határoztuk meg Imagine Lab szoftver segítségével és az aktin fehérje értékekre standardizáltuk (B). Az üres pcDNA vektor standardizált denzitás értékeit tekintettük 1-nek, a többi denzitás értéket ezekhez viszonyítottuk. Az eredmények legalább három, egymástól független mérésből származnak, melyekből egy reprezentatív blot kép látható az ábrán. A hibásávok a SEM (standard error of mean) értékeket mutatják. (** $p < 0,005$).

Ezt követően megvizsgáltuk a HPV 31 E7 variánsok endogén retinoblasztóma fehérjére kifejtett hatását (**16. ábra**). Ehhez Western-blot kísérleteket végeztünk, melyben az Rb szintjét monoklonális anti-Rb antitesttel detektáltuk. Az Rb intenzitás értékeket ebben az esetben is az aktin intenzitás értékekre standardizáltuk. A denzitometráls során 1-nek az üres pcDNA standardizált denzitás értékét tekintettük, az E7 fehérjék standardizált denzitás

értékeit ehhez viszonyítottuk. Az eltérő intratípusú HPV 31 E7 variánsok retinoblasztóma fehérje degradációját indukáló hatásában nem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket, ugyanakkor a HPV 16 E7 onkoprotein degradáló hatása kifejezettebb volt, mint a HPV 31 E7 variánsoké.



16. ábra: A HPV 16 és 31 E7 variánsok hatása a celluláris Rb tumorszupresszor fehérjére.

A stabilan transzfektált MCF-7 sejtekben expresszálandó E7 onkoproteinek hatását az endogén pRb tumorszupresszorra anti-Rb antitest használatával vizsgáltuk Western-blot analízissel (A). Az Rb fehérjék mennyiségét denzitometrálassal határoztuk meg Imagine Lab szoftver segítségével és az aktin fehérje értékekre standardizáltuk (B). Az üres pcDNA vektor standardizált denzitás értékeit tekintettük 1-nek, a többi denzitás értéket ezekhez viszonyítottuk. Az eredmények legalább három, egymástól független mérésből származnak, melyekből egy reprezentatív blot kép látható az ábrán. A hibásávok a SEM (standard error of mean) értékeket mutatják. (* $p < 0,05$).

8. MEGBESZÉLÉS

Munkánk során magyarországi betegpopulációban vizsgáltuk a HPV 31 néhány fontosabb régiójának szekvencia variabilitását, illetve a variánsok funkcionális aktivitását. A HPV 16-ot követően a HPV 31 a második leggyakrabban előforduló típus az általunk vizsgált populációban. Vizsgálatainkat a HPV 31 LCR (long control region) szekvencia variabilitásának tanulmányozásával kezdtük. A papillomavírusok ezen genomi régiója fehérjéket nem kódoló szakasz, ezért a genetikai polimorfizmus nagyobb mértékű, mint a fehérjéket kódoló, konzervatívabb génszakaszokban. Az LCR számos celluláris és virális transzkripció faktor kötőhelyet tartalmaz, ezért az itt bekövetkező nukleotid cserék megváltoztathatják az E6/E7 onkogének transzkripció aktivitását és/vagy a vírus replikáció aktivitását. Más munkacsoportok korábban már vizsgálták a HPV 31 intratípusos szekvencia variánsait (Calleja-Macias és mtsai, 2004,2005; Gagnon és mtsai, 2005; Raiol és mtsai, 2009; Cornut és mtsai, 2010; Chen és mtsai, 2011; Cento és mtsai, 2011), viszont a HPV 31 természetes szekvencia variánsok szignifikáns funkcionális eltéréseit a legjobb tudásunk szerint a munkacsoportunk írta le először. Míg a korábbi tanulmányok többsége részleges LCR szekvenciákat vizsgált (Calleja-Macias és mtsai, 2004; Gagnon és mtsai, 2005; Raiol és mtsai, 2009; Cento és mtsai, 2011), egy tanulmányban elemezték HPV 31 teljes genomi szekvenciákat (Chen és mtsai, 2011), a munkacsoportunk csaknem a teljes hosszúságú LCR szakaszt tanulmányozta. A vizsgálataink során elemzett HPV 31 szekvencia variánsok polimorfizmusai összhangban vannak a korábbi tanulmányokban leírtakkal. Az általunk vizsgált HPV 31 LCR szekvenciák alapján készült filogenetikai törzsfá nagyon hasonlít a teljes genomi szekvenciákat magába foglaló filogenetikai törzsfára (Chen és mtsai, 2011), illetve a két tanulmányból származó izolátumok alapján készült törzsfá jól mutatja, hogy a világ eltérő részeiről származó izolátumok párhuzamosan klasztereződnek különböző intratípusos csoportokba.

A HPV 16 és 18 esetén az intratípusos csoportokba történő besorolás etnikai és földrajzi eredet szerint történik (Bernard és mtsai, 2006). A HPV 31 esetében korábban hasonló, földrajzi intratípusos eloszlást írtak le (Calleja-Macias és mtsai, 2004), de ezt a későbbi tanulmányok nem támasztották alá (Calleja-Macias és mtsai, 2005; Raiol és mtsai, 2009; Chen és mtsai, 2011). Kutatócsoportunk eredményei alapján sem lehet megerősíteni a HPV 31 variánsok földrajzi régiók szerinti megoszlását, ugyanis az általunk vizsgált magyarországi populációból származó HPV 31 variánsok mindhárom intratípusos csoportot (A, B, C) reprezentálták, ellentétben a korábban Magyarországon izolált HPV 16

variánsokkal, melyek túlnyomóan Európai variánsok voltak, illetve néhány Ázsiai-Amerikai variánst is azonosítottak (Veress és mtsai, 1999).

Az LCR, más néven URR (upstream regulatory region) a következő funkcionális doménekből épül fel: 5'URR domén, auxiliary enhancer domén (AE), egy epithel sejt specifikus keratinocyte enhancer domén (KE), replikációs origó és a p97 promóter (Kyo és mtsai, 1995; Kanaya és mtsai, 1997; Sen és mtsai, 2002). Az LCR kötőhelyeket tartalmaz a virális E1 és E2 proteinek számára, illetve számos celluláris transzkripció faktor számára is, mint az AP1, NF1, YY1, Sp1, TEF-1, Oct-1 és a CDP/Cut (Kanaya és mtsai, 1997; Sen és mtsai, 2002). A HPV 31 LCR variánsok szekvencia analízise során nukleotid cseréket detektáltunk mindegyik funkcionális doménban, melyek a virális E2 illetve néhány celluláris transzkripció faktor kötőhelyének a környezetében találhatóak. Ezek alapján ígéretesnek tűnt megvizsgálni a HPV 31 LCR variánsok transzkripció aktivitását transziens transzfekció kísérletekben luciferáz riporter tesztek elvégzésével.

