

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Rekurrens légúti papillomatosiss a humán papillomavírus-11

fertőzés tükrében

Gáll Tamás

Témavezető: Dr. Szarka Krisztina



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2013.

TARTALOM

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
BEVEZETÉS	8
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
A papillomavírusok rendszertani és morfológiai jellemzése.....	9
A HPV-ok klasszifikációja	10
A HPV-11 genetikai diverzitása	12
A vírusgenom felépítése, a genom által kódolt fehérjék funkciója	12
E1 fehérje	13
E2 fehérje	13
E6 fehérje	14
E7 fehérje	15
E1E4 fehérje.....	15
E5 fehérje	15
Hosszú szabályozó régió (long control region, LCR).....	16
HPV LCR metiláció	17
L1/L2 fehérje	17
A vírusgenom fizikai állapota.....	18
A HPV-ok életciklusa	18
HPV vakcinák.....	19
Rekurrens légúti papillomatózis	20
Epidemiológia	20
Virologiai háttér	21
Transzmisszió	21
Patogenezis és tünettan	22
Diagnózis	24
Terápia	24
Adjuváns kezelés	24

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	32
Betegek	32
A kísérletes munka során felhasznált vegyszerek, reagensek, pufferek	33
Vegyszerek.....	33
Pufferek	33
Tápoldatok	34
Módszerek	34
DNS izolálás, a DNS integritásának ellenőrzése.....	34
HPV DNS kimutatás és HPV tipizálás	35
HPV-11 szekvenciák genomi régióinak amplifikációja	36
Egyszálú konformációs polimorfizmus (single strand conformational polymorphism, SSCP) analízis	38
Szekvenálás	39
Metilációs analízis	40
Plazmidok	41
Irányított mutagenézis	43
Sejtkultúrák, tranziens transzfecció és luciferáz teszt	44
Szekvenca analízis.....	44
EREDMÉNYEK	47
HPV koinfekciók vizsgálata különböző agresszivitású papillomatózisokból származó mintákban	47
A különböző agresszivitású papillomatózisokból származó HPV-11 szekvenciák teljes genom analízise	47
Filogenetikai vizsgálatok.....	52
A különböző agresszivitású elváltozásokból származó HPV-11 szekvenciák transzaktiváló potenciáljának vizsgálata.....	56
Irányított mutagenézis	57
Humán papillomavírus koinfekciók vizsgálata a CDV kezelt beteg sorozatmintáiban	58
HPV-11 szekvenciák teljes genom analízise a CDV kezelés előtt, a kezelés virológiai szempontból sikeres és sikertelen szakasza során	59
A CDV kezelésen átesett beteg sorozatmintáiból származó szekvenciák LCR-ének metilációs analízise.....	59

MEGBESZÉLÉS.....	61
A különböző agresszivitású elváltozásokból származó HPV-11 szekvenciák protein kódoló régióinak szekvencia analízise.....	61
A különböző agresszivitású elváltozásokból származó HPV-11 szekvenciák szabályozó (LCR) régiójának szekvencia analízise	62
A vizsgált HPV-11 szekvenciák filogenetikai analízise.....	64
HPV-11 variáns analízis a CDV kezelés során	65
HPV-11 teljes genom- és LCR metilációs analízis a CDV kezelés során.....	66
ÖSSZEFOGLALÁS.....	69
SUMMARY	71
IRODALOMJEGYZÉK.....	72
Hivatkozott közlemények jegyzéke.....	72
Saját közlemények jegyzéke.....	91
TÁRGYSZAVAK.....	94
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	95
FÜGGELÉK.....	96

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

(C)	Komplementer DNS szál
(AS)	Antiszenz szálhoz illeszkedő primer
(S)	Szenz szálhoz illeszkedő primer
°C	Celsius-fok
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromól
AgNO ₃	Ezüst-nitrát
AP-1	Activator protein-1
AO-RRP	Felnőttkori rekurrens légúti papillomatózis (adult-onset recurrent respiratory papillomatosis)
Asp	Aszparaginsav
ATP	Adenozin-5'-trifoszfát
BPV	Szarvasmarha papillomavírus (bovine papillomavirus)
Brd4	Bromodomén-4 fehérje
CBP	CREB-kötő fehérje (CREB-binding protein)
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Járványügyi és Betegségmegelőzési Központ)
Cdk2	Ciklin-dependens kináz 2
CDP	CCAAT displacement protein
CDV	Cidofovir
CIP1	Ciklin-dependens kináz inhibitor 1A
CO ₂	Szén-dioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DNS	Deoxiribonukleinsav

dNTP	Deoxiribonukleotid-foszfát
E. coli	Escherichia coli
E2BS	E2 fehérje kötőhely (E2 binding site)
E6AP	E6-asszociált fehérje (E3 ubiquitin ligáz)
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
EGF	Epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
EGF-R	Epidermalis növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor)
FasL	Fas ligand
FCS	Magzati borjúsavó (foetal calf serum)
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
g	Gramm
Gly	Glicin
GPS2	G protein útvonal szupressor 2
HPV	Human papillomavírus
I3K	Indol-3-karbinol
ICTV	Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses)
IFN	Interferon
JO-RRP	Fiatalkori rekurrens légúti papillomatózis (juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis)
kb	Kilobázis
kg	Kilogramm
KTP	Kálium-titánium-foszfát
L	Liter
LB	Luria-Bertani
LCR	Hosszú szabályozó régió (long control region)
M	Mól
MCM7	Mini-chromosome maintenance protein
mg	Milligramm

MgCl ₂	Magnézium-klorid
mL	Milliliter
mm	Milliméter
mM	Millimól
NaOH	Nátrium-hidroxid
NFI	Nuclear factor-1
NAP-1	Nucleosome assembly protein 1
ng	Nanogramm
nm	Nanométer
ONPG	Ortho-nitrofenil-β-galaktozid
ORF	Nyitott olvasási keret (open reading frame)
PCAF	P300/CBP-asszociált faktor
PCR	Polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PDGF	Vérlemezke eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor)
PEG	Polietilén-glikol
pRb	Retinoblasztóma fehérje
RNáz	Ribonukleáz
rpm	Fordulatszám (revolutions per minute)
RRP	Rekurrens légúti papillomatózis (recurrent respiratory papillomatosis)
RSV	Respiratory syncitial virus
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát
SNP	Egyedi nukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)
Sp1	Specificity factor 1
SSCP	Egyszálú konformációs polimorfizmus (single strand conformational polymorphism)
TBP	TATA-kötő fehérje (TATA-binding protein)
TE	Tris-EDTA
TEF-1	Transcriptional enhancer factor-1
TFIIB	Transzkripciós faktor IIB

TFIID	Transzkripciós faktor IID
TNE	Tris-NaCl-EDTA
TopBP1	DNA topoisomeráz 2-kötő protein 1 (Topoisomerase binding protein-1)
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TSS	Transzformálás és Tároló Oldat (Transformation and Storage Solution)
U	Unit (egység)
μL	Mikroliter
UV	Ultraibolya
V	Volt
VLP	Vírusszerű partikulumokat (Virus-like particle)
YY1	Yin-yang-1

BEVEZETÉS

A rekurrens légúti papillomatózis (recurrent respiratory papillomatosis, RRP) a felső légutakat (elsősorban a gégét) érintő benignus elváltozás, mely gyermek- és felnőttkorban egyaránt kialakulhat. A betegség a légutakra lokalizálódó, szoliter- vagy multiplex papillomák megjelenésével jellemezhető, melyek hátterében elsősorban az alacsony onkogén kockázatú human papillomavírus (HPV) típusok, elsősorban a HPV-6 és -11 állnak. Jóllehet az RRP benignus elváltozás, kórlefolyása nehezen megjósolható (Steinberg és DiLorenzo, 1996); gyermekekben igen agresszív, életet veszélyeztető kórlefolyást mutathat a gyakori recidívák illetve az alsó légutakra és a nyelőcsőre terjedés következtében (Derkey és Wiatrak, 2008). Az elváltozás viszonylag alacsony incidenciája (1,8/100 000 felnőttek, 4,3/100 000 gyermekek esetén) ellenére jelentős emocionális- és gazdasági terhet jelent a társadalomra (Wiatrak és mtsai., 2004).

A vírusok - köztük a HPV-ok - genetikai variabilitásának vizsgálata kulcsfontosságú lehet az adott elváltozás prognózisa, kórlefolyása és kezelése szempontjából. A HPV-ok esetén ilyen adatok elsősorban a magas onkogén kockázatú HPV típusok esetén állnak rendelkezésre, ahol az elváltozás agresszivitása egyértelműen kapcsolatba hozható az adott HPV típus variánsaival, illetve a HPV genomban detektálható nukleotid polimorfizmusokkal (Berumen és mtsai., 2001; Hildesheim és mtsai., 2001; Xi és mtsai., 1997; Xin és mtsai., 2001; Yamada és mtsai., 1997; Veress és mtsai., 1999; Villa és mtsai., 2000).

A magas onkogén kockázatú HPV típusokkal ellentétben az alacsony onkogén kockázatú típusok esetén a patogénitással, kórlefolyással és az antivirális szerekkel szembeni rezisztenciával összefüggésbe hozható nukleotid polimorfizmusokra vonatkozó adatok meglehetősen hiányosak még az olyan, alacsony onkogén kockázatú HPV típusokkal egyértelműen kapcsolatba hozható kórképek, mint az RRP, esetén is. Az RRP patogenezise, kórlefolyása, prognózisa, ill. az adott kezelésre adott terápiás válasz szempontjából hasznos lehet az agresszivitással és antivirális rezisztenciával kapcsolatba hozható mutációk, nukleotid polimorfizmusok feltárása, valamint az eltérő anatómiai régiókból, ill. eltérő agresszivitású HPV szekvenciák filogenetikai viszonyainak vizsgálata.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A papillomavírusok rendszertani és morfológiai jellemzése

A klasszikus rendszertani besorolás szerint a papillomavírusokat a polyomavírusokkal együtt - a *Papovaviridae* családba sorolták. A „papovavírus” kifejezés a „papillomavírus”, „polyomavírus” és a „majmok vakuolizáló vírusa” (simian vacuolating virus) elnevezések két-két betűjéből alkotott mozaikszó (Howley és Lowy, 2001). A család közös jellemzői voltak (1) a kis méret, (2) a burok nélküli, ikozahedrális kapszid, (3) a duplaszálú, cirkuláris DNS, valamint (4) a magban történő genom replikáció. A *Papovaviridae* család tagjai közötti jelentős szerkezeti (a kapszid átmérője, a vírusgenom mérete) és genetikai (a virális nukleinsav mérete, a nyitott olvasási keretek száma, a transzkripció iránya) eltérések azonban indokoltá tették az egységes *Papovaviridae* család átértelmezését, melynek eredményeként a papillomavírusokat a Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) javaslatára az önálló *Papillomaviridae* családba sorolták (de Villiers és mtsai., 2004). Az ICTV azonban csak a nemzetségbe (genus) és fajba (species) történő besorolás feltételeit határozza meg, faj alatti kategóriák felállítására nem határoz meg irányelveket (ICTV, 2002 http://ictvdb.bio-mirror.cn/ictv/fs_papil.htm).

A papillomavírusokat a gazdaszervezet szempontjából kifejezett fajspecifitás jellemzi, amely elnevezésükben is megjelenik, például humán papillomavírus (HPV), bovine /szarvasmarha/ papillomavírus (BPV). Fajspecifitásuk mellett a papillomavírusok kifejezett sejttropizmussal jellemezhetőek, produktív fertőzést a bőr és nyálkahártyák többrétegű laphámjában hoznak létre (Howley és Lowy, 2001).

Napjainkig mintegy 150 különböző HPV típust azonosítottak, amelyek közül mintegy 40 típus elsősorban az anogenitális traktus nyálkahártyákat fertőzi (de Villiers 2004). A *kután* HPV típusok (pl. HPV-1) az elszarusodó laphámot, míg a *nyálkahártya-asszociált típusok* (pl. HPV-11, HPV-18, etc.) elsősorban a mukozális, el nem szarusodó laphámot fertőzik. A nyálkahártya-asszociált típusok onkogénitásuk alapján tovább csoportosíthatók magas („high risk”) és alacsony („low risk”) onkogén kockázatú típusokra (de Villiers, 2001). Alacsony onkogén kockázatú típusok közé tartozik a HPV-6 és a HPV-11, amelyek elsősorban benignus, alacsony fokú diszpláziát mutató elváltozásokban fordulnak elő (Ko és Chu, 2004). A magas onkogén kockázatú típusok (pl. HPV-16, HPV-18) a magas fokú diszpláziával és malignus elváltozásokkal való összefüggése jól ismert (Shah és Howley, 1996). A HPV-ok

onkogén kockázata szerinti csoportosítását az **1. táblázat** foglalja össze (Muñoz és mtsai., 2003).