A teljes hosszúságú LCR konstruktok funkcionális elemzése alapján arra lehetett következtetni, hogy a különböző intratípusos vonalba tartozó HPV 31 LCR variánsok transzkripció aktivitásában különbségek vannak. Az A intratípusba tartozó teljes hosszúságú referencia HPV 31 LCR alacsony aktivitást mutatott az üres, pGL2-Basic riporter vektorhoz viszonyítva a C33-A sejtekben. Ennek az lehet a magyarázata, hogy az általunk használt riporter konstruktkban a transzkripció silencer elemek ellensúlyozzák az enhancer régiók HPV 31 LCR aktivitásra kifejtett hatását. Ezen túl különböző genitális papillomavírusok esetén megfigyelték, hogy egy - a virális E1 fehérjével átfedő - konzervált silencer elem az epithel-specifikus enhancer és az E6 promóter között helyezkedik el, így a folyamatos enhancer-promóter konstruktok, melyek ezt a silencert hordozzák, alacsony transzkripció aktivitással rendelkeznek ezen HPV-k esetében (Sailaja és mtsai, 1999; O'Connor és mtsai, 2000). Mivel az LCR 5' szegmense regulálja a transzkripció terminációját, a 3' szegmense pedig a replikációs origót illetve az E6 promótert hordozza, az e régiókat érintő hatások befolyással lehetnek a transzkripció aktivitásra. A B és C intratípusba tartozó HPV 31 LCR variánsok transzkripció aktivitása szignifikánsan magasabb volt, mint a prototípus LCR aktivitás, jóllehet ezek a variánsok is hordozzák a konzervatív silencer elemet. Ezek alapján arra lehet következtetni, hogy a prototípushoz képest ezekben a variánsokban olyan nukleotid cserék találhatóak, amelyek szignifikánsan megváltoztatják a transzkripció faktorok kötődését és/vagy aktivitását.

A teljes hosszúságú LCR szakaszok transzkripció aktivitásának vizsgálati eredményei alapján deléció mutánsokat hoztunk létre a HPV 31 LCR konstruktokból, reprezentálva

mindhárom intratípust. Az, hogy mely nukleotidcserék okozzák a különböző LCR variánsok transzkripció aktivitásbeli különbségeit, igen nehéz meghatározni. Ezeket a különbségeket okozhatják részben az 5'URR régióban (nt 7122-7415) található báziscserék, másrészt azok a nukleotidcserék, amelyek a minimal promóter régióban találhatóak, ugyanis az *A* és *C* intratípusba tartozó variánsokhoz képest a *C* csoport variánsai - melyek nukleotidcseréket hordoznak e régióban - szignifikánsan ($p < 0,01$) alacsonyabb aktivitást mutattak.

Jelen vizsgálataink azt mutatják, hogy az azonos filogenetikai vonalba tartozó HPV 31 variánsok hasonló transzkripció aktivitással rendelkeznek. A teljes hosszúságú LCR variánsok funkcionális vizsgálatai alapján úgy tűnik, hogy az eltérő intratípusba tartozó variánsok transzkripció aktivitásai között szignifikáns különbségek vannak. Ezek alapján feltételezhető, hogy a HPV 31 variánsok filogenetikai klasztereződése és némely funkcionális tulajdonsága között korreláció van. Ezen eredményeket alátámasztva, korábbi kutatásokban leírták, hogy a HPV 16 és 18 esetén, az eltérő intratípusba tartozó LCR variánsok transzkripció aktivitásai között is vannak különbségek. Az ázsiai-amerikai és az észak-amerikai HPV 16 variánsok magasabb transzkripció aktivitással bírnak, mint az európai variánsok (Veress és mtsai, 1999, 2001; Kammer és mtsai, 2000). Hasonlóképpen a HPV 18 esetében is az ázsiai-amerikai variánsok magasabb transzkripció aktivitással rendelkeznek, mint az európai variánsok (Sichero és mtsai, 2005; Lopez-Saavedra és mtsai, 2009).

Sichero és munkatársai (2007), illetve Schiffman és munkatársai (2010) tanulmányai alapján a nem-európai HPV 16 és 18 variánsok fokozottabb onkogén potenciállal rendelkeznek az európai variánsokhoz viszonyítva. A HPV 31 esetében még ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre a különböző intratípusba tartozó variánsok perzisztenciáját és onkogén potenciálját illetően (Gagnon és mtsai, 2005; Schiffman és mtsai, 2010; Xi és mtsai, 2012). A HPV 31 klinikai viselkedésének tanulmányozása a viszonylag kisszámú HPV 31 pozitív eset miatt kissé nehezebb. Mindazonáltal a funkcionális különbségek, melyeket a széleskörűen használt C33-A méhnyakrákos sejt-modell rendszeren vizsgálva tapasztaltunk, arra engednek következtetni, hogy az eltérő intratípusos csoportba tartozó HPV 31 variánsok különbözően hatnak a méhnyak karcinogenezisében résztvevő egy vagy több transzkripció szabályzó mechanizmusban.

A HPV 16 és 18 esetében az intratípusos szekvencia variánsok biológiai és klinikai különbségeket mutatnak (Bernard és mtsai, 2006). A HPV 31 esetében a szekvencia variánsok funkcionális eltéréseit még kevesen tanulmányozták. Xi és munkatársai (2012, 2013, 2014) klinikai tanulmányai alapján a HPV 31 eltérő intratípusos variánsai (*A*, *B*, *C*) különböznek a perzisztáló képességük és a premalignus léziót okozó funkciójukban. Azokat a

mechanizmusokat, amelyek a klinikai különbségeket okozzák a HPV 31 esetében még mindig tanulmányozzák. Az egyik lehetséges funkció, amely felelős lehet ezekért az eltérésekért, az eltérő intratípusú HPV 31 LCR variánsok különböző transzkripciós aktivitása ugyanis az LCR szabályozza az E6 és E7 onkogének transzkripcióját, ezáltal a megváltozott LCR transzkripciós aktivitás az onkogének expresszióját is befolyásolhatja, mely hatással lehet a vírus onkogenitására is.

Egy másik lehetséges mechanizmus, amely a HPV 31 variánsok funkcionális különbségeit okozhatja azok az E6/E7 onkogéneknél bekövetkező aminosav cserék, melyek hatással lehetnek a fehérjék funkciójára. Korábbi tanulmányok szerint (Asadurian és mtsai, 2007; Stoppler és mtsai, 1996; Lichtig és mtsai, 2006; Zehbe és mtsai, 2009; Richard és mtsai, 2010; Zehbe és mtsai, 2011; Sichero és mtsai, 2012) a HPV 16 természetes variánsai különböző hatással bírnak a p53 kötése és degradációjának indukálása, a p53 transzaktiváció gátlása, immortalizáció indukálása, keratinocita differenciáció gátlása és az apoptózis befolyásolása szempontjából.

Jelen tanulmányban a HPV 31 E6 és E7 onkogének természetes variánsainak a filogenetikai és funkcionális vizsgálatát is célba vettük. A munkánk során detektált nukleotid és aminosav cserék azonosak a korábban más kutatócsoportok által publikáltakal (Gagnon és mtsai, 2005; Raiol és mtsai, 2009; Chen és mtsai, 2011; Chagas és mtsai, 2013; Liu és mtsai, 2014). Ahogyan az várható volt, a nukleotid polimorfizmus magasabb volt a nem kódoló LCR szekvenciákban, mint a fehérjét kódoló E6 és E7 régiók esetében. Összehasonlítva a HPV 31 LCR, illetve E6/E7 szekvenciák alapján készített filogenetikai törzsfákat arra a következtetésre jutottunk, hogy a genomi régiók bármelyike alkalmas arra, hogy egy HPV 31 izolátumot intratípusba (A, B, C) tudjunk sorolni.

A HPV 31 E7 variánsok funkcionális vizsgálatát azzal kezdtük, hogy teszteltük az E7-nek azt a funkcióját, mellyel a pRb-vel és járulékos fehérjével represszor komplexben lévő E2F transzkripciós faktort képes felszabadítani. Továbbá megvizsgáltuk az E7 variánsok *in vivo* retinoblasztóma fehérje degradációt indukáló képességét is. Munkánk során nem találtunk szignifikáns különbségeket a HPV 31 E7 variánsok között az elvégzett funkcionális vizsgálatok alapján. Természetesen más, celluláris vagy molekuláris funkcióikban (például különféle celluláris fehérjékhez történő kötődés, vagy a gazdasejt immortalizációjának kiváltása) lehetnek eltérések, melyek a későbbiekben további tanulmányok alapjául szolgálhatnak.

A HPV 31 E6 variánsok szekvenciáinak vizsgálata során találtunk aminosav cseréket a fehérje mind az N-terminális, mind a C-terminális cink-ujj régiójában. A HPV 31 E6-tal

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

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

Munkánk során tanulmányoztuk a különböző intratípusú HPV 31 E6 variánsok p53 proapoptotikus fehérje transzkripció transzaktivátor funkciójára kifejtett gátló hatását is. Eredményeink azt mutatják, hogy bár az E6 variánsok *in vivo* p53 degradációs aktivitásában nem volt szignifikáns eltérés, a p53 transzaktivátor funkcióját gátló hatásukban különbségeket mutattak az eltérő intratípusú variánsok. Hasonlóan a HPV 16 E6-hoz, a HPV 31 E6 prototípus, mely az A intratípusba tartozik, illetve a C intratípusba tartozó variáns (E6V2) szignifikánsan csökkentették a p53 transzkripció aktivitását, míg a B intratípus variánsai (E6V1a, E6V1b) csak mérsékelt gátló hatással rendelkeztek. A HPV 31 LCR variánsok transzkripció aktivitásának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy azok az LCR variánsok, melyek a B intratípusba tartoznak, magasabb transzkripció aktivitást mutattak, mint az A és C intratípus variánsai. Ez a jelenség egy kompenzációs mechanizmus lehet, ugyanis a papillomavírusok LCR szakasza fontos szerepet játszik a vírus génexpressziójának és replikációjának szabályozásában. Ezen funkcionális vizsgálatok eredményei nincsenek teljesen összhangban az olyan jellegű epidemiológiai vizsgálatokkal, amelyekben a HPV 31 variánsok klinikai viselkedését vizsgálták. Xi és munkatársai (2012, 2013, 2014) tanulmányai alapján az A és B intratípusokba tartozó variánsok nagyobb eséllyel okoznak premalignus elváltozásokat, mint a C csoport variánsai. Az epidemiológiai és molekuláris adatok eltérése indokoltá teszi a HPV 31 E6 és E7 fehérjék további funkcionális vizsgálatát, melyek ezen fehérjék szerteágazó molekuláris mechanizmusaira – kötődés celluláris proteinekhez (p53,

E6AP), primer keratinocita immortalizációt okozó hatás, a gazdasejt differenciációt és az apoptózist moduláló hatás - is fényt deríthetnek.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

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

SUMMARY

About one-third of human papillomavirus (HPV) types infect the anogenital tract. High-risk genital HPV types (such as HPV 16, 18, 31, 33, and 35) are linked causally to the development of cervical cancer. Nucleotide changes in the LCR and/or E6 and E7 oncogenes may lead to different transcriptional activities and/or different oncogenic potential and this may be one molecular mechanism that is responsible for the differences in the behavior of intratypic HPV variants.

The purpose of present study was to explore genetic variability and functional differences in the complete LCR and E6, E7 regions of the less studied HPV 31 natural variants isolated from Hungarian women with cervical premalignant lesions. According to the phylogenetic tree of the LCR, E6 and E7 variants three major intratypical lineages (*A*, *B*, *C*) were identified. Comparative phylogenetic analysis of the E6/E7 and the LCR region showed that nucleotide sequence variation was lower in the E6/E7 region, but either region could be used with high confidence to identify the variant lineage of an isolate. We found significant differences between the transcriptional activities of the HPV 31 LCR variants belonging to the different variant lineages. On the basis of the experiments with deletion mutants of HPV 31 LCR variants shows, that nucleotide changes, which cause the functional differences, localized at least partially in the 5' URR domain, on the other hand in the minimal promoter region.

To start the functional analysis of the HPV 31 E6 and E7 variants, we tested their effects on p53 and adenovirus E2 promoters. In addition, we also tested the ability of the E6 and E7 variants to induce the *in vivo* degradation of p53 and pRB. HPV 31 E7 variants belonging to different variant lineages were able to increase E2F transcriptional activity to the same extent as the prototype HPV 16 E7. The E6 variants had comparable abilities to induce the *in vivo* degradation of p53, there were differences between them in the ability to inhibit the trans-activation function of p53. Namely, the prototype HPV 31 E6 (belonging to variant lineage *A*), along with the variant belonging to lineage *C* was active in this function, while the variant belonging to lineage *B* showed reduced ability to inhibit the trans-activation function of p53. We found no significant differences in the *in vivo* p53 and pRb degradation activities of HPV 31 E6 and E7 variants belonging to different variant lineages. On the other hand, we recently found that HPV 31 LCR variants belonging to lineage *B* display higher transcriptional activities than variants belonging to lineage *A* or *C*.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Alp Avci, G. 2012. [Genomic organization and proteins of human papillomavirus]. *Mikrobiyol Bul*, 46 (3): 507-515.
- Armstrong, D. J. & Roman, A. 1997. The relative ability of human papillomavirus type 6 and human papillomavirus type 16 E7 proteins to transactivate E2F-responsive elements is promoter- and cell-dependent. *Virology*, 239 (1): 238-246.
- Asadurian, Y., Kurilin, H., Lichtig, H., Jackman, A., Gonen, P., Tommasino, M., Zehbe, I., & Sherman, L. 2007. Activities of human papillomavirus 16 E6 natural variants in human keratinocytes. *J Med Virol*, 79 (11): 1751-1760.
- Barbosa, M. S., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. 1989. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol*, 63 (3): 1404-1407.
- Barbosa, M. S., Edmonds, C., Fisher, C., Schiller, J. T., Lowy, D. R., & Vousden, K. H. 1990. The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *Embo j*, 9 (1): 153-160.
- Barnard, P., Payne, E., & McMillan, N. A. 2000. The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha. *Virology*, 277 (2): 411-419.
- Belleudi, F., Leone, L., Purpura, V., Cannella, F., Scrofani, C., & Torrissi, M. R. 2011. HPV16 E5 affects the KGFR/FGFR2b-mediated epithelial growth through alteration of the receptor expression, signaling and endocytic traffic. *Oncogene*, 30 (50): 4963-4976.
- Benson, J. D., Lawande, R., & Howley, P. M. 1997. Conserved interaction of the papillomavirus E2 transcriptional activator proteins with human and yeast TFIIB proteins. *J Virol*, 71 (10): 8041-8047.
- Bernard, H. U., Calleja-Macias, I. E., & Dunn, S. T. 2006. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*, 118 (5): 1071-1076.
- Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., & de Villiers, E. M. 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401 (1): 70-79.
- Berumen, J., Ordonez, R. M., Lazcano, E., Salmeron, J., Galvan, S. C., Estrada, R. A., Yunes, E., Garcia-Carranca, A., Gonzalez-Lira, G., & Madrigal-de la Campa, A. 2001. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*, 93 (17): 1325-1330.
- Boner, W., Taylor, E. R., Tsirimonaki, E., Yamane, K., Campo, M. S., & Morgan, I. M. 2002. A Functional interaction between the human papillomavirus 16