1. táblázat: A HPV típusok epidemiológiai alapon történő csoportosítása. Muñoz és mtsai., 2003 alapján

Onkogén kockázat	HPV típus
Alacsony	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81
Potenciálisan magas	26, 53, 66
Magas	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82

A HPV-ok klasszifikációja

A HPV-ok klasszifikációja jelenleg az 1995-ös International Papillomavirus Workshop (Quebec) döntése alapján a legkonzervatívabbnak bizonyult HPV ORF, az L1 alapján történik. Korábban nem azonosított **HPV típusként** fogadják el azt az izolátumot, melynek genomja sikeresen klónozásra került, valamint az L1 ORF szekvenciája legalább 10%-ban eltér a legközelebbi papillomavírus genomjától. 2-10%-os L1 szekvencia különbség esetén **szubtypusról**, míg 2%-nál kisebb szekvencia eltérés esetén **variánsról** beszélünk (de Villiers és mtsai., 2004).

A karakterizált HPV típusok mintegy 90%-a az α -, β - és a γ genusok valamelyikébe sorolható, míg az egyéb papillomavírus genusokba főként zoopatogén típusok sorolhatóak. A humánpatogén α -, β - és a γ papillomavírus genusokról a **2. táblázat** nyújt rövid áttekintést.

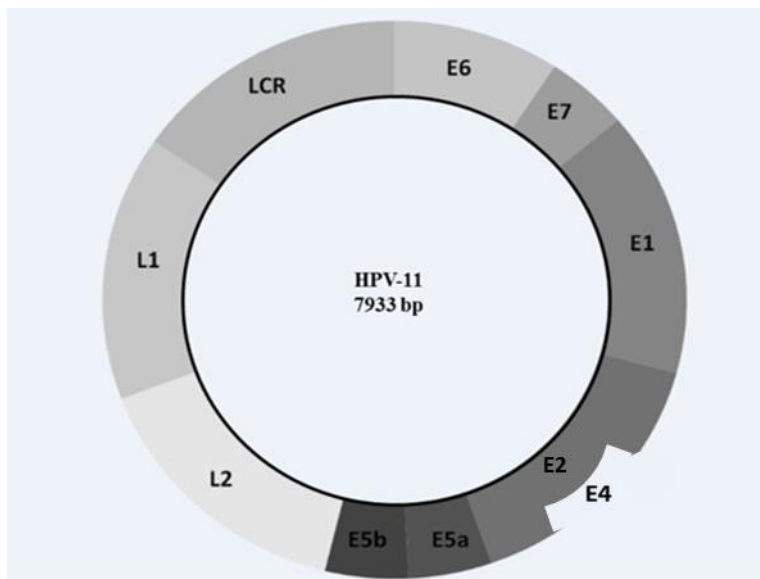
2. táblázat. Az α -, β - és a γ papillomavírus genusok összefoglalása, a reprezentatív speciések felsorolása. de Villiers és mtsai (2004) alapján

Genus	Típus species	Egyéb speciések	Megjegyzés	
α -papillomavírus	HPV-18	HPV 39	Nyálkahártya léziók, magas onkogén kockázat	
		HPV 45		
		HPV 59		
		HPV 68		
		HPV 70		
	HPV 16	HPV 31	Nyálkahártya léziók, magas onkogén kockázat	
		HPV 33		
		HPV 35		
		HPV 52		
		HPV 58		
	HPV 6	HPV 11	Benignus nyálkahártya léziók, alacsony onkogén kockázat, malignizáció ritka	
		HPV 13		
		HPV 44		
	β -papillomavírus	HPV 5	HPV 8	Főként kután léziók, benignus elváltozások, epidermodysplasia verruciformis; immunhiányos állapotban esetenként malignus léziók
			HPV 12	
		HPV 14		
		HPV 19		
		HPV 20		
		HPV 21		
γ -papillomavírus	HPV 48		Kután léziók	
	HPV 4	HPV 65	Kután léziók	
	HPV 50		Kután léziók	

A HPV-11 genetikai diverzitása

A magas onkogén kockázatú α -HPV típusok genetikai diverzitásának vizsgálata a papillomavírus kutatás egyik fontos területe, az egyes genomi variánsok pedig fokozott onkogén potenciállal rendelkezhetnek (Pista és mtsai., 2007; Tornesello és mtsai., 2011; Xi és mtsai 1997, 2002; Xin és mtsai., 2001; Villa és mtsai., 2000). Az alacsony onkogén kockázatú HPV típusok, így a HPV-11, genetikai diverzitásának vizsgálata a HPV kutatás egyik kevésbé tanulmányozott területe, a Burk és mtsai., valamint Maver és mtsai. által vizsgált szlovén HPV-11 szekvenciákon kívül (a jelen tanulmányban szereplő 6 szekvencia mellett) pusztán 6 teljes HPV-11 található a Génbank adatbázisában (Dartmann és mtsai., 1986; Chansaenroj és mtsai., 2012; Wu és mtsai., 2009; Yuan és mtsai., 2012). Az alacsony onkogén kockázatú HPV típusok esetén a genetikai diverzitás és az esetleges eltérő onkogenitás illetve patogenitásközötti kapcsolat még tisztázásra vár.

A vírusgenom felépítése, a genom által kódolt fehérjék funkciója



1. ábra: A HPV-11 genom szerveződése.

E6: 102-554; E7: 530-826; E1: 832-2781; E2: 2723-3826; E4: 3255-3681; E5A: 3871-4146; E5B: 4146-4370; L2: 4417-5784; L1: 5771-7276; LCR: 7277-102; TATA box: 66-71. A számok az adott genomi régió nukleotid pozícióját jelzik.

fehérjéit kódoló ~3 kb méretű késői (late, L), illetve a vírus replikációs origóját, valamint virális- és celluláris transzkripció faktorok kötőhelyeit tartalmazó hosszú szabályozó régióra (long control region, LCR). A papillomavírusok korai régiója által kódolt fehérjék az E6, E7, E1, E2, E1E4 és E5, míg a késői régió az L1 és L2 kapszid fehérjéket kódolja (Howley és mtsai., 2001). Az **1. ábrán** a HPV-11 genom szerveződése látható

A papillomavírusok morfológiai sajátosságai a következők: kettőszálú, körülbelül 8 kilobázis (kb) méretű DNS genom, 52-55 nm átmérőjű, ikozahedrális, burok nélküli kapszid.

A papillomavírusok genomja három részre osztható: egy, a vírus életciklusának korai szakaszában szerepet játszó fehérjéket kódoló, ~4 kb méretű korai (early, E), a víruskapszid

E1 fehérje

A mintegy 600 aminosavból álló, DNS-függő ATPáz és helikáz aktivitással rendelkező E1 fehérje jól konzervált a különböző HPV típusok esetén; szükséges mind a virális DNS szintézis iniciációjában, mind pedig annak elongációjában (Bream és mtsai., 1993). A virális E2 proteinnel történő interakciója mellett számos celluláris fehérjével is kölcsönhatásba lép. A celluláris DNS polimeráz α -primáz p180 alegységével történő kölcsönhatásának eredményeként feltehetően szerepe van a sejt DNS replikációs komplexének a vírus replikációs origójához történő kötődésében, amely kulcsfontosságú szerepet játszik a HPV replikációjában, mivel a papillomavírusok nem rendelkeznek saját DNS-polimerázzal. Szintén említést érdemel az E1 fehérje hiszton H1-gyel, a humán topoizomeráz I-gyel és ciklin E/Ciklin-dependens kináz 2-vel (Cdk2) történő kölcsönhatása is, utóbbi szintén fontos szerepet kap a PV genom sejtciklus-függő replikációjában (Clower és mtsai., 2006; Cueille és mtsai., 1998). Összefoglalva, az E1 fehérje esszenciális szerepet tölt be a vírusreplikáció iniciációjában és elongációjában (Liu és mtsai., 1995).

E2 fehérje

A 350-400 aminosavból álló E2 fehérje meglehetősen jól konzervált papillomavírusok között (Giri és Yaniv, 1988; Harris és Botchan, 1999). Az E2 fehérje két doménből áll, melyek közül az amino-terminális domén a transzaktivációban és az E1 fehérje-kötésében, míg a karboxi-terminális domén az E2 homodimerizációjában és szekvencia-specifikus DNS kötésében játszik szerepet (Abbate és mtsai., 2004; Chin és mtsai., 1988; Haugen és mtsai., 1988; Giri és Yaniv, 1988; McBride és mtsai., 1991; Spalholz és mtsai., 1985). Az amino-terminális és karboxi-terminális domént egy kevésbé konzervált, úgynevezett „hinge” régió választja el (Giri és Yaniv, 1988; McBride és mtsai., 1991). Az E2 protein a virális LCR-re lokalizálódó specifikus E2 kötőhelyeken keresztül fontos szerepet játszik a HPV E6/E7 onkogének transzkripciójának szabályozásában, illetve az E1 fehérjével való kölcsönhatásán keresztül a vírus DNS E1-függő replikációjában és a HPV genom fenntartásában (Abbate és mtsai., 2004; Howley és Lowy, 2007).

A papillomavírusok *in vivo* replikációjuk során mind az E1, mind E2 fehérje jelenlétét igénylik (Chiang és mtsai., 1992). Az E2 fehérje onkogén expresszióra kifejtett hatását elsősorban a magas onkogén kockázatú papillomavírusok esetén tanulmányozták. A genitális papillomavírusok esetén az LCR-ben négy E2 kötőhelyet (E2-binding site, E2BS) azonosítottak (Romanczuk és mtsai., 1990). Az E2 fehérje alacsony koncentrációban

transzaktivátorként növeli az E6/E7 onkogének expresszióját, míg magasabb koncentrációban épp ellenkezőleg, represszorként hat (Bouvard és mtsai., 1994). Az egyes E2 kötőhelyek lokalizációjuktól függően különböző affinitással kötik az E2 fehérjét, illetve eltérő mértékben represszálják/transzaktiválják a promótereket. A promóter-proximálisan elhelyezkedő E2BS1 és E2BS2, amelyek átfednek az Sp1 and TFIID transzkripciós faktorok kötőhelyeivel, közepes affinással kötik az E2 fehérjét és fontos szerepet játszanak a promóter repressziójában (Tan és mtsai., 1994). Az E3BS szintén a represszióban jut szerephez, míg az E2BS4 transzaktiváló hatással bír az E2BS1, 2 és 3 hiánya esetén (Romanczuk és mtsai., 1990; Thierry és Howley, 1991). A virális genom és az E1 fehérje mellett az E2 protein számos más celluláris transzkripciós faktorról is kölcsönhatásba lép, mint például a Transcription factor IIB /TFIIB/ (Benson és mtsai., 1997; Rank és mtsai., 1995; Yao és mtsai., 1998), a Transcription Factor Binding Protein /TBP/ és a Transcription factor IID /TFIID/ (Carillo és mtsai., 2004; Enzenauer és mtsai., 1998; Rank és mtsai., 1995; Steger és mtsai., 1995), a Creb Binding Protein /CBP/ (Lee és mtsai., 2000; Müller és mtsai., 2002), a Nucleosome Assembly Protein 1 /NAP-1/ (Rehtanz és mtsai., 2004), P/CAF (Lee és mtsai., 2002), és a DNA-topoisomerase Binding Protein 1 /TopBP1/ (Boner és mtsai., 2002). Napjaink papillomavírus kutatásának intenzív területe az E2 Brd4 (Bromodomain 4 Protein) fehérjével történő kölcsönhatása, melynek szerepe lehet az E2 transzaktiváló és represszor funkciójában (Schweiger és mtsai., 2006; Senechal és mtsai., 2007; Wu és mtsai., 2006).