- transcription/replication factor E2 and the DNA damage response protein TopBP1. *J Biol Chem*, 277 (25): 22297-22303.
- Borbely, A. A., Murvai, M., Konya, J., Beck, Z., Gergely, L., Li, F., & Veress, G. 2006. Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. *J Gen Virol*, 87 (Pt 2): 287-294.
- Bosch, F. X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C. J., & Shah, K. V. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 55 (4): 244-265.
- Bouvard, V., Storey, A., Pim, D., & Banks, L. 1994. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *Embo j*, 13(22): 5451-5459.
- Boyer, S. N., Wazer, D. E., & Band, V. 1996. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res*, 56 (20): 4620-4624.
- Bravo, I. G. & Alonso, A. 2004. Mucosal human papillomaviruses encode four different E5 proteins whose chemistry and phylogeny correlate with malignant or benign growth. *J Virol*, 78 (24): 13613-13626.
- Calleja-Macias, I. E., Kalantari, M., Huh, J., Ortiz-Lopez, R., Rojas-Martinez, A., Gonzalez-Guerrero, J. F., Williamson, A. L., Hagmar, B., Wiley, D. J., Villarreal, L., Bernard, H. U., & Barrera-Saldana, H. A. 2004. Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology*, 319 (2): 315-323.
- Calleja-Macias, I. E., Villa, L. L., Prado, J. C., Kalantari, M., Allan, B., Williamson, A. L., Chung, L. P., Collins, R. J., Zuna, R. E., Dunn, S. T., Chu, T. Y., Cubie, H. A., Cuschieri, K., von Knebel-Doeberitz, M., Martins, C. R., Sanchez, G. I., Bosch, F. X., Munoz, N., & Bernard, H. U. 2005. Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16. *J Virol*, 79 (21): 13630-13640.
- Carrillo, E., Garrido, E., & Gariglio, P. 2004. Specific in vitro interaction between papillomavirus E2 proteins and TBP-associated factors. *Intervirology*, 47 (6): 342-349.
- Cento, V., Rahmatalla, N., Ciccozzi, M., Perno, C. F., & Ciotti, M. 2011. Intratype variations of HPV 31 and 58 in Italian women with abnormal cervical cytology. *J Med Virol*, 83 (10): 1752-1761.
- Chagas, B. S., Batista, M. V., Guimaraes, V., Balbino, V. Q., Crovella, S., & Freitas, A. C. 2011. New variants of E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus type 31 identified in Northeastern Brazil. *Gynecol Oncol*, 123 (2): 284-288.
- Chagas, B. S., Batista, M. V., Crovella, S., Gurgel, A. P., Silva Neto Jda, C., Serra, I. G., Amaral, C. M., Balbino, V. Q., Muniz, M. T., & Freitas, A. C. 2013. Novel E6 and

- E7 oncogenes variants of human papillomavirus type 31 in Brazilian women with abnormal cervical cytology. *Infect Genet Evol*, 16: 13-18.
- Chan, W. K., Klock, G., & Bernard, H. U. 1989. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J Virol*, 63 (8): 3261-3269.
- Chan, W. K., Chong, T., Bernard, H. U., & Klock, G. 1990. Transcription of the transforming genes of the oncogenic human papillomavirus-16 is stimulated by tumor promoters through AP1 binding sites. *Nucleic Acids Res*, 18 (4): 763-769.
- Chen, E. Y., Howley, P. M., Levinson, A. D., & Seeburg, P. H. 1982. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature*, 299 (5883): 529-534.
- Chen, G. & Stenlund, A. 1998. Characterization of the DNA-binding domain of the bovine papillomavirus replication initiator E1. *J Virol*, 72 (4): 2567-2576.
- Chen, J. J., Hong, Y., Rustamzadeh, E., Baleja, J. D., & Androphy, E. J. 1998. Identification of an alpha helical motif sufficient for association with papillomavirus E6. *J Biol Chem*, 273 (22): 13537-13544.
- Chen, S. L., Lin, Y. K., Li, L. Y., Tsao, Y. P., Lo, H. Y., Wang, W. B., & Tsai, T. C. 1996. E5 proteins of human papillomavirus types 11 and 16 transactivate the c-fos promoter through the NF1 binding element. *J Virol*, 70 (12): 8558-8563.
- Chen, Z., Schiffman, M., Herrero, R., Desalle, R., Anastos, K., Segondy, M., Sahasrabudhe, V. V., Gravitt, P. E., Hsing, A. W., & Burk, R. D. 2011. Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PLoS One*, 6 (5): e20183.
- Chiang, C. M., Dong, G., Broker, T. R., & Chow, L. T. 1992. Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins. *J Virol*, 66 (9): 5224-5231.
- Chin, M. T., Broker, T. R., & Chow, L. T. 1989. Identification of a novel constitutive enhancer element and an associated binding protein: implications for human papillomavirus type 11 enhancer regulation. *J Virol*, 63 (7): 2967-2976.
- Choe, J., Vaillancourt, P., Stenlund, A., & Botchan, M. 1989. Bovine papillomavirus type 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: structural and functional analysis of new viral cDNAs. *J Virol*, 63(4): 1743-1755.
- Chong, T., Chan, W. K., & Bernard, H. U. 1990. Transcriptional activation of human papillomavirus 16 by nuclear factor I, AP1, steroid receptors and a possibly novel transcription factor, PVF: a model for the composition of genital papillomavirus enhancers. *Nucleic Acids Res*, 18 (3): 465-470.
- Chong, T., Apt, D., Gloss, B., Isa, M., & Bernard, H. U. 1991. The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1,

- NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J Virol*, 65 (11): 5933-5943.
- Cid, A., Auewarakul, P., Garcia-Carranca, A., Ovseiovich, R., Gaissert, H., & Gissmann, L. 1993. Cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region in transgenic mice and its modulation by tetradecanoyl phorbol acetate and glucocorticoids. *J Virol*, 67 (11): 6742-6752.
- Clertant, P. & Seif, I. 1984. A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature*, 311(5983): 276-279.
- Cornut, G., Gagnon, S., Hankins, C., Money, D., Pourreaux, K., Franco, E. L., & Coutlee, F. 2010. Polymorphism of the capsid L1 gene of human papillomavirus types 31, 33, and 35. *J Med Virol*, 82 (7): 1168-1178.
- Cripe, T. P., Haugen, T. H., Turk, J. P., Tabatabai, F., Schmid, P. G., Dürst, M., Gissmann, L., Roman, A., & Turek, L. P. 1987. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J*, 6 (12): 3745-3753.
- Crook, T., Tidy, J. A., & Vousden, K. H. 1991. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell*, 67 (3): 547-556.
- Crusius, K., Auvinen, E., & Alonso, A. 1997. Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene*, 15 (12): 1437-1444.
- Cuthill, S., Sibbet, G. J., & Campo, M. S. 1993. Characterization of a nuclear factor, papilloma enhancer binding factor-1, that binds the long control region of human papillomavirus type 16 and contributes to enhancer activity. *Mol Carcinog*, 8 (2): 96-104.
- Danos, O., Katinka, M., & Yaniv, M. 1982. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J*, 1 (2): 231-236.
- Davy, C. & Doorbar, J. 2007. G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses. *Virology*, 368 (2): 219-226.
- Day, P. M., Roden, R. B., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. 1998. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol*, 72 (1): 142-150.
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & zur Hausen, H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324 (1): 17-27.

- del Mar Pena, L. M. & Laimins, L. A. 2001. Differentiation-dependent chromatin rearrangement coincides with activation of human papillomavirus type 31 late gene expression. *J Virol*, 75 (20): 10005-10013.
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C., & Crawford, L. 1991. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, 352 (6338): 824-827.
- Doorbar, J., Foo, C., Coleman, N., Medcalf, L., Hartley, O., Prospero, T., Naphthine, S., Sterling, J., Winter, G., & Griffin, H. 1997. Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology*, 238 (1): 40-52.
- Duensing, S., Lee, L. Y., Duensing, A., Basile, J., Piboonniyom, S., Gonzalez, S., Crum, C. P., & Munger, K. 2000. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (18): 10002-10007.
- Duensing, S. & Munger, K. 2003. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein can induce abnormal centrosome duplication through a mechanism independent of inactivation of retinoblastoma protein family members. *J Virol*, 77 (22): 12331-12335.
- Dyson, N., Howley, P. M., Munger, K., & Harlow, E. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243 (4893): 934-937.
- Dyson, N., Guida, P., Munger, K., & Harlow, E. 1992. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol*, 66 (12): 6893-6902.
- Edmonds, C. & Vousden, K. H. 1989. A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. *J Virol*, 63 (6): 2650-2656.
- Ellis, J. R., Keating, P. J., Baird, J., Hounsell, E. F., Renouf, D. V., Rowe, M., Hopkins, D., Duggan-Keen, M. F., Bartholomew, J. S., Young, L. S., & et al. 1995. The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nat Med*, 1 (5): 464-470.
- Elston, R. C., Naphthine, S., & Doorbar, J. 1998. The identification of a conserved binding motif within human papillomavirus type 16 E6 binding peptides, E6AP and E6BP. *J Gen Virol*, 79 (Pt 2): 371-374.
- Enemark, E. J. & Joshua-Tor, L. 2006. Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature*, 442 (7100): 270-275.
- Ensser, A. & Pfister, H. 1990. Epidermodysplasia verruciformis associated human papillomaviruses present a subgenus-specific organization of the regulatory genome region. *Nucleic Acids Res*, 18 (13): 3919-3922.

- Foster, S. A., Demers, G. W., Etscheid, B. G., & Galloway, D. A. 1994. The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. *J Virol*, 68 (9): 5698-5705.
- Frattini, M. G. & Laimins, L. A. 1994. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(26): 12398-12402.
- Frolov, M. V. & Dyson, N. J. 2004. Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci*, 117 (Pt 11): 2173-2181.
- Fujii, T., Brandsma, J. L., Peng, X., Srimatkandada, S., Li, L., Canaan, A., Deisseroth, A. B. 2001. High and Low Levels of Cottontail Rabbit Papillomavirus E2 Protein Generate Opposite Effects on Gene Expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (2): 867-874.
- Furth, P. A. & Baker, C. C. 1991. An element in the bovine papillomavirus late 3' untranslated region reduces polyadenylated cytoplasmic RNA levels. *J Virol*, 65 (11): 5806-5812.
- Gagnon, S., Hankins, C., Tremblay, C., Pourreaux, K., Forest, P., Rouah, F., & Coutlee, F. 2005. Polymorphism of human papillomavirus type 31 isolates infecting the genital tract of HIV-seropositive and HIV-seronegative women at risk for HIV infection. *J Med Virol*, 75 (2): 213-221.
- Garcia-Carranca, A., Thierry, F., & Yaniv, M. 1988. Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J Virol*, 62 (11): 4321-4330.
- Gewin, L., Myers, H., Kiyono, T., & Galloway, D. A. 2004. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev*, 18 (18): 2269-2282.
- Giri, I. & Yaniv, M. 1988. Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *Embo j*, 7(9): 2823-2829.
- Gloss, B., Bernard, H. U., Seedorf, K., & Klock, G. 1987. The upstream regulatory region of the human papilloma virus-16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J*, 6 (12): 3735-3743.
- Graham, S. V. 2010. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiol*, 5 (10): 1493-1506.
- Grm, H. S., Massimi, P., Gammoh, N., & Banks, L. 2005. Crosstalk between the human papillomavirus E2 transcriptional activator and the E6 oncoprotein. *Oncogene*, 24 (33): 5149-5164.

- Gu, Z. & Matlashewski, G. 1995. Effect of human papillomavirus type 16 oncogenes on MAP kinase activity. *J Virol*, 69 (12): 8051-8056.
- Hasan, U. A., Bates, E., Takeshita, F., Biliato, A., Accardi, R., Bouvard, V., Mansour, M., Vincent, I., Gissmann, L., Iftner, T., Sideri, M., Stubenrauch, F., & Tommasino, M. 2007. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol*, 178 (5): 3186-3197.
- Ho, L., Chan, S. Y., Burk, R. D., Das, B. C., Fujinaga, K., Icenogle, J. P., Kahn, T., Kiviat, N., Lancaster, W., Mavromara-Nazos, P., & et al. 1993. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol*, 67 (11): 6413-6423.
- Hoppe-Seyler, F., Butz, K., & Hausen, H. z. 1991. Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1. *J. Virology*, 65 (10): 5613-5618.
- Howie, H. L., Katzenellenbogen, R. A., & Galloway, D. A. 2009. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, 384 (2): 324-334.
- Howley, P. M. (1996) Papillomavirinae: the viruses and their replication; in Fields Virology, Third Edition, Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 2045-2076.
- Howley PM, Lowy DR. (2001). Field's Virology. Vol. 2, Knipe DM and Howley PM (eds) Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, pp. 2197-2229.
- Hubert, W. G. 2005. Variant upstream regulatory region sequences differentially regulate human papillomavirus type 16 DNA replication throughout the viral life cycle. *J Virol*, 79 (10): 5914-5922.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M., & Howley, P. M. 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *Embo j*, 10 (13): 4129-4135.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M., & Howley, P. M. 1993a. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol*, 13 (8): 4918-4927.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M., & Howley, P. M. 1993b. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol*, 13 (2): 775-784.
- Hummel, M., Hudson, J. B., & Laimins, L. A. 1992. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J Virol*, 66 (10): 6070-6080.
- Ishiji, T., Lacey, M. J., Parkkinen, S., Anderson, R. D., Haugen, T. H., Cripe, T. P., Xiao, J. H., Davidson, I., Chambon, P., & Turek, L. P. 1992. Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and

- E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *Embo j*, 11 (6): 2271-2281.
- Jackson, S., Harwood, C., Thomas, M., Banks, L., & Storey, A. 2000. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev*, 14 (23): 3065-3073.
- Kammer, C., Warthorst, U., Torrez-Martinez, N., Wheeler, C. M., & Pfister, H. 2000. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol*, 81 (Pt 8): 1975-1981.
- Kammer, C., Tommasino, M., Syrjanen, S., Delius, H., Hebling, U., Warthorst, U., Pfister, H., & Zehbe, I. 2002. Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implications for cervical disease. *Br J Cancer*, 86 (2): 269-273.
- Kanaya, T., Kyo, S., & Laimins, L. A. 1997. The 5' region of the human papillomavirus type 31 upstream regulatory region acts as an enhancer which augments viral early expression through the action of YY1. *Virology*, 237 (1): 159-169.
- Kell, B., Jewers, R. J., Cason, J., Pakarian, F., Kaye, J. N., & Best, J. M. 1994. Detection of E5 oncoprotein in human papillomavirus type 16-positive cervical scrapes using antibodies raised to synthetic peptides. *J Gen Virol*, 75 (Pt 9): 2451-2456.
- Kennedy, I. M., Haddow, J. K., & Clements, J. B. 1991. A negative regulatory element in the human papillomavirus type 16 genome acts at the level of late mRNA stability. *J Virol*, 65 (4): 2093-2097.
- Kim, K., Garner-Hamrick, P. A., Fisher, C., Lee, D., & Lambert, P. F. 2003. Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J Virol*, 77 (23): 12450-12459.
- Klingelhutz, A. J., Foster, S. A., & McDougall, J. K. 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, 380 (6569): 79-82.
- Konya, J., Veress, G., Juhasz, A., Szarka, K., Sapy, T., Hernadi, Z., & Gergely, L. 2000. Additional human papillomavirus types detected by the hybrid capture tube test among samples from women with cytological and colposcopic atypia. *J Clin Microbiol*, 38 (1): 408-411.
- Kovanda, A., Kocjan, B. J., Luzar, B., Bravo, I. G., & Poljak, M. 2011. Characterization of Novel Cutaneous Human Papillomavirus Genotypes HPV-150 and HPV-151, *PLoS One*, vol. 6.
- Krawczyk, E., Supryniewicz, F. A., Liu, X., Dai, Y., Hartmann, D. P., Hanover, J., & Schlegel, R. 2008. Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *Am J Pathol*, 173 (3): 682-688.