E6 fehérje

A papillomavírusok E6 és E7 géntermékei olyan fehérjék, melyek a sejtproliferáció szabályozásának szempontjából kulcsfontossággal bíró tumorszuppresszorok inaktivációját indukálják (Dyson és mtsai., 1989; Münger és mtsai., 1989; Scheffner és mtsai., 1990; Werness és mtsai., 1990). A magas onkogén kockázatú HPV típusok E6 fehérjéje ubiquitin-függő proteolízis útján a tumorszuppresszor p53 fehérje mennyiségének gyors csökkenését indítja el, valamint számos más celluláris fehérjével is kölcsönhatásba lép (Scheffner és mtsai., 1990; Tungteakkhun és Duerksen-Hughes, 2008). A magas onkogén kockázatú HPV típusok E6 fehérjéje által kiváltott p53 degradáció az E6, a celluláris E3 ubiquitin ligáz (E6AP) és a p53 interakcióját igényli (Huibregtse és mtsai., 1991; Huibregtse és mtsai., 1993a; Huibregtse és mtsai., 1993b; Werness és mtsai., 1990). Brimer és munkatársai kimutatták, hogy *in vivo* a HPV-11 E6 fehérjéje, hasonlóan HPV-16 E6 proteinhez, képes az E6AP-hez kötődni (Brimer és mtsai., 2007). A magas onkogén kockázatú HPV típusok E6 fehérjéje képes a human telomerase reverse transcriptase /hTERT/

promóter aktivációjára (Van Doorslaer és Burk, 2012). Az alacsony onkogén kockázatú HPV típusok E6 fehérjéje szerepet játszik a genom fenntartásában, illetve több celluláris fehérjével is kölcsönhatásba lép, mint például a zyxin, G protein útvonal szuppressor 2 (GPS2), Bak és a Minichromosome maintenance protein 7 /MCM7/ (Oh és mtsai., 2004; Degenhardt és Silverstein 2001a és 2001b; Kuhne és Banks, 1998; Kukimoto és mtsai., 1998; Thomas és Banks, 1999). Ezen kölcsönhatások jelentőségének vizsgálata még tisztázásra vár.

E7 fehérje

A papillomavírusok E7 onkogénjének fő célpontja a celluláris retinoblasztóma fehérje (pRb). A pRb hipofoszforilált formában az E2F celluláris transzkripciós aktivációs faktorokkal képez komplexet, gátolva a sejtciklus G1-S fázis átmenetet. A pRb ciklin dependens kinázok által történő foszforilációja következtében a pRB-E2F faktorok komplexe disszociál, az így felszabaduló E2F faktorok aktivátorként működve elősegítik a G1-S fázis átmenetet. A magas onkogén kockázatú HPV típusok E7 proteinje a G1 fázis specifikus pRb-E2F komplexhez kötődik, elősegítve a pRb proteoszóma-mediált lebontását és az S-fázisba történő átlépést (Boyer és mtsai., 1996; Huh és mtsai., 2007). Az alacsony onkogén kockázatú HPV típusok E7 proteinje is képes a pRb kötésére, de a magas onkogén kockázatú típusokhoz képest jelentősen kisebb affinitással (Gage és mtsai., 1990; Munger és mtsai., 1989). Az alacsony és magas onkogén kockázatú HPV típusok E7 proteinjének pRb iránti affinitásában megfigyelhető különbség egyetlen aminosav eltérésre vezethető vissza (Asp21 a HPV-16 E7 proteinben, míg Gly22 a HPV-6 E7-ben) (Heck és mtsai., 1992; Sang és mtsai., 1992).

E1E4 fehérje

Az E4 protein HPV életciklusában betöltött szerepe részletesen még nem ismert. Irodalmi adatok szerint részt vesz a sejt citokeratin hálózatának összeomlásában és segítheti az újonnan képződött virionok lefűződését (Doorbar és mtsai., 1991; Roberts és mtsai., 1993; Rogel-Gaillard és mtsai., 1993).

E5 fehérje

A HPV-ok E5 fehérjéi kisméretű, elsősorban az endoplazmatikus retikulumra lokalizálódó, membrán-asszociált hidrofób fehérjék, amelyeknek a HPV fertőzések patogenezisében betöltött szerepéről - más HPV fehérjékhez képest - kevés információ áll rendelkezésre (Conrad és mtsai., 1993 és 1994; Crusius és mtsai., 1998). Az E5 protein transzformáló hatásának lehetősége elsőként a bovin papillomavírus-1 (BPV-1) kapcsán

merült fel, ugyanis a BPV-1 E5 fehérjéje képes a thrombocytá eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor, PDGF) β receptorának aktivációjára és egér eredetű sejtek transzformálására (Petti és mtsai., 1991).

Az E5 fehérje transzformációban és onkogenezisben játszott potenciális szerepét több közlemény eredményei is alátámasztják (Chen és mtsai., 1990 és 1996; Leptak és mtsai., 1991; Tsao és mtsai 1994 és 1995). A HPV-6 E5 proteinje képes kötődni az epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor, EGF) és az erbB2 receptorokhoz, az EGF receptor kináz inhibitorok pedig a növekedés gátlását és sejt differenciálódást eredményeznek HPV-16 fertőzött keratinocitákban (Ben-Bassat és mtsai., 1997). Az EGF receptorok - más receptor tirozin-kinázokkal együtt - különféle protoonkogének, mint például a c-jun és c-fos expressziójának szabályozásában vesznek részt. A HPV E5 fehérje és különböző celluláris protoonkogének lehetséges kapcsolatáról mind HPV-11, mind HPV-16 kapcsán beszámoltak (Chen és mtsai., 1995 és 1996).

A HPV-11 és HPV-16 E5 proteinje gátolja a p21/CIP1 expresszióját fibroblasztokban és keratinocitákban, ill. a HPV-16 esetén TRAIL és FasL-mediált apoptózist (Tsao és mtsai., 1996; Kabsch és Alonso., 2002).

További érv az E5 fehérje onkogenitása mellett, hogy E5 transzgenikus egerekben tartós ösztrogén-kezelést követően cervix karcinóma alakult ki (Maufort és mtsai., 2010).

Hosszú szabályozó régió (long control region, LCR)

A papillomavírusok hosszú szabályozó régiója (long control region, LCR) a vírusgenom olyan része, amely nem kódol fehérjéket, viszont nagyszámú cisz-válaszadó elemek keresztül fontos szerepet tölt be a papillomavírusok replikációjának és génexpressziójának szabályozásában. Az LCR a különböző papillomavírusok esetén a genom 8-11%-át teszi ki, körülbelül 850 bp hosszú és az L1 valamint az E6 ORF-ek között helyezkedik el. Az LCR-ben négy, valamennyi PV-ra jellemző szekvencia ismerhető fel: (1) a késői mRNS-ek poliadenilációs szignálja az LCR 5' végén, (2) a virális E2 fehérje kötőhelyek, melyek száma eltérő lehet az egyes papillomavírusok között, (3) az E1 protein kötőhelye, illetve (4) az E6 gén promóterének TATA box-a (O'Connor és mtsai., 1995).

A virális E1 és E2 fehérjék vírus replikációban és transzkripcióban betöltött szerepe fentebb került ismertetésre. Az LCR-hez a virális fehérjéken túl számos celluláris fehérje is kötődik, mint például az activator protein-1 (AP-1) (Kikuchi és mtsai., 1996; Thierry és

mtsai., 1992), a transcriptional enhancer factor-1 (TEF-1) (Ishiji és mtsai., 1992), a nuclear factor I (NFI) (Apt és mtsai., 1993), a CDP/cut protein (O'Connor és mtsai., 2000), a Yin-yang-1 (YY1) protein (O'Connor és mtsai., 1996), az octamer binding protein-1 (oct-1) (Chong és mtsai., 1991; Hoppe-Seyler 1991). A felsoroltakon kívül az LCR számos egyéb transzkripciós faktort is köt, ezek tárgyalása azonban messzemenően meghaladja ezen értekezés kereteit. A celluláris transzkripciós faktorok szerepét a HPV génextpressziójának szabályozásában több tanulmány is összefoglalja (Hoppe-Seyler és Butz, 1994; O'Connor és mtsai., 1995).

A papillomavírusok génextpressziójának szabályozásában celluláris- és virális faktorok egyaránt fontos szerepet játszanak, ami igen bonyolult szabályozási rendszert sejtet.

HPV LCR metiláció

A HPV-ok LCR-ére lokalizálódó konszenzus E2 fehérje kötőhelyek szekvenciájukból (5'-ACCG(N)4CGGT-3) adódóan magukban hordozzák a CpG szigetek metilációjával történő epigenetikai szabályozás lehetőségét. Thain és mtsai. megfigyelése szerint az E2 kötőhelyek *in vitro* metilációja gátolja az E2 fehérje kapcsolódását (Thain és mtsai., 1996). Az E2 kötőhelyek metilációja tehát szerepet játszhat a regulatórikus funkciójú E2 protein kötődésének és ezáltal a virális E6/E7 onkogének expressziójának szabályozásában (Kim és mtsai., 2003).

A HPV-16 metilációs mintázatát vizsgáló klinikai tanulmányok eredményei ellentmondásosak; egyes szerzők a karcinogenezis során az LCR progresszív hipometilációját, míg mások épp ellenkezőleg, progresszív hipermetilációját írták le (Badal és mtsai., 2003; Bhattacharjee és Sengupta, 2006; Ding és mtsai., 2009; Fernandez és mtsai., 2009; Kalantari és mtsai., 2004; Piyathilake és mtsai., 2011; Xi és mtsai., 2011). A közelmúltban megjelent tanulmányok rávilágítottak, hogy az LCR metilációja igen komplex folyamat, mely függ a fertőzött hámsejtek differenciálódásától, a vírusgenom fizikai állapotától (episzómális-, egy- vagy több integrálódott kópiában jelenlévő HPV genom) és a sejtben lejátszódó epigenetikai folyamatoktól (Chaiwongkot és mtsai., 2012; Vinokurova és mtsai., 2011).

L1/L2 fehérje

A HPV-ok kapszidjának felépítésében két fehérje vesz részt, az L1 fő kapszid protein és az L2 minor fehérje, melyek arányáról megoszlanak a vélemények. A kapszid felépítésében

mintegy 360 L1 protein vesz részt, amelyhez egyes szerzők szerint 12, mások szerint pedig 30, 36 vagy 72 L2 protein kapcsolódik (Buck és mtsai., 2008; Trus és mtsai., 2005; Yang és mtsai., 2003). Egy kapszomer felépítésében öt L1 fehérje és egy, az általuk képzett váz közepébe illeszkedő L2 protein vesz részt (Buck és mtsai., 2008).

A HPV kapszid fehérjék fontos szerepet kapnak a HPV fertőzés prevencióját célzó oltóanyagok fejlesztése során is (Stanley, 2010). A néhány évvel ezelőtt megjelenő HPV oltóanyagok is úgynevezett L1 vírus-szerű partikulumokat (virus-like particule, VLP) tartalmaznak, melyek hatékonynak bizonyultak a vakcinában található HPV típusok által okozott perzisztens HPV fertőzések és az ezekkel összefüggésbe hozható elváltozások megelőzésében (Lu és mtsai., 2011)

A vírusgenom fizikai állapota

A HPV-ok a fertőzött sejtekben alapvetően kétféle fizikai állapotban fordulhatnak elő: *episzómálishan* és a gazdasejt DNS-ébe *integrálódott* formában. Az episzómális forma általában a benignus elváltozások és enyhe diszpláziák esetén figyelhető meg. Súlyos diszpláziák és invazív karcinómák esetén a vírusgenom rendszerint felhasad és a gazdasejt genomjába integrálódva fordul elő (Lowy és Howley, 2001). A vírusgenom felhasadása általában az E1 és E2 fehérjét kódoló régióban történik, ami ezen szabályozó fehérjék funkcióvesztéséhez és az E6/E7 onkogének kontrollálatlan expressziójához vezet (Baker és mtsai., 1987; Jeon és mtsai., 1995; Schwarz és mtsai., 1985). Az integráció helye a gazdasejt genomjában nem specifikus, ugyanakkor bizonyos protoonkogének (junB, c-myc) közelébe történő integrálódás azok fokozott expressziójához vezethet (Dürst és mtsai., 1987; Lin és mtsai., 1995).

A HPV-ok életciklusa

A HPV-ok életciklusa a hámsejtek differenciálódásával szoros összefüggésben megy végbe. A hámszövet fiziológias működése során a bazálisan elhelyezkedő sejtek osztódását követően az egyik utódsejt a bazális sejtrétegben marad, ahol megőrzi osztódóképességét, biztosítva ezzel a további hámsejtek képződését, míg a másik utódsejt a hámfelszín felé haladva differenciálódni kezd; ezen folyamat során génexpressziós mintázata megváltozik, elveszti osztódóképességét és apoptózison megy keresztül. A bazális sejtek HPV virionokkal történő fertőződése feltehetően a hám mikrosérülésein keresztül történik. A fertőződést követően a virion dekapzidálódik, a HPV DNS pedig a sejtmagba transzlokálódik, ahol

episzómálisan, sejtenként megközelítően 100 kópiában van jelen (Moody és Laimins, 2010). Sejttenyészeteken végzett kísérletek alapján megállapítható, hogy a HPV genom episzómális fenntartásában az E1, E2, E6 és E7 fehérjék egyaránt szerepet játszanak (Frattini és Laimins, 1994; Frattini és mtsai., 1996; Park és Androphy, 2002; Sedman és Stenlund, 1995; Stubenrauch és mtsai., 1998; Thomas és mtsai., 1998). A fertőzést követő, kis kópiaszámban történő genom amplifikációs szakaszt követően a HPV életciklusának úgynevezett fenntartó (maintenance) szakasza következik, ahol a vírusreplikáció a sejtciklussal szinkron zajlik. A vírusreplikáció kulcsfontosságú lépése a HPV genomok utódsejtekbe történő átjutása, amelyet a virális E2 fehérje biztosít (McBride és mtsai., 2006).

A papillomavírusok a produktív vírusreplikációhoz a gazdasejt replikációs rendszerét igénylik, a terminális differenciáció során viszont a hámsejtek kilépnek a sejtciklusból és befejezik az osztódásukat. A differenciálódó hámsejtek replikációjának fenntartása és immortalizációja az E6/E7 onkogének expressziója következtében valósul meg (Münger és mtsai., 1989; 2004). A hám magasabb rétegeiben bekövetkezik a vírus késői promóterének aktivációja, amely a virális fehérjék - elsősorban az E1, E2, E1E4 és E5 - fokozott expresszióját eredményezi, így a vírus kópiaszáma a sejtenkénti 50-200-ról több ezerre nő (Bedell és mtsai., 1991; Hummel és mtsai., 1992; Middleton és mtsai., 2003; Ozbun és Meyers., 1997 és 1998; Peh és mtsai., 2002; Ruesch és Laimins, 1998). A differenciálódás során a késői vírusfunkciók aktiválásában az E1E4 és E5 proteinek is szerepet játszanak (Peh és mtsai., 2004; Wilson és mtsai., 2005). A vírusreplikáció lezárásaként a hám felső rétegében bekövetkezik az L1 és L2 kapszidfehérjék expressziója és a vírusgenom enkapszidációja, amelyet az L2 és L1 fehérjék interakciója segít elő, amit a vírus partikulumok hámfelszínen történő felszabadulása követ (Buck és mtsai., 2005).

HPV vakcinák

A HPV fertőzések megelőzésére jelenleg két profilaktikus oltóanyag áll a rendelkezésre, mindkettő HPV L1 vírusszerű partikulumokat (virus-like particles; VLP) tartalmaz. A kvadriavalens vakcina *Saccharomyces cerevisiae*-ben termelt HPV-6, -11, -16 és -18, míg a bivalens oltóanyag rovarsejtekben (*Trichoplusia ni* HI-5) előállított HPV-16 és -18 VLP-t tartalmaz. Átfogó klinikai tanulmányok adatai szerint mindkét oltóanyag hatékonynak bizonyult a vakcina törzsek által okozott HPV fertőzések csökkentésében és az ezekkel összefüggésbe hozható elváltozások megelőzésében (Garland és mtsai., 2007; Lu és mtsai., 2011; Paavonen és mtsai., 2009). A vakcina törzsekkel szembeni immunitás időtartamát

jelenleg is tanulmányozzák, az eddigi vizsgálati eredmények alapján a neutralizáló ellenanyagok évekig (5-6 év) biztosan kimutathatóak a komplett oltási procedúrában résztvevők esetén (GlaxoSmithKline Vaccine HPV-007 Study Group 2009; Romanowski, 2011; Villa és mtsai., 2006). Az oltóanyagok bizonyos védelmet jelenthetnek a nem vakcina törzsekkel szemben is (Malagón és mtsai., 2012). A kvadrivalens oltóanyag által indukált anyai ellenanyagok a placentán átjutva hatásosak lehetnek a rekurrens légúti papillomatózis (recurrent respiratory papillomatosis, RRP) megelőzésében (Matys és mtsai., 2012). A kvadrivalens HPV vakcina RRP-ben terápiás céllal történő, sikeres felhasználásáról is rendelkezünk irodalmi adattal (Mudry és mtsai., 2011).

Rekurrens légúti papillomatózis

Az RRP virális etiológiájú, gyermekekben és felnőttekben is előforduló, krónikus megbetegedés. Jóllehet az RRP egy benignus elváltozás, gyermekekben igen agresszív, életet veszélyeztető kórlefolyást mutathat a gyakori recidívák és aerodigestív terjedés következtében (Derkay és Wiatrak, 2008).

Epidemiológia

Az RRP etiológiai ágensei a HPV-ok, elsősorban a HPV-6 és HPV-11, melyek a légutak el nem szarusodó hámjának benignus proliferációjához vezetnek (Bennett és Powell, 1987; Mounts és mtsai., 1982). Az RRP gyermekekben a gége leggyakoribb benignus tumora és gyermekkori rekedtség második leggyakoribb oka (Morgan és Zitch, 1986).

Noha az RRP egy benignus, leggyakrabban a géget érintő elváltozás, kórlefolyása nehezen megíjósolható a gyakori recidívák, aerodigestív terjedés és malignus traszformáció miatt (Steinberg és DiLorenzo, 1996).

Az RRP gyakorlatilag bármely életkorban kialakulhat, a legfiatalabb RRP-vel diagnosztizált beteg 1 napos, míg a legidősebb 84 éves volt (Derkay CS, 1995). Koreloszlás alapján az RRP-nek két formája ismert, a gyermekkorban megjelenő, agresszívebb *fiatalkori RRP* (juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis, JO-RRP), ill. a felnőttkorban megjelenő *felnőttkori RRP* (adult-onset recurrent respiratory papillomatosis, AO-RRP).

Jóllehet agresszív RRP felnőttkorban is megjelenhet, a fiatal korban diagnosztizált elváltozások általában agresszívebbek. A csecsemőkorban megjelenő tünetek rosszabb prognózist jelentenek, jelentősebb morbiditással és mortalitással, illetve nagyobb az esetleges

tracheosztóma alkalmazásának valószínűsége és az alsó légúti terjedés kockázata is (Reeves és mtsai., 2003; Ruparelia és mtsai., 2003). Az elváltozások 3 éves kor előtt történő megjelenése esetén 3,6-szor nagyobb a valószínűsége annak, hogy évente több mint négy sebészi kimetszésre van szükség, ill. 2-szer nagyobb a valószínűsége, hogy a papillomatózis két vagy több anatómiai lokalizációra terjed ki, mint 3 éves kor után megjelenő tünetek esetén, tehát az első tünetek megjelenése, az életkor és a betegség agresszivitása között összefüggés mutatható ki (Derkay CS, 1995). Hasonló korelációt mutat a papillomatózis progressziója is, ugyanis a fiatalabb korban megjelenő elváltozásokra inkább jellemző a betegség progressziója a később diagnosztizált RRP-hez képest (Wiatrak és mtsai., 2004). JO-RRP-ben az papillomatózis diagnosztizálása az esetek 75%-ában 5 éves kor előtt történik (Cohn és mtsai., 1981).

Virologiai háttér

Már az 1990-es években leírták, hogy az RRP etiológiai ágensei a HPV-ok. A molekuláris vizsgálatok eredményeként megállapították, hogy csaknem minden légúti papilloma HPV-DNS pozitív. Az RRP-ben leggyakrabban kimutatható HPV típusok a HPV-6 és HPV-11, melyek a genitális condylomák több mint 90%-ában is jelen vannak. Irodalmi adatok szerint a HPV-11 okozta fertőzés agresszívebb és nagyobb kockázatot jelent a tracheosztóma alkalmazására (Rimell és mtsai., 1997; Wiatrak és mtsai., 2004).

Az RRP kóroki hátterében feltehetően a keratinociták érésének gátlása áll, amely a papillomavírusok fentebb ismertetett életciklusával hozható összefüggésbe. Megjegyzendő, hogy HPV-DNS a remisszióban lévő RRP-s betegek nyálkahártyájában is kimutatható, amely a későbbi recidívák forrása lehet (Smith és mtsai., 1993; Steinberg, és mtsai., 1983).

Az RRP patogenezisében feltehetően fontos szerepet játszik az E5 protein, ugyanis laryngeális papilloma sejtekben fokozott EGFR expressziót, valamint az EGFR-hez kapcsolódó szignálút vonalak aktivációját írták le (Johnston és mtsai., 1999; Vambutas és mtsai., 1993). Az E5 fehérje és az EGFR közötti kapcsolatot fentebb került tárgyalásra.

Transzmisszió

Az RRP-t okozó papillomavírusok rezervoárja elsősorban az anogenitális régió, a HPV fertőzés pedig egyike a leggyakoribb szexuális úton terjedő virális fertőzéseknek. Koutsky és munkatársai a genitális HPV fertőzések magas prevalenciájáról számolnak be a 15-49 év közötti populációban az Egyesült Államokban (Koutsky és mtsai., 1988). Az

Egyesült Királyságban 2005-ben a diagnosztizált genitális szemölcsök száma meghaladta a 81000-et (HPA 2006). Az Amerikai Egyesült Államok Betegségmegelőzési és Járványügyi Központjának (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) becslései szerint a szexuálisan aktív nők mintegy 80%-a átesik HPV fertőzésen 50 éves koráig (Centers for Disease Control and Prevention, Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines 2002).

A HPV transzmissziója JO-RRP és AO-RRP esetén eltérő módon valósul meg. JO-RRP esetén a HPV infekció feltehetően születéskor történik, a magzat szülőúton történő áthaladása során. Ezt a vertikális úton történő fertőződést számos érv támasztja alá (1) 6 héttel a születése után a JO-RRP-ben szenvedő gyerekek buccális és az anyák genitális keneteiből ugyanazon HPV típusokat mutatták ki, (2) a JO-RRP-ben szenvedő gyermekek esetén az anyák 30-60%-ának anamnézisében szerepel genitális condyloma (Abramson és mtsai., 1987; Cook és mtsai., 1973; Friedrichs és mtsai., 1993; Hallden és Majmudar, 1986; Quick és mtsai., 1980).

Felvetődhet a HPV perinatális úton történő átvitele is (Rombaldi és mtsai., 2009). Nagyobb a JO-RRP kialakulásának kockázata, amennyiben a gyermek első gyermekként, természetes úton, illetve fiatalos anyától születik, jöllehet JO-RRP császármetszés esetén is kialakulhat (Kashima és mtsai., 1992, Shah és mtsai., 1986).

Az AO-RRP esetén a HPV transzmisszó feltehetően orogenitális kontaktussal történik, azonban korábbi - esetleg születéskor szerzett - HPV fertőzés aktiválódása sem zárható ki (Derkey, 2001). Az AO-RRP kialakulása szempontjából fokozott kockázati tényező a gyakori orogenitális kontaktus és a nagyszámú szexuális partner (Kashima és mtsai., 1992).

Patogenezis és tünettan

RRP esetén a papillomatózis elváltozások elsősorban a felső légutak többrétegű el nem szarusodó laphámja és az egyrétegű csillós hengerhámja közötti átmeneti zónákban jelennek meg: a lágyszájpad nasopharyngealis felszínén, a limen vestibuli területén, a ventriculus laryngis alsó és felső szélén, a hangszalagok alsó felszínén, az epiglottis laryngealis felszínének középvonalában (Kashima és mtsai., 1993). Az alsó légutakba történő szóródás ritka, hajlamosító tényezői a HPV-11-es típusal történő fertőződés, a 3 éves kor előtt megjelenő tünetek, ill. tracheosztóma alkalmazása (Soldatski és mtsai., 2005).

Az RRP tünetei a betegek életkorától és a papillomák lokalizációjától függenek, AO-RRP és JO-RRP esetén is azonosak, vezető tünete - a leggyakoribb hangszalagi

lokalizáció esetén - a progresszív rekedtség, mely különböző mértékű diszfóniával járhat. Hangszalagi lokalizáció esetén a rekedtség már kisméretű lézió esetén is érzékelhető. Szintén gyakori tünetek a beszédhang megváltozása, a stridor és a respiratorikus distressz. Ritkábban krónikus köhögés, rekurrens pneumonia, diszfágia és gombócérzés jelentkezhethet (Derkay, 2001 és 2008., Xue és mtsai., 2010).