- Kuballa, P., Matentzoglou, K., & Scheffner, M. 2007. The role of the ubiquitin ligase E6-AP in human papillomavirus E6-mediated degradation of PDZ domain-containing proteins. *J Biol Chem*, 282 (1): 65-71.
- Kuhne, C. & Banks, L. 1998. E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box. *J Biol Chem*, 273 (51): 34302-34309.
- Kumar, A., Zhao, Y., Meng, G., Zeng, M., Srinivasan, S., Delmolino, L. M., Gao, Q., Dimri, G., Weber, G. F., Wazer, D. E., Band, H., & Band, V. 2002. Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Mol Cell Biol*, 22 (16): 5801-5812.
- Kyo, S., Inoue, M., Nishio, Y., Nakanishi, K., Akira, S., Inoue, H., Yutsudo, M., Tanizawa, O., & Hakura, A. 1993. NF-IL6 represses early gene expression of human papillomavirus type 16 through binding to the noncoding region. *J Virol*, 67 (2): 1058-1066.
- Kyo, S., Tam, A., & Laimins, L. A. 1995. Transcriptional activity of human papillomavirus type 31b enhancer is regulated through synergistic interaction of AP1 with two novel cellular factors. *Virology*, 211 (1): 184-197.
- Lechner, M. S. & Laimins, L. A. 1994. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol*, 68 (7): 4262-4273.
- Lee, T. C., Shi, Y., & Schwartz, R. J. 1992. Displacement of BrdUrd-induced YY1 by serum response factor activates skeletal alpha-actin transcription in embryonic myoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (20): 9814-9818.
- Li, H., Zhan, T., Li, C., Liu, M., & Wang, Q. K. 2009. Repression of MHC class I transcription by HPV16E7 through interaction with a putative RXRbeta motif and NF-kappaB cytoplasmic sequestration. *Biochem Biophys Res Commun*, 388 (2): 383-388.
- Li, N., Franceschi, S., Howell-Jones, R., Snijders, P. J., & Clifford, G. M. 2011. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*, 128 (4): 927-935.
- Li, X. & Coffino, P. 1996. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol*, 70 (7): 4509-4516.
- Lichtig, H., Algrisi, M., Botzer, L. E., Abadi, T., Verbitzky, Y., Jackman, A., Tommasino, M., Zehbe, I., & Sherman, L. 2006. HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6. *Virology*, 350 (1): 216-227.
- Liu, M., He, Z., Xi, L., Li, J., Liu, F., Liu, Y., Pan, Y., Ning, T., Guo, C., Xu, R., Zhang, L., Cai, H., & Ke, Y. 2014. The distribution and common amino acid polymorphisms of

- human papillomavirus (HPV)-31 variants in 2700 women from Northern China. *PLoS One*, 9 (6): e99141.
- Londesborough, P., Ho, L., Terry, G., Cuzick, J., Wheeler, C., & Singer, A. 1996. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer*, 69(5): 364-368.
- Lopez-Saavedra, A., Gonzalez-Maya, L., Ponce-de-Leon, S., Garcia-Carranca, A., Mohar, A., & Lizano, M. 2009. Functional implication of sequence variation in the long control region and E2 gene among human papillomavirus type 18 variants. *Arch Virol*, 154 (5): 747-754.
- Lorincz, A. T., Lancaster, W. D., & Temple, G. F. 1986. Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J Virol*, 58 (1): 225-229.
- Luscher-Firzloff, J. M., Westendorf, J. M., Zwicker, J., Burkhardt, H., Henriksson, M., Muller, R., Pirolet, F., & Luscher, B. 1999. Interaction of the fork head domain transcription factor MPP2 with the human papilloma virus 16 E7 protein: enhancement of transformation and transactivation. *Oncogene*, 18 (41): 5620-5630.
- Maglennon, G. A., McIntosh, P., & Doorbar, J. 2011. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology*, 414 (2): 153-163.
- Mantovani, F. & Banks, L. 2001. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*, 20 (54): 7874-7887.
- Matlashewski, G., Schneider, J., Banks, L., Jones, N., Murray, A., & Crawford, L. 1987. Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. *Embo j*, 6 (6): 1741-1746.
- McIntyre, M. C., Frattini, M. G., Grossman, S. R., & Laimins, L. A. 1993. Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J Virol*, 67 (6): 3142-3150.
- McLaughlin-Drubin, M. E. & Munger, K. 2009. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*, 384 (2): 335-344.
- Mesplede, T., Gagnon, D., Bergeron-Labrecque, F., Azar, I., Senechal, H., Coutlee, F., & Archambault, J. 2012. p53 degradation activity, expression, and subcellular localization of E6 proteins from 29 human papillomavirus genotypes. *J Virol*, 86 (1): 94-107.
- Milligan, S. G., Veerapraditsin, T., Ahamet, B., Mole, S., & Graham, S. V. 2007. Analysis of novel human papillomavirus type 16 late mRNAs in differentiated W12 cervical epithelial cells, *Virology*, vol. 360: 172-181.

- Mittal, K. R., Chan, W., & Demopoulos, R. I. 1990. Sensitivity and specificity of various morphological features of cervical condylomas. An in situ hybridization study. *Arch Pathol Lab Med*, 114 (10): 1038-1041.
- Mohr, I. J., Clark, R., Sun, S., Androphy, E. J., MacPherson, P., & Botchan, M. R. 1990. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science*, 250(4988): 1694-1699.
- Morin, G., Fradet-Turcotte, A., Di Lello, P., Bergeron-Labrecque, F., Omichinski, J. G., & Archambault, J. 2011. A conserved amphipathic helix in the N-terminal regulatory region of the papillomavirus E1 helicase is required for efficient viral DNA replication. *J Virol*, 85 (11): 5287-5300.
- Muller, C., Alunni-Fabbroni, M., Kowenz-Leutz, E., Mo, X., Tommasino, M., & Leutz, A. 1999. Separation of C/EBPalpha-mediated proliferation arrest and differentiation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (13): 7276-7281.
- Muller, M., Gissmann, L., Cristiano, R. J., Sun, X. Y., Frazer, I. H., Jenson, A. B., Alonso, A., Zentgraf, H., & Zhou, J. 1995. Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J Virol*, 69 (2): 948-954.
- Munger, K., Werness, B. A., Dyson, N., Phelps, W. C., Harlow, E., & Howley, P. M. 1989. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *Embo j*, 8 (13): 4099-4105.
- Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., Snijders, P. J., & Meijer, C. J. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348 (6): 518-527.
- Murray-Zmijewski, F., Slee, E. A., & Lu, X. 2008. A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (9): 702-712.
- Nakahara, T., Peh, W. L., Doorbar, J., Lee, D., & Lambert, P. F. 2005. Human Papillomavirus Type 16 E1/E4 Contributes to Multiple Facets of the Papillomavirus Life Cycle, *J Virol*, vol. 79: 13150-13165.
- O'Connor, M. & Bernard, H. U. 1995. Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NFI at a conserved composite regulatory element. *Virology*, 207 (1): 77-88.
- O'Connor, M. J., Stunkel, W., Koh, C. H., Zimmermann, H., & Bernard, H. U. 2000. The differentiation-specific factor CDP/Cut represses transcription and replication of human papillomaviruses through a conserved silencing element. *J Virol*, 74 (1): 401-410.
- O'Connor M, Chan S-Y, Bernard H-U. Transcription factor binding sites in the long control region of genital HPVs. In: Myers G, Bernard H-U, Delius H, Baker C, Icenogel J, Halpern A, Wheeler C, eds. Human papillomaviruses 1995—a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory, 1995. **III**- 21–40.