A papillomák képződése - a papillomavírusok életciklusából adódóan - a keratinociták érésének és differenciálódásának gátlásával valósul meg (Abramson és mtsai., 1987). Ezt erősíti meg a keratinociták fiziológias érését jelző differenciálódás-specifikus markerek (pl. keratin 13) mennyiségének csökkenése, ill. az abnormális differenciálódásra jellemző fehérjék (pl. $\psi 3$) szintézisének fokozódása is (Steinberg és mtsai., 1990).

Az RRP diagnózisa szövettani vizsgálattal történik (Tasca és Clarke, 2006). Kórszövettani szempontból a JO-RRP és az AO-RRP azonos, mindkettőt koilocitózis és a többrétegű, el nem szarusodó laphám benignus proliferációja jellemzi, amely a fibrovaszkuláris strómával együtt kesztyűujjszerű kitűrődéseket képez (Abramson és mtsai., 1987, Gale és mtsai., 1991). A koilocitózis mellett a fertőzött régiókban bazális hiperplázia és parakeratózis látható (Abramson és mtsai., 1987). Irodalmi adatok szerint a RRP-ben szenvedő betegek 20%-ában figyelhetőek meg diszpláziás elváltozások, amelynek kialakulása nem mutat összefüggést a korrallal, nemmel, dohányzási szokásokkal, ill. a szükséges sebészeti beavatkozások számával (Blumin és mtsai., 2009). Más irodalmi adatok szerint a diszplázia viszonylag gyakori RRP-ben, az enyhe- vagy közepes fokú diszplázia progressziója súlyosabb fokú elváltozássá viszont ritka (Hall és mtsai., 2011).

Az RRP kórlefolyása igen változatos és nehezen megjósolható: spontán remisszióba kerülhet, amikor egyáltalán nincs szükség vagy évente csupán néhányszor további beavatkozásokra, de igen agresszívvé is válhat, ami szükségessé teszi a néhány naponta ill. hetente történő sebészeti kezelést, valamint tracheotomia és adjuváns terápia alkalmazását (Derkay és Wiatrak, 2008).

A papillomatózis extralaryngealis szóródása megközelítőleg 30% gyermekek, míg 16% felnőttek esetén (Schraff és mtsai., 2004). Az extralaryngealis szóródás lokalizációja az előfordulás gyakoriságának csökkenő sorrendjében a szájüreg, a légcső, a bronchusok és a nyelőcső (Derkay, 1995; Kashima és mtsai., 1993; Schraff és mtsai., 2004).

Diagnózis

Az RRP-re jellemző nem specifikus tünetetek következtében a mielőbbi, adekvát kezelés szempontjából fontos az RRP más, hasonló megbetegedéstől - asztma, akut laringitisz és bronhitisz, felső légúti fertőzések - való elkülönítése (Stamataki és mtsai., 2007, Xue és mtsai., 2010). A fül-orr-gégészeti vizsgálat endoszkópiával történik (felnőttek esetén indirekt laringoszkópia, gyermekeknél fiberoszkópia). RRP gyanújának megerősítése hisztológiai mintavétellel történik (Derkay, 2001; Tasca és mtsai., 2006). A szövettani metszeteken kóros esetben parakeratózis, koilocitózis, akantózis, ill. esetenként különböző fokú diszplázia látható (Xue és mtsai., 2010).

Terápia

Jelenlegi tudásunk szerint egyetlen olyan kezelési sem módot ismerünk, amellyel az RRP teljes eradikációja megvalósítható lenne, a kezelés elsősorban sebészeti módszerekkel történik. A gége, a garatra, a légcső felső részére, valamint az orr- és szájüregre lokalizálódó elváltozások sebészi kezelésére napjainkban CO₂ lézert használnak, melynek előnye a léziók minimális vérzéssel járó eltávolítása (Dedo és Yu, 2001; Schraff és mtsai., 2004). A CO₂ lézer hátrányai között említhetőek a légúti égés veszélye, ill. potenciális veszélyforrás lehet a HPV DNS megjelenése a műtő légterében (Hallmo és Naess, 1991; Kashima és mtsai., 1991; Sawchuk és mtsai., 1989). A CO₂ lézer mellett más lézeres módszereket is használnak a papillomák sebészi kezelésére, mint például a KTP (potassium titanium phosphate) lézer (Zeitels és mtsai., 2006a és 2006b).

Az utóbbi években terjedt el a microdebrider használata, amely körkörös mozgást végző pengével és saját szívóval rendelkező, endoszkóposan vezetett eszköz (Ulualp és mtsai., 2007; Thorne és Zur, 2009)

A CO₂ lézerrel összehasonlítva a microdebrider használata esetén a hangminőség javulásáról, rövidebb operációs időről és csekélyebb mértékű nyálkahártya-sérülésről számoltak be (Pasquale és mtsai., 2003). Tekintettel arra, hogy a HPV DNS a klinikai tüneteket nem mutató szövetekben is kimutatható, a vírus teljes eradikációja sebészeti eszközökkel lehetetlen (Leman és Benton, 2000; Pignatari és mtsai., 1992).

Adjuváns kezelés

Jóllehet az RRP kezelésében a sebészeti beavatkozás az elsődleges, az esetek mintegy 20%-a adjuváns terápia alkalmazását teszi szükségessé (Schraff és mtsai., 2004). Adjuváns

kezelés alkalmazása az évenkénti magas műtéti szám, disztális terjedés és a papillomák gyors növekedése esetén merül fel (Derkay, 1995). A következőekben az RRP adjuváns kezelésére leggyakrabban felhasznált kezelési módok kerülnek ismertetésre.

Interferon (IFN)

Az RRP kezelésére elsőként, széles körben alkalmazott adjuváns szer az α -interferon volt (Healy és mtsai., 1988; Leventhal és mtsai., 1988). Az IFN-ok különböző stimulusok, mint például virális fertőzés, hatására képződnek a sejtekben, antivirális hatásuk jól ismert (Malmgaard, 2004; Fensterl és Sen, 2009). Papillomavírusok esetén az IFN-ok feltételezett hatásmechanizmusa az HPV onkogének expressziójának gátlása (Agarwal és mtsai., 1994; Johnson és mtsai., 1999; Thyrell és mtsai., 2005). Levinthal és munkatársai beszámolója szerint IFN kezelés hatására az RRP-ben szenvedő betegek közel 40%-a részleges-, további 40%-a pedig teljes remisszióba került a megfigyelési időszak során, míg 20%-nál az IFN kezelés hatástalan maradt (Levinthal és mtsai., 1991). Az IFN kezelés jelentős akut (láz, influenzaszerű tünetek, fejfájás, myalgia) és krónikus (növekedési zavarok, májkárosodás) mellékhatásokkal jár, amelyek rekombináns technikával előállított IFN esetén enyhébbek (Derkay, 2001; Ingimarsson és mtsai., 1979).

Ribavirin

A ribavirin a respiratory syncytial virus (RSV) és hepatitis C fertőzések esetén használt antivirális szer. McGlennen és munkatársai beszámolója szerint ribavirin kezelés hatására a szükséges sebészeti beavatkozások frekvenciája csökkent a kezelt légúti papillomatózisban szenvedő betegek esetén, ennek magyarázata azonban nem ismert (McGlennen és mtsai., 1993).

Aciklovir

Az aciklovir RRP kezelésben adjuváns terápiaként történő alkalmazásáról több szerző is beszámol (Endres és mtsai., 1994; Kiroglu és mtsai., 1994). Az aciklovir a herpeszvírusok virális timidin-kináza által történő foszforilációt követően válik aktívvá (Zerr és Frenkel, 1999). A papillomavírusok nem rendelkeznek ilyen enzimmel, ami azt a hipotézist veti fel, hogy az aciklovir elsősorban herpeszvírusokkal történő koinfekció esetén hatásos (Derkay és Wiatrak, 2008). Ilyen koinfekciókat mind JO-RRP, mind AO-RRP esetén leírtak, mi több, AO-RRP esetén a herpeszvírusokkal történő koinfekció agresszívabb kórlefyással hozható összefüggésbe (Pou és mtsai., 1995; Rimell és mtsai., 1997).

Indol-3-karbinol

Az indol-3-karbinol (I3K) nagy mennyiségben található meg bizonyos zöldségfélékben, mint például a káposzta, brokkoli vagy karfiol. Az I3K tumorelles hatását az ösztrogén metabolizmuson keresztül fejt ki, az ösztradiol anyagcserét annak 2-hidroxiációjának irányába mozdítva (Bradlow és mtsai., 1991). Newfield és munkatársai a laryngeális papillomákban az ösztradiol fokozott 16-hidroxiációját mutatták ki a normál gége izolátumokhoz képest, valamint mind 16- α -hidroxiösztron, mind pedig az ösztradiol esetén sejtproliferációt serkentő hatást tapasztaltak. I3K hatására a 2-hidroxiösztron termelődése fokozódott a 16- α -hidroxiösztron képződése mellett, ami antiproliferatív hatást eredményezett, valamint 75%-kal csökkentette a papilloma-képződést immunszupprimált egerekben (Newfield és mtsai., 1993).

Retinoidok

A retinoidok RRP-ben adjuvánsként történő felhasználásáról egyes irodalmi adatok a terápiás sikerről, enyhe vagy közepes toxicitásról, míg mások a retinoid kezelés sikertelenségéről és súlyos mellékhatásokról számolnak be (Alberts és mtsai., 1986; Bell és mtsai., 1988; Eicher és mtsai., 1994;).

Fotodinámiás terápia

A fotodinámiás terápiát részletesen Shikowitz és munkatársai tanulmányozták (Shikowitz és mtsai., 1998 és 2005). A RRP fotodinámiás kezelésben elsőként használt anyag a dihematoporfirin-éter volt, amely csökkentette a papillomák növekedési rátáját (Shikowitz és mtsai., 1998). Egy randomizált klinikai vizsgálat során a fotodinámiás kezeléssel az RRP javulását tapasztalták, ám 3-5 év elteltével recidívákról számoltak be (Shikowitz és mtsai., 2005).

Génterápia

Az RRP kezelésének egyik új lehetősége a génterápia alkalmazása, amelynek célpontjai RRP esetén a HPV korai géntermékei, mint például az E2, E5, E6 és E7 fehérjék (Aaltonen és mtsai., 1998; Swan és mtsai., 1994; Vambutas és mtsai., 1993; Ward és mtsai., 1989). RRP-ben az epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor, EGF) receptorának (epidermal growth factor receptor, EGF-R) fokozott expresszióját, ill. a keratinociták EGF-re adott válaszként a sejtek mérsékelt differenciálódását tapasztalták. Az EGF alkalmazásának felfüggesztése a keratinociták differenciálódásának indította el (Vambutas és mtsai., 1993).

Az EGF-R HPV patogenízisben betöltött szerepét támasztja alá az a megfigyelés, hogy az EGF receptor kináz gátlása a HPV-16 fertőzött keratinociták növekedését gátolta és azok differenciálódását indította el (Ben-Bassat és mtsai., 1997). Az EGF-R inhibitorok RRP-ben történő adjuváns felhasználására eddig kevés irodalmi adat áll rendelkezésre, azonban ezen inhibitorok újabb eszközt jelenthetnek az RRP ellen folytatott harc fegyvertárában (Bostrom és mtsai., 2005).

Cidofovir

A cidofovir [(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine] (CDV) az aciklikus nukleozid foszfonátok közé tartozó molekula, amely antivirális aktivitással rendelkezik számos DNS vírus ellen (De Clercq, 1996). A CDV a sejtekben két egymást követő foszforilálási lépés során aktiválódik, aktív metabolitja a CDV-difoszfát. Aktivációját különböző celluláris enzimek végzik, monofoszfát formáját a pirimidin-nukleozid-monofoszfát-kináz, míg aktív difoszfát metabolitját a nukleozid-difoszfát kináz, piruvát-kináz és kreatin-kináz hozzák létre (Cihlar és mtsai., 1996).

A CDV-t kezdetben a humán cytomegalovírus (HCMV) által okozott retinitis kezelésére használták (Lalezari és mtsai., 1998). A CDV aktív metabolitja a HCMV DNS polimeráz enzimének szubsztrátja és kompetitív inhibitora, a vírus replikációja során beépül a szintetizálódó DNS szálba. Két egymást követő CDV molekula beépülése a virális DNS szintézisének terminációjához vezet (Xiong és mtsai., 1997). A CDV szelektív virális DNS szintézist gátló hatása azon alapul, hogy virális DNS polimeráz CDV affinitása a humán DNS polimerázénál jóval nagyobb, így a humán DNS polimeráznál mért CDV koncentráció (100 µg/mL) 1/1000-e (0,1 µg/mL) már elegendő a virális DNS polimeráz gátlásához (Neyts és mtsai., 1990).

A herpeszvírusoktól eltérően a papillomavírusok nem kódolnak saját virális DNS polimerázt, replikációjukat a gazdasejt DNS polimeráza végzi, így a CDV HPV-fertőzött sejtek esetén tapasztalható antiproliferatív hatása alternatív hatásmechanizmusok létezését valószínűsíti (Andrei és mtsai., 1998). Az egyik ilyen hatásmechanizmus lehet a CDV apoptózist indukáló hatása HPV fertőzött sejteken, melyet számos apoptotikus marker megjelenése jelez: (1) a kaspáz-3 proteáz aktivitásának indukciója, (2) a foszfatidil-szerin transzlokációja a plazmamembrán külső rétegébe, (3) a nukleáris mátrix protein dezintegrációja és (4) a DNS fragmentációja (Andrei és mtsai., 2000). Mi több, CDV kezelés hatására HPV fertőzött sejtekben a p53 pRb fehérjék, valamint a p21 ciklin-dependens kináz

inhibitor akkumulációját figyelték meg (Abdulkarim és mtsai., 2002; Snoeck és mtsai., 2001). *In vivo*, HeLa és SiHa sejtvonalak xenograftjaival, egereken végzett kísérletek során intratumor CDV kezelés hatására szintén a pRB és p53 tumorszuppresszor fehérjék mennyiségének növekedését és fokozott apoptózist tapasztaltak (Yang és mtsai., 2010).

A CDV hatásmechanizmusának egy másik lehetséges módja a HPV E6/E7 onkogének expressziójának transzkripció szinten történő csökkentése (Abdulkarim és mtsai., 2002). Más szerzők ezzel ellentétes hatásról számoltak, miszerint a CDV fokozza mind az alacsony, mind pedig a magas onkogén kockázatú HPV típusok E6 onkoproteinjének expresszióját (Donne és mtsai., 2009). *In vitro*, HPV-6b és HPV-16 E6 proteinjét expresszáló sejtvonalak esetén a HPV-16 E6 fehérjét expresszáló sejtvonal fokozott CDV érzékenységet tapasztaltak a HPV-6b E6 protein expresszáló sejtekhez képest (Donne és mtsai., 2007).

A CDV első, *légtúti papillomatózisban* történő, sikeres intralézionális alkalmazásáról Van Cutsem és mtsai számoltak be egy algaratra és nyelőcsőre lokalizálódó papillomatózisban szenvedő 69 éves nőbeteg esetén (Van Cutsem és mtsai., 1995). Az elmúlt években számos tanulmány látott napvilágot a CDV légtúti papillomatózisban adjuvánsként történő felhasználásáról (Chetri és Shapiro, 2003; Pransky és mtsai., 1999; Pransky és mtsai., 2000; Snoeck és mtsai., 1998; Wilson és mtsai., 2000). Chadha és James a CDV RRP-ben történő adjuváns felhasználásról írt, 17 közlemény 158 betegre kiterjedő adatait elemző összefoglalójuk szerint a betegek 57%-a teljes, 35%-a részleges remisszióba került, 8%-uk esetén pedig nem tapasztaltak javulást (Chadha és James, 2007). Ugyanakkor McMurray és mtsai. kettős vak, randomizált, placebo kontrollált kísérlete során nem tudták bizonyítani a CDV RRP kezelésében történő hatékonyságát, igaz tanulmányuk kis létszámú (19 fő) betegcsoportot foglalt magában (McMurray és mtsai., 2008).

A CDV alkalmazása RRP kezelésére elsősorban intralézionálisan történik, bár inhalációval és tüdő érintettség esetén szisztémásan adagolt CDV alkalmazásáról is beszámoltak (Donne és mtsai., 2008; Ksiazek és mtsai., 2011; Van Valckenborgh és mtsai., 2001;).

Egy, a CDV RRP-ben történő alkalmazása során tapasztalt mellékhatásokat összefoglaló tanulmány csak kisebb mellékhatásokról számolt be. Az összefoglaló mintegy 31 tanulmány, 188 beteg esetén tapasztalt mellékhatásokat elemzi: 14 felnőtt beteg esetén lokális gyulladásról, egy 8 éves gyermek esetén intubációt igénylő ödémáról, míg 3 beteg esetén hangszalagi hegesedésről számol be, utóbbi azonban nem feltétlenül a CDV kezelés

következménye (Broekema és Dikkers, 2008). 2011-ben a készítmény gyártója egy közleményben a CDV off-label alkalmazása során tapasztalt mellékhatásokra hívta fel a figyelmet (Gillen 2011).

A CDV *nefrotoxikus* hatása jól ismert (Wachsman és mtsai., 1996). Naiman és mtsai. eredményei szerint az intralézionális CDV kezelés során alkalmazott dózisok esetén a plazma CDV szintje a toxikus dózis alatt van, gyermekek esetén a plazma CDV szint az intralézionális CDV mennyiségével dózisfüggő módon változik, míg ez felnőtteknél nem figyelhető meg (Naiman és mtsai., 2004). Ebből fakadóan az ajánlások szerint intralézionális CDV kezelés során az esetleges toxicitás elkerülése érdekében az intralézionális CDV mennyisége az ajánlott intravénás dózis (5 mg/kg) alatt van (Chadha és mtsai., 2007). Intravénás CDV alkalmazásáról beszámoló közlemények adatai szerint az 5mg/mL intravénás CDV kezelésben részesülő négy RRP-ben szenvedő beteg egyike, egy CDV és IFN kezelésben részesülő beteg esetén tapasztaltak mellékhatásokat (leukopenia és részleges alopecia) (Broekema és Dikkers, 2008).

A CDV kezeléshez köthető *malignus degeneráció* kérdése vitatott. Derkay közleménye szerint a patkánykísérletek során a több kutatócsoport azt tapasztalta, hogy a CDV-vel intravénásan vagy szubkután kezelt nőstény patkányok esetén megnőtt az adenokarcinóma, ill. hímeknél és nőstényeknél a Zymbal-mirigy (a külső fül egyik módosult faggyúmirigye rágcsőcsokban, karcinogenezis-tesztek indikátora) karcinóma kialakulásának valószínűsége (Derkay, 2005.). Irodalmi adatok szerint a légúti papillomatózis CDV kezelése során esetenként a papillomatózis progresszív diszpláziája- és malignus transzformációja figyelhető meg (Lott és Krakovitz 2009; Werner és mtsai., 2005). Más közlemények adatai szerint nincs összefüggés a diszplázia progressziója és a CDV kezelés alkalmazása között, mivel a malignus degenaráció CDV-kezelt és CDV naiv betegek esetén is 2-3%, tehát a diszplázia mértékének progressziója és a CDV terápia között nem mutatható ki összefüggés (Broekema és Dikkers, 2008; Gupta és mtsai., 2010).

A RRP CDV-vel történő kezelésében az esetek több mint 40%-ban tapasztalható részleges vagy teljes terápiás sikertelenség oka napjainkban nem ismert. A lehetséges okok között említhetőek az egyes betegekre jellemző egyéni faktorok, ill. a CDV kezelésre rezisztens HPV izolátumok jelenléte, ám ezeket a tényezőket tudomásunk szerint eddig még nem vizsgálták. Jóllehet az irodalomban akár több éves nyomon követési időszakok sem ritkák, az elváltozásokban detektálható HPV típusok genom szintű elemzése az esetleges mutációk,

több, esetleg eltérő CDV érzékenységgű, ill. eltérő agresszivitású RRP-t okozó HPV variáns jelenléte, vagy új variánssal történő újrafertőzés lehetőségének vizsgálatára ismereteink szerint eddig még nem került sor.

Munkánk során az alábbi célokat tűztük ki:

1. Az általunk vizsgált, légúti papillomatózisból származó HPV-11 szekvenciák filogenetikai vizsgálata a Génbankban rendelkezésre álló, légúti- és anogenitális régiókból származó HPV-11 szekvenciák bevonásával.
2. A különböző agresszivitású légúti papillomatózis elváltozások vírusgenetikai hátterének vizsgálata.
3. A virológiai szempontból sikertelen cidofovir kezelés vírusgenetikai hátterének vizsgálata rekurrens légúti papillomatózisban.
4. A cidofovir kezelés során bekövetkező esetleges vírusszekvencia változások nyomkövetése, a vírusgenom stabilitásának tanulmányozása a 7 évet (1999-2006) felölelő vizsgálati periódus során rekurrens légúti papillomatózisban.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Betegek

Munkánk során hat, különböző agresszivitású RRP-ben szenvedő beteg mintáit dolgoztuk fel (**3. táblázat**). Az RRP diagnosztizálása minden beteg esetén 18 éves kor előtt történt, tehát valamennyi általunk vizsgált szekvenciát juvenilis papillomatózisnak tekintettük. Malignus degenerációt egyetlen betegnél sem tapasztaltak, CDV kezelésben egyetlen beteg (6. beteg, nagyon agresszív papillomatózis) részesült.

A CDV terápiában részesült beteg (6. beteg) kezelése Chetri protokolljának módosításával történt (Chetri és mtsai., 2003). A beteg az intralezionális injekciókat a 0, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 42 és 55. hétre kapta. A kétgócu elváltozás (gége és lágyszájpad) kezelése során a CDV a lágyszájpad lokalizáció esetén 5 mg/mL, a gége esetén pedig 10 mg/mL koncentrációban került alkalmazásra. Egy kezelés során a beteg 1 mg/ttkg összdózist kapott. A CDV hatásának virológiai vizsgálatához a kezelés megkezdése előtt 190, 165, 131, 53 és 41 héttel vett szövetminták szolgáltak (Major és mtsai., 2008). A papillomatózis kiterjedésének jellemzése a Derkay-skála alapján történt, ahol a papillomatózis súlyosságát PSS (papilloma severity score) értékekben adják meg (Chetri és mtsai., 2003). A terápia sikerének követésére az eredeti skála módosított változata szerint történt (Major és mtsai., 2008).

3. táblázat: Az értekezésben vizsgált betegek adatai.

Beteg (Génbank azonosító)	Az RRP diagnózis ideje (életkor)	Lokalizáció	Sebészi beavatkozások száma	Tracheosztóma alkalmazása	Extra- laryngeális szóródás	Adjuváns kezelés
1. beteg (JO-RRP_3)	12 év	gége	1	Nem	Nem	nem
2. beteg (JO-RRP_5)	23 hónap	gége	1	igen	Nem	nem
3. beteg (JO-RRP_1)	26 hónap	gége	9	igen	nem	IFN
4. beteg (JO-RRP_4)	6 év	gége	6	nem	nem	IFN
5. beteg (JO-RRP_2)	38 hónap	gége, garat, arcüreg, orrüreg, hallójárat	30	igen	igen	IFN
6. beteg (JO-RRP_6)	18 hónap	gége, lágyszájpad	33	igen	igen	IFN, CDV

IFN: interferon; CDV: cidofovir

Az egyes szekvenciák nem-, közepesen- és nagyon agresszív kategóriákban történő besorolása az extralaryngeális szóródás jelenléte, annak mértéke és a szükséges sebészi beavatkozások számának alapján történt. A fenti kritériumok alapján az 1. és 2., szoliter papillomával rendelkező beteget a nem agresszív, a 3. és 4. beteget a közepesen agresszív, míg az 5. és 6. beteget a nagyon agresszív kategóriákba soroltuk.

A kísérletes munka során felhasznált vegyszerek, reagensek, pufferek

Vegyszerek

A munkánk során felhasznált vegyszerek és tápfolyadékok többségét a *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA) cégtől szereztük be. A következőekben az ettől eltérő források kerülnek megnevezésre:

Applied Biosystems (Foster City, CA, USA): GeneAmp High Fidelity PCR System, ABI 3100 BigDye terminator v3.1 Cycle kit

Bioline (London, Egyesült Királyság): Velocity DNA Polymerase

Fermentas (Vilnius, Litvánia): AluI, Bsh1236I, DpnI, NdeI, SspI, RsaI, TruI restrikciós endonukleázok

Invitrogen (Gaithersburg, MD, USA): AmpliTaq Gold, Lipofectamine 2000, 100× Penicillin-Streptomycin-Glutamine

Promega (Madison, WI, USA): GoTaq DNA polymerase, DraI, SspI, HaeIII, BamHI, KpnI restrikciós endonukleázok, T4 DNS ligáz, Wizard Plus Midipreps DNA Purification System, Reporter Lysis Buffer, Luciferase Assay System

Qiagen (Hilden, Németország): QIAquick Gel Extraction Kit.