- Ozbun, M. A. & Meyers, C. 1997. Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J Virol*, 71 (7): 5161-5172.
- Ozbun, M. A. & Meyers, C. 1998. Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. *J Virol*, 72 (4): 2715-2722.
- Pan, H. & Griep, A. E. 1995. Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development. *Genes Dev*, 9 (17): 2157-2169.
- Park, J. S., Hwang, E. S., Lee, C. J., Kim, C. J., Rha, J. G., Kim, S. J., Namkoong, S. E., & Um, S. J. 1999. Mutational and functional analysis of HPV-16 URR derived from Korean cervical neoplasia. *Gynecol Oncol*, 74 (1): 23-29.
- Park, J. S., Kim, E. J., Kwon, H. J., Hwang, E. S., Namkoong, S. E., & Um, S. J. 2000. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem*, 275 (10): 6764-6769.
- Patel, D., Huang, S. M., Baglia, L. A., & McCance, D. J. 1999. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *Embo j*, 18 (18): 5061-5072.
- Peh, W. L., Middleton, K., Christensen, N., Nicholls, P., Egawa, K., Sotlar, K., Brandsma, J., Percival, A., Lewis, J., Liu, W. J., & Doorbar, J. 2002. Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. *J Virol*, 76 (20): 10401-10416.
- Peh, W. L., Brandsma, J. L., Christensen, N. D., Cladel, N. M., Wu, X., & Doorbar, J. 2004. The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle in vivo. *J Virol*, 78 (4): 2142-2151.
- Phelps, W. C., Yee, C. L., Munger, K., & Howley, P. M. 1988. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell*, 53 (4): 539-547.
- Phelps, W. C., Munger, K., Yee, C. L., Barnes, J. A., & Howley, P. M. 1992. Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol*, 66 (4): 2418-2427.
- Pfister, H. and Fuchs P. G. (1994) Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirol* 37, 143-149.
- Pfister, H. 1984. Biology and biochemistry of papillomaviruses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 99: 111-181.
- Prasad, C. J., Sheets, E., Selig, A. M., McArthur, M. C., & Crum, C. P. 1993. The binucleate squamous cell: histologic spectrum and relationship to low-grade squamous intraepithelial lesions. *Mod Pathol*, 6 (3): 313-317.

- Raiol, T., Wyant, P. S., de Amorim, R. M., Cerqueira, D. M., Milanezi, N., Brigido Mde, M., Sichero, L., & Martins, C. R. 2009. Genetic variability and phylogeny of the high-risk HPV-31, -33, -35, -52, and -58 in central Brazil. *J Med Virol*, 81 (4): 685-692.
- Rank, N. M. & Lambert, P. F. 1995. Bovine papillomavirus type 1 E2 transcriptional regulators directly bind two cellular transcription factors, TFIID and TFIIB. *J Virol*, 69 (10): 6323-6334.
- Richard, C., Lanner, C., Naryzhny, S. N., Sherman, L., Lee, H., Lambert, P. F., & Zehbe, I. 2010. The immortalizing and transforming ability of two common human papillomavirus 16 E6 variants with different prevalences in cervical cancer. *Oncogene*, 29 (23): 3435-3445.
- Roden, R. B., Kirnbauer, R., Jenson, A. B., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. 1994. Interaction of papillomaviruses with the cell surface. *J Virol*, 68 (11): 7260-7266.
- Romanczuk, H., Thierry, F., & Howley, P. M. 1990. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J Virol*, 64 (6): 2849-2859.
- Ronco, L. V., Karpova, A. Y., Vidal, M., & Howley, P. M. 1998. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev*, 12 (13): 2061-2072.
- Rose, B., Steger, G., Dong, X. P., Thompson, C., Cossart, Y., Tattersall, M., & Pfister, H. 1998. Point mutations in SP1 motifs in the upstream regulatory region of human papillomavirus type 18 isolates from cervical cancers increase promoter activity. *J Gen Virol*, 79 (Pt 7): 1659-1663.
- Rosenstjerne, M. W., Vinther, J., Hansen, C. N., Prydsoe, M., & Norrild, B. 2003. Identification and characterization of a cluster of transcription start sites located in the E6 ORF of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol*, 84 (Pt 11): 2909-2920.
- Russell, J. & Botchan, M. R. 1995. cis-Acting components of human papillomavirus (HPV) DNA replication: linker substitution analysis of the HPV type 11 origin. *J Virol*, 69 (2): 651-660.
- Sailaja, G., Watts, R. M., & Bernard, H. U. 1999. Many different papillomaviruses have low transcriptional activity in spite of strong epithelial specific enhancers. *J Gen Virol*, 80 (Pt 7): 1715-1724.
- Sanders, C. M. & Stenlund, A. 2000. Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex. *J Biol Chem*, 275(5): 3522-3534.
- Sarafi T. R.; McBride A.A. 1995. Domains of the BPV-1 E1 Replication Protein Required for Origin-Specific DNA Binding and Interaction with the E2 Transactivator. *Virology*, 211 (2): 385-396.

- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., & Howley, P. M. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63 (6): 1129-1136.
- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., & Howley, P. M. 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, 75 (3): 495-505.
- Schiffman, M., Herrero, R., Desalle, R., Hildesheim, A., Wacholder, S., Rodriguez, A. C., Bratti, M. C., Sherman, M. E., Morales, J., Guillen, D., Alfaro, M., Hutchinson, M., Wright, T. C., Solomon, D., Chen, Z., Schussler, J., Castle, P. E., & Burk, R. D. 2005. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*, 337 (1): 76-84.
- Schiffman, M., Rodriguez, A. C., Chen, Z., Wacholder, S., Herrero, R., Hildesheim, A., Desalle, R., Befano, B., Yu, K., Safaeian, M., Sherman, M. E., Morales, J., Guillen, D., Alfaro, M., Hutchinson, M., Solomon, D., Castle, P. E., & Burk, R. D. 2010. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res*, 70 (8): 3159-3169.
- Sen, E., Bromberg-White, J. L., & Meyers, C. 2002. Genetic Analysis of cis Regulatory Elements within the 5' Region of the Human Papillomavirus Type 31 Upstream Regulatory Region during Different Stages of the Viral Life Cycle. *J Virol*, 76 (10): 4798-4809.
- Sichero, L., Franco, E. L., & Villa, L. L. 2005. Different P105 promoter activities among natural variants of human papillomavirus type 18. *J Infect Dis*, 191 (5): 739-742.
- Sichero, L., Ferreira, S., Trottier, H., Duarte-Franco, E., Ferenczy, A., Franco, E. L., & Villa, L. L. 2007. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int J Cancer*, 120 (8): 1763-1768.
- Sichero, L., Sobrinho, J. S., & Villa, L. L. 2012. Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants. *Virology*, 432 (1): 127-132.
- Spalholz, B. A., Yang, Y. C., & Howley, P. M. 1985. Transactivation of a bovine papilloma virus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. *Cell*, 42 (1): 183-191.
- Steller, M. A., Zou, Z., Schiller, J. T., & Baserga, R. 1996. Transformation by human papillomavirus 16 E6 and E7: role of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Cancer Res*, 56 (21): 5087-5091.
- Stoler, M. H., Rhodes, C. R., Whitbeck, A., Wolinsky, S. M., Chow, L. T., & Broker, T. R. 1992. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol*, 23 (2): 117-128.
- Stoppler, M. C., Ching, K., Stoppler, H., Clancy, K., Schlegel, R., & Icenogle, J. 1996. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their

- abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol*, 70 (10): 6987-6993.
- Sun, Y., Han, H., & McCance, D. J. 1998. Active domains of human papillomavirus type 11 E1 protein for origin replication. *J Gen Virol*, 79 (Pt 7): 1651-1658.
- Sverdrup, F. & Khan, S. A. 1995. Two E2 binding sites alone are sufficient to function as the minimal origin of replication of human papillomavirus type 18 DNA. *J Virol*, 69 (2): 1319-1323.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 28 (10): 2731-2739.
- Thain, A., Jenkins, O., Clarke, A. R., & Gaston, K. 1996. CpG methylation directly inhibits binding of the human papillomavirus type 16 E2 protein to specific DNA sequences. *J Virol*, 70(10): 7233-7235.
- Thierry, F. & Yaniv, M. 1987. The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *Embo j*, 6(11): 3391-3397.
- Thomas, M. & Banks, L. 1998. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene*, 17 (23): 2943-2954.
- Thomas, M. & Banks, L. 1999. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol*, 80 (Pt 6): 1513-1517.
- Thorner, L. K., Lim, D. A., & Botchan, M. R. 1993. DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects. *J Virol*, 67 (10): 6000-6014.
- Ustav, M., Ustav, E., Szymanski, P., & Stenlund, A. 1991. Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *Embo j*, 10 (13): 4321-4329.
- Vande Pol, S. B. & Klingelutz, A. J. 2013. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*, 445 (1-2): 115-137.
- Varma, H. & Conrad, S. E. 2000. Reversal of an antiestrogen-mediated cell cycle arrest of MCF-7 cells by viral tumor antigens requires the retinoblastoma protein-binding domain. *Oncogene*, 19 (41): 4746-4753.
- Veress, G., Szarka, K., Dong, X. P., Gergely, L., & Pfister, H. 1999. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol*, 80 (Pt 4): 1035-1043.
- Veress, G., Murvai, M., Szarka, K., Juhasz, A., Konya, J., & Gergely, L. 2001. Transcriptional activity of human papillomavirus type 16 variants having deletions in the long control region. *Eur J Cancer*, 37 (15): 1946-1952.

- Walker, J., Smiley, L. C., Ingram, D., & Roman, A. 2011. Expression of human papillomavirus type 16 E7 is sufficient to significantly increase expression of angiogenic factors but is not sufficient to induce endothelial cell migration. *Virology*, 410 (2): 283-290.
- White, P. W., Pelletier, A., Brault, K., Titolo, S., Welchner, E., Thauvette, L., Fazekas, M., Cordingley, M. G., & Archambault, J. 2001. Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain. *J Biol Chem*, 276 (25): 22426-22438.
- Wilson, R., Fehrmann, F., & Laimins, L. A. 2005. Role of the E1--E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol*, 79(11): 6732-6740.
- Xi, L. F., Kiviat, N. B., Hildesheim, A., Galloway, D. A., Wheeler, C. M., Ho, J., & Koutsky, L. A. 2006. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *J Natl Cancer Inst*, 98 (15): 1045-1052.
- Xi, L. F., Schiffman, M., Koutsky, L. A., Hulbert, A., Lee, S. K., Defilippis, V., Shen, Z., & Kiviat, N. B. 2012. Association of human papillomavirus type 31 variants with risk of cervical intraepithelial neoplasia grades 2-3. *Int J Cancer*, 131 (10): 2300-2307.
- Xi, L. F., Schiffman, M., Koutsky, L. A., He, Z., Winer, R. L., Hulbert, A., Lee, S. K., Ke, Y., & Kiviat, N. B. 2013. Persistence of newly detected human papillomavirus type 31 infection, stratified by variant lineage. *Int J Cancer*, 132 (3): 549-555.
- Xi, L. F., Schiffman, M., Koutsky, L. A., Hughes, J. P., Winer, R. L., Mao, C., Hulbert, A., Lee, S. K., Shen, Z., & Kiviat, N. B. 2014. Lineages of oncogenic human papillomavirus types other than type 16 and 18 and risk for cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*, 106 (10).
- Zehbe, I., Richard, C., DeCarlo, C. A., Shai, A., Lambert, P. F., Lichtig, H., Tommasino, M., & Sherman, L. 2009. Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology*, 383 (1): 69-77.
- Zehbe, I., Lichtig, H., Westerback, A., Lambert, P. F., Tommasino, M., & Sherman, L. 2011. Rare human papillomavirus 16 E6 variants reveal significant oncogenic potential. *Mol Cancer*, 10: 77.
- Zimmermann, H., Koh, C. H., Degenkolbe, R., O'Connor, M. J., Muller, A., Steger, G., Chen, J. J., Lui, Y., Androphy, E., & Bernard, H. U. 2000. Interaction with CBP/p300 enables the bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP/p300-mediated transactivation by p53. *J Gen Virol*, 81 (Pt 11): 2617-2623.
- zur Hausen, H. 1996. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*, 1288 (2): F55-78.
- zur Hausen, H., & de Villiers, E. M. 1994. Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol*, 48: 427-447.

11. TÁRGYSZAVAK

Magyar nyelvű tárgyszavak:

Humán papillomavírus 31, LCR, E6, E7, szekvencia heterogenitás, transzkripció aktivitás, variánsok, funkcionális vizsgálat

Angol nyelvű tárgyszavak:

Human papillomavirus type 31, LCR, E6, E7, sequence heterogeneity, transcriptional activity, variants, functional analysis

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Veress Györgynek, hogy munkám során kiemelkedő szakmai tudásával mindvégig támogatott, értékes gyakorlati és elméleti tanácsokkal látott el.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Kónya József egyetemi docensnek és Gergely Lajos professzor úrnak, az Orvosi Mikrobiológiai Intézet jelenlegi és korábbi vezetőjének, akik lehetővé tették számomra, hogy az intézetben végezhessem kutatómunkámat.

Köszönöm kollégáimnak, Oraveczné Dr. Gyöngyösi Eszternek, Dr. Szalmás Anitának, Dr. Antalné Dr. László Brigittának és Dr. Csoma Eszternek, valamint az Orvosi Mikrobiológiai Intézet minden munkatársának önzetlen segítségüket.

Köszönettel tartozom a Richter Gedeon Talentum Alapítványnak, hogy támogatták a PhD munkásságomat.

Munkámat a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 azonosító számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg. Kutatásainkat a TÁMOP 4.2.1./B-09//KONV-2010-0007 projekt támogatta, mely az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg. A kutatást az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA K81422) támogatta.

13. FÜGGELÉK

13.1 A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár által hitelesített publikációs lista.



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További közlemények

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





4. Gall-Debreceni, A., Lázár, J., Kádas, J., Balogh, A., **Ferenczi, A.**, Sós, E., Takács, L., Kurucz, I.: Specific detection and quantitation of bovine IgG in bioreactor derived mouse mAb preparations.
J. Immunol. Methods. [Epub ahead of print], 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2016.08.005>
IF: 1.858 (2015)
5. Gyöngyösi, E., Szalmás, A., **Ferenczi, A.**, Póliska, S., Kónya, J., Veress, G.: Transcriptional regulation of genes involved in keratinocyte differentiation by human papillomavirus 16 oncoproteins.
Arch. Virol. 160 (2), 389-398, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-014-2305-y>
IF: 2.255
6. Szalmás, A., Gyöngyösi, E., **Ferenczi, A.**, László, B., Karosi, T., Csomor, P., Gergely, L., Veress, G., Kónya, J.: Activation of Src, Fyn and Yes non-receptor tyrosine kinases in keratinocytes expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 oncoprotein.
Viol. J. 10 (1), 79, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-10-79>
IF: 2.089
7. Gyöngyösi, E., Szalmás, A., **Ferenczi, A.**, Kónya, J., Gergely, L., Veress, G.: Effects of human papillomavirus (HPV) type 16 oncoproteins on the expression of involucrin in human keratinocytes.
Viol. J. 9, 36, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-9-36>
IF: 2.092

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,387

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

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, 2016.09.21.