Pufferek

TNE-puffer: 10mM Tris, 100mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7,5

TE puffer 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7,5

TSS puffer: 10 % PEG, 5 % DMSO, 20 mM Mg²⁺ (10 mM MgCl₂ + 10 mM MgSO₄) LB médiumban, pH 6,5

Tápadatok

LB (Luria-Bertani) médium: 10 g/L baktotripton, 5 g/L élesztőkivonat, 10 g/L NaCl, pH 7,0

LB-agar: 10 g/L baktotripton, 5 g/L élesztőkivonat, 10 g/L NaCl, 2% agar, pH 7,0

Ampicillines LB: 100 µg/mL ampicillin tartalmú LB medium

Ampicillines LB-agar: 100 µg/mL ampicillin tartalmú LB-agar

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

Módszerek

DNS izolálás, a DNS integritásának ellenőrzése

A kontamináció elkerülése érdekében mindvégig követtük a DNS kinyerésére vonatkozó laboratóriumi előírásokat. Egy-egy nukleinsav izolálás során a frissen fagyasztott, -70°C-on tárolt minta megközelítően 2×2×2 mm-es darabjait használtuk fel. Amennyiben a biopszia mérete megengedte, a DNS izolálás a minta különböző területeiről lemetszett szövetdarabokból történt. A szövetdarabokat folyékony nitrogénben elporítottuk, 2 mL TNE-pufferben homogenizáltuk, majd a homogenizátumhoz 10 µL 10 mg/mL koncentrációjú RNáz-t, 100 µL 10% SDS-t és 40 µL 10 mg/mL koncentrációjú proteináz K-t mértünk, majd az összeforgatott elegyet 50°C-on inkubáltuk 3 órán át. A DNS izolálást minden esetben fenol-kloroform-izoamilalkohol 25:24:1 arányú keverékével végeztük a következők szerint: a proteináz/RNáz kezelést követően a mintákhoz 3 mL fenol-kloroform-izoamilalkohol 25:24:1 arányú keverékét adtuk, majd kirázást követően 5000 g-n, 4°C-on, 10 percen át centrifugáltuk. Centrifugálás után a felső, vizes fázist új centrifugacsőbe pipettáztuk, majd újra elvégeztük a fenolos extrakciót. A felső, vizes fázis tisztítását a fenolos lépéshez hasonlóan kloroform-izoamilalkohol 24:1 arányú keverékével is elvégeztük, majd a vizes fázishoz 200 µL 2,5 M-os Na-acetát oldatot és 5 mL 96 %-os etanolt adtunk, majd -20°C-on éjszakán át történő inkubálást követően 5000 g-n, 4°C-on, 30 percen át centrifugáltuk. Centrifugálás után a csapadékot 70%-os etanollal mostuk és újra elvégeztük a centrifugálási lépést. Az üledék szárítását követően a DNS pelletet TE pufferben oldottuk vissza, majd rövid időn belül felhasználtuk. A DNS mintát felhasználásig 4°C-on, hosszabb ideig történő tárolás esetén -20°C-on tároltuk.

A DNS minták abszorbanációját 260 és 280 nm-en TE pufferrel szemben mértük. A minták tisztaságát a 260 és 280 nm-en mért optikai denzitás hányadosából, koncentrációját a 260 nm-en mért fényelnyeléséből határoztuk meg.

A DNS integritásának ellenőrzését a humán β -globin gén polimeráz láncreakcióval (polymerase chain reaction, PCR) történő felszaporításával végeztük a PCO3 (5'-ACACAACACTGTGTTCACTAGC-3') és PCO4 (5'-CAACTTCATCCACGTTTACC-3') primerek segítségével (Saiki és mtsai., 1985).

A β -globin PCR során a reakcióközeg összetétele és az egyes komponensek végkoncentrációja a következő volt: 1× enzimspecifikus PCR puffer + MgCl₂ (1,5 mM MgCl₂), 200-200 μ M dNTP, 0,5-0,5 μ M PCO3/PCO4 primer, 0,5 U GoTaq DNS polimeráz és 300-500 ng DNS templát 25 μ L végtérfogatban.

Az amplifikáció során az alábbi hőmérsékleti profilt használtuk:

Lépés	Hőmérséklet	Idő
1.	94°C	2 perc
2.	94°C	1 perc
3.	55°C	1,5 perc
4.	72°C	1,5 perc
	2-4. lépés ismétlése 30 cikluson át	
5.	72°C	4 perc

HPV DNS kimutatás és HPV tipizálás

A HPV DNS kimutatása MY/GP nested PCR-rel történt. Az MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') és MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') primerek segítségével a nyálkahártya-asszociált HPV típusok L1 régiójának egy 450 bp hosszúságú szakasza szaporítható fel (Hildesheim és mtsai., 1994; Manos és mtsai., 1989). A reakcióelegy összetétele a következő volt: 1× PCR puffer + MgCl₂ (1,5 mM MgCl₂), 200-200 μ M dNTP, 0,5-0,5 μ M MY09/MY11 primer, 0,5 U GoTaq DNS polimeráz és 300-500 ng DNS templát 25 μ L végtérfogatban. Az MY09/MY11 PCR során a következő hőmérsékleti profilt alkalmaztuk:

Lépés	Hőmérséklet	Idő
1.	95°C	2 perc
2.	96°C	20 másodperc
3.	50°C	5 másodperc
4.	52°C	15 másodperc
5.	72°C	1,5 perc
2-5. lépés ismétlése 40 cikluson át		
6.	72°C	2 perc

A GP5+ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3') és GP6+ (5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATCC-3') primerekkel egy 145 bp hosszúságú HPV DNS szakasz szaporítható fel, amely az MY09/MY11 primerekkel amplifikált termékre lokalizálódik (de Roda Husman és mtsai., 1995). A reakcióelegy összetétele 1× PCR puffer + MgCl₂ (1,5 mM MgCl₂), 200-200 μM dNTP, 0,5-0,5 μM GP5+/GP6+ primer, 0,5 U GoTaq DNS polimeráz és 2 μL amplimer az MY09/MY11 PCR elegyéből 25 μL végtérfogatban. A GP5+/GP6+ PCR során az alábbi hőmérsékleti profilt használtuk:

Lépés	Hőmérséklet	Idő
1.	94°C	2 perc
2.	94°C	1 perc
3.	50°C	1 perc
4.	72°C	1,5 perc
2-4. lépés ismétlése 35 cikluson át		
5.	72°C	4 perc

A HPV tipizálás az MY/GP nested PCR eredményeként kapott 145 bp hosszúságú amplimer RsaI/TruI restrikciós enzimekkel történő hasítással végeztük 37°C-on, 6 órán át. A restrikciós hasítás eredményeként kapott fragmenteket 3%-os etidium-bromiddal festett agaróz gélen 110 V végfeszültségen elektroforetizáltuk 60 percen át, majd UV fényben értékeltük.

HPV-11 szekvenciák genomi régióinak amplifikációja

A β-globin és az MY/GP kivételével az esetleges amplifikáció hibák kiküszöbölése érdekében 3'-5' exonukleáz (proofreading) aktivitással is rendelkező, nagy érzékenységu

polimeráz rendszert használtuk (GeneAmp High Fidelity PCR System). Valamennyi reakciót 50 µl végtérfogatban végeztünk a gyártó utasításai szerint a következő reakcióelegyben: 300-500 ng templát DNS, 0,3 mM szenz és antiszenz primereket, 200-200 µM dNTP-t, 1× gyári összeállítású enzimspecifikus puffer (1,5 mM MgCl₂), valamint 2,5 U DNS polimerázt (GeneAmp High Fidelity Enzyme Mix) 50 µL végtérfogatban.

Az egyes HPV genomi régiók amplifikációja során az annelációs hőmérséklet (Ta) kivételével ugyanazt a hőmérsékleti profilt használtuk, amely a következő volt:

Lépés	Hőmérséklet	Idő
1.	95°C	5 perc
2.	95°C	40 sec
3.	Ta* °C	1 perc
4.	72°C	1 perc/kilobázis
2-4. lépés ismétlése 35 cikluson át		
5.	72°C	5 perc

Az egyes primer párok esetén használt annelációs hőmérsékleteket, a primerek lokalizációját és az egyes amplimerek méretét a **4. táblázat** foglalja össze.

4. táblázat: Az egyes genomi régiók amplifikációja és szekvenálása során használt primerek adatai.

ORF	Primer	Genomi lokalizáció	Primer szekvencia (5'-3')	Annelációs hőmérséklet	Amplimer mérete
E6	E6 S	86-106	tagcagacgaggcattatgg	60°C	447 bp
	E6 AS	513-533 (C)	gcatgtgtccagcagtga		
E7	E7 S	514-534	tacactgctggacaacatgc	50°C	328 bp
	E7 AS	822-842 (C)	tcgtccgccatccttgttat		
E1	E1A S1	824-844	taacaaggatggcggacgat	50°C	545 bp
	E1A AS1	1349-1369 (C)	ccgcctctctatgttccacc		
	E1A S2	1329-1349	gaggacatagagggtgagg	50°C	550 bp
	E1A AS2	1859-1879 (C)	tatgttcaataacggtctgg		
	E1B S1	1861-1881	cagaccgttattgaacatag	50°C	566 bp
	E1B AS1	2407-2427 (C)	atatgtccaacatggtgtg		
	E1B S2	2361-2381	gctacagccactaacggatg	50°C	410 bp
	E1B AS2	2751-2771 (C)	ctaacaactgatcctggcac		

E2	E2 S1	2717-2737	aggaagatggaagcaatagc	50°C	608 bp
	E2 AS1	3305-3325 (C)	gctagatacagatgcaggag		
	E2 S2	3275-3295	gaagtatgtatggcagcac	50°C	603 bp
	E2 AS2	3858-3878 (C)	acctccatacacgtatgta		
E5	E5 S	3730-3750	tagcagtgaggaacaacgtc	50°C	765 bp
	E5 AS	4475-4495 (C)	gacatgtaccagtggccttg		
L1L2	Pr-A ¹	4445-4465	gtgcgtcagccacacaacta	57°C	895 bp 527 bp
	Pr-B ²	4813-4833	tctgaatcgactacacctgc		
	Pr-C ³	5320-5340 (C)	actcgtgtgtacatggacc		
	Pr-D ⁴	5218-5238	cacaatgcacctgatgaagc	57°C	618 bp 899 bp
	Pr-E ⁵	5816-5836 (C)	ggcaacaaccttgatacag		
	Pr-F ⁶	6097-6117 (C)	ccactaacaccaacgcctaa		
	Pr-G ⁷	5981-6001	aaggtagtgtgccagatcc	57°C	394 bp 1058 bp
	Pr-H ⁸	6355-6375 (C)	ggacatggtgatacaggct		
	Pr-I ⁹	7019-7039 (C)	ggtaatggcctgtgactgta		
	Pr-J	6909-6929	ctgcagaagtcattgcctat	56°C	391 bp
	Pr-H	7280-7300 (C)	acacaacacactgacacaca		
LCR	LCR S1	7192-7212	gtctgctctgacaggtataa	50°C	477 bp
	LCR AS1	7649-7669 (C)	cacacaacatatgggattag		
	LCR S2	7605-7625	gcccttacatacacttacct	50°C	457 bp
	LCR AS2	140-160 (C)	aacgtcttgcaactggtc		

LCR long control region; E early; L late; S szenz; AS antiszenz; C komplementer szál; bp bázispár

Egyszálú konformációs polimorfizmus (single strand conformational polymorphism, SSCP) analízis

A több HPV-11 variánssal történő fertőződés vizsgálatára elvégeztük az egyes elváltozásokból származó HPV-11 szekvenciák E1, E2, E6, E7 és LCR régióinak SSCP analízisét. Az SSCP vizsgálatot megelőzően az egyes amplimereket különböző restrikciós enzimekkel emésztettük, majd a hasítás eredményességét 3%-os agaróz gélen történő elektroforézissel (90 perc, 100 V) ellenőriztük. Az egyes amplimerek hasításához használt restrikciós enzimeket és a kapott fragment méreteket az **5. táblázat** foglalja össze. A restrikciós emésztés során a gyártó által ajánlott puffereket és emésztési körülményeket alkalmaztuk. A reakcióelegyek a következő összetevőket tartalmazták 30 µL végtérfogóban: 1× enzimspecifikus puffer, 10 U restrikciós endonukleáz az NdeI, SspI, Bsh1236I és DraI enzimekkel történő hasítás esetén, valamint az adott genomi régió PCR termékének 15 µL-ét.

Az E1A régió AluI+SspI hasítása esetén az emésztési közeg 7,5-7,5 U endonukleázt, 1× Tango puffert (Fermentas) és az E1A régió amplimerének 15 µL-ét, míg az E1B ORF HaeIII+SspI hasítása esetén 7,5-7,5 U endonukleázt, 1× Multi core puffert (Promega) és az E1B régió amplimerének 15 µL-ét tartalmazta. A hasítást minden esetben 37°C-on, 6 órán át végeztük.

5. táblázat: Az egyes HPV-11 genomi régiók SSCP analízise során vizsgált fragmentek.

HPV-11 régió	Amplimer lokalizációja a genomban (nukleotid pozíció)	Restrikciós enzim	Fragment méret (bp)
E6	86-533	NdeI	149, 117, 181
E7	514-842	SspI	277, 51
E1A	824-1879	AluI+SspI	301, 135, 155, 464
E1B	1861-2771	HaeIII+SspI	143, 205, 260, 302
E2	2717-3878	DraI	121, 150, 162, 333, 395
LCR	7192-160	Bsh1236I	321, 211, 367

LCR long control region; E early; L late; bp bázispár

A hasítási termékek 3 µL-ét 0,04% brómfenolkéket és 0,05% xilén-cianolt tartalmazó, 95%-os formamidban tízszeresre hígítottuk, majd 95°C-on 5 percen át denaturáltuk. A denaturációs lépést követően a mintákat azonnal jégre tettük. Az elektroforézist 15%-os poliakrilamid gélen végeztük 5°C-on, 250 V feszültségen 5 órán át, majd a gél ezüsfestését követően értékeltük. Az ezüsfestés első lépéseként a gél ecetsavas fixálóban (10% etanol, 0,5% ecetsav) 2×5 percig rázatva áztattuk, majd 5 percig 0,1%-os AgNO₃ oldatban, ezt követően 5 percig előhívóban (1,5% NaOH oldat), majd 0,1% formaldehidet tartalmazó előhívóban ráztattuk, majd a gél normál fényben értékeltük.

Szekvenálás

Az egyes genomi régiók amplifikációja során kapott PCR termékeket 1%-os agaróz gélen elektroforetizáltuk (100 V, 60 perc), majd a megfelelő amplimereket a gélből kivágtuk és QIAquick Gel Extraction Kit segítségével a gyártó utasításai szerint tisztítottuk. Minden egyes genomi régió szekvencia-analízisét legalább két, független PCR reakcióból származó amplimeren elvégeztük. Az egyes amplimereket mindkét irányból, tehát a szenz és antiszenz primer irányából is szekvenáltattuk. A szekvenálási reakciók ABI 3100 BigDye terminator v3.1 Cycle kit segítségével, ABI 3100 Genetic Analyzer-en, a BIOMI Kft-nél (Gödöllő, Magyarország) kerültek elvégzésre. A szekvencia adatok elemzése és azok összevetése

egymással, ill. a szekvencia adatbázisokban található adatokkal CLC Gene Workbench 4.0 (CLC Bio, Aarhus, Denmark) szoftverrel történt.

A CDV kezelésben részesülő beteg 24 sorozatmintája közül teljes genom analízisre öt minta került kiválasztásra: egy, a CDV és IFN kezelés előtti laryngeális minta (1. minta, 1999.), egy-egy laryngeális (2. minta, 2005.) és légyszájpadli lézióból (3. minta, 2005.) származó szekvencia a CDV kezelésre jól reagáló terápiás szakaszból, ill. egy-egy laryngeális (4. minta, 2006.) és légyszájpadli lézióból (5. minta, 2006.) származó minta a kezelés virológiai szempontból sikertelen szakaszából.

Metilációs analízis

A virális transzkripció szabályozásában szerepet játszó E2 fehérje kötőhelyek metiláltságának mértékét biszulfid-modifikációt követően szekvenálással határoztuk meg. A metilációs analízist a CDV kezelésen átesett betegből származó öt szekvencián végeztük el. Az egyes minták biszulfid modifikációját Kalantari és mtsai. leírása alapján végeztük 1000 ng DNS felhasználással (Kalantari és mtsai., 2004). A modifikált DNS meghatározott régióit metiláció-specifikus PCR-rel, AmpliTaq Gold DNA Polymerase enzim segítségével amplifikáltuk, 500 ng templát DNS-t, 0,3 mM szenz és antiszenz primereket, 200-200 μ M dNTP-t, 1 \times gyári összeállítású enzimspecifikus puffert (1,5 mM MgCl₂), valamint 1,25 U DNS polimerázt tartalmazó, 50 μ L végtérfogatú reakcióközegben. A biszulfid modifikált minták amplifikációja során használt primerek adatait az **6. táblázat** foglalja össze. A szekvenálási reakciók kivitelezése és a szekvencia adatok elemzése a fentebb ismertetett módon történt. Az amplifikáció során a következő hőmérsékleti profilt használtuk:

Lépés	Hőmérséklet	Idő
1.	95°C	5 perc
2.	95°C	40 sec
3.	50°C	1 perc
4.	72°C	1 perc
2-4. lépés ismétlése 35 cikluson át		
5.	72°C	5 perc

6. táblázat: A metilációs analízis során felhasznált primerek adatai

Primer	Genomi lokalizáció	Primer szekvencia (5'-3')	Annelációs hőmérséklet (°C)	Amplimer mérete
Mod1 S	7402-7422	tttgtgttttagtgtgtgt	50	408 bp
Mod1 AS	7785-7801 (C)	aacccaaaataactttaacctttaa		
Mod2 S	7759-7784	cggttggtataatggtggattgt	50	408 bp
Mod2 AS	88-110 (C)	acttccataataacctcatcta		

E early; L late; S szenz; AS antiszenz; C komplementer szál; bp bázispár

Plazmidok

Az egyes HPV-11 szekvenciák LCR-ének transzaktiváló hatásának vizsgálatához az egyes szekvenciák LCR-ét pALuc reporter vektorba klónoztuk. A referencia adatbázisban található HPV-11 (Génbank azonosító: M14119) szekvencia alapján tervezett BamHI (5'-CCGGGATCCGTAAGTTTTTATTGCAAAGT-3'; nukleotid pozíció 7155-7175) és KpnI (5'-GCCGGTACCAAAGATTAAACGTCTTGCAC-3'; nukleotid pozíció 168-148) hasítási helyeket tartalmazó, a teljes LCR-t magában foglaló pALuc reporter konstruktokat hoztunk létre. A klónozásra kerülő amplimert a fenti primerek segítségével GeneAmp High Fidelity PCR System-mel állítottuk elő. A reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 300-500 ng templát DNS, 0,3 mM szenz és antiszenz primerek, 200-200 µM dNTP, 1× gyári összeállítású enzimspecifikus puffer (1,5 mM MgCl₂), valamint 2,5 U DNS polimeráz (GeneAmp High Fidelity Enzyme Mix) 50 µL végtérfogatban. Az amplifikáció során használt hőmérsékleti profil a következő volt:

Lépés	Hőmérséklet	Idő
1.	95°C	5 perc
2.	94°C	30 sec
3.	50°C	1 perc
4.	72°C	1 perc
2-4. lépés ismétlése 40 cikluson át		
5.	72°C	10 perc

Az amplimereket 1%-os agaróz gélen elektroforetizáltuk (100 V, 1 óra), a gélből kivágtuk, Qiaquick Gel Extraction Kit segítségével a gyártó utasításai szerint tisztítottuk, majd mind a tisztított amplimert, mind a pALuc vektort KpnI és BamHI enzimekkel hasítottuk. A restrikciós hasítás során a 30 µL végtérfogatú emésztési elegy az alábbi összetevőket tartalmazta: 1× Multi core puffert, 10-10 U BamHI és KpnI restrikciós endonukleázt, illetve az amplimer hasítása során 15 µL tisztított PCR terméket, a vektor emésztése esetén pedig 3 µg pALuc vektort. A reakcióelegyet 37°C-on, 6 órán át inkubáltuk, agaróz gélen újra elektroforetizáltuk és Qiagen Gel Extraction Kit-tel tisztítottuk, majd az amplimereket a hasított pALuc vektorba klónoztuk Promega T4 DNS ligáz segítségével. A ligálási elegy 1× ligáz puffert, 30 ng hasított vektor DNS-t, 60 ng hasított inzert DNS-t és 1 U T4 DNS ligázt tartalmazott. A ligálást egy éjszakán át 4°C-on végeztük.

A ligálást követően a plazmidokat kompetens *Escherichia coli* (*E. coli*) XL-1 sejtekbe transzformáltuk. A kompetens baktériumok előállítására és transzformálása során a Chung és mtsai. által kidolgozott módszert vettük alapul (Chung és mtsai., 1989). A kompetens sejtek készítésénél LB-agarra szélesztett *E. coli* XL-1 izolált telepéből indultunk ki, amelyből 3 mL LB médiumban egy éjszakán át inkubált tenyészetet készítettünk (37°C, 250 rpm). Másnap ebből 500 µL-t 100 mL LB médiumba oltottunk és 3 órán át inkubáltuk (37°C, 250 rpm), majd 3000 g-n, 4°C-on, 10 percen át centrifugáltuk. A felülúszó maradéktalan leöntése után a sejteket 10 mL jéghideg TSS pufferben szuszpendáltuk és jégen 20 percig inkubáltuk. A kompetens *E. coli* XL-1 sejteket 6 hónapon belül felhasználtuk, addig -70°C-on TSS pufferben tároltuk.

A transzformálás során 100 µL kompetens baktériumhoz 10 µL ligált plazmidot adtunk és 20 percig jégen inkubáltuk, majd ezt követően 900 µL TSS-glükóz (20 mM glükóz TSS pufferben) oldatot adtunk a sejtekhez és 37°C-on, 450 rpm rázatás mellett 1 órán át inkubáltuk. Inkubálás után a sejteket 7000 g-n, szobahőn 30 másodpercig centrifugáltuk, 850 µL folyadékot leszívtunk, majd a maradék kb. 100-150 µL folyadékban a sejteket óvatosan felszuszpendáltuk és 100 µg/mL koncentrációban ampicillint tartalmazó LB-agarra szélesztettük, amit 37°C-on 16 órán át inkubáltunk. Az inkubálást követően izolált telepekből előtenyészetet készítettünk egy-egy izolált telep 3 mL ampicillines LB-ben (100 µg/mL ampicillin végkoncentráció) éjszakán át, 37°C-on, 250 rpm-en történő rázatásával. A transzformánsokat BamHI/KpnI enzimekkel történő hasítással ellenőriztük, majd az inzertet tartalmazó a transzformánsokat 100 mL ampicillines LB-ben éjszakán át, 37°C-on, 250 rpm-en történő rázatással szaporítottuk fel. A plazmid DNS-t Wizard Plus Midipreps DNA

Purification System segítségével tisztítottuk a gyártó utasításai szerint. Az inzertek nukleotid sorrendjét mind a klónozás előtt, mind pedig a plazmid tisztítást követően szekvenálással ellenőriztük.

Irányított mutagenézis

Az egyes HPV-11 szekvenciák LCR-ében detektált mutációk (A7413C, C7479T, 7509 T deléció, T7546C, 7584 C inzerció, T7904A) hatását a szabályozó régió transzaktivációs képességére irányított mutagenézissel vizsgáltuk, melynek során az egyes mutációkat a referencia HPV-11 genom (M14119) teljes hosszúságú LCR-ét tartalmazó pHPV-11-LCR-pALuc plazmid konstrukta építettük be. Az egyes reakciók során templátként 15 ng plazmid DNS-t használtunk. A mutáns plazmidok szintéziséhez Velocity DNS Polimerázt használtunk. Az egyes reakciók 0,4-0,4 μ M szenz és antiszenz primert (7. táblázat), $1\times$ gyári összeállítású, enzimspecifikus puffert, 250-250 μ M dNTP-t, 3% DMSO- t, 1 U DNS polimerázt, valamint 15 ng templát DNS- t tartalmazott. Az amplifikációs lépés során az alábbi hőmérsékleti profilt használtuk:

Lépés	Hőmérséklet	Idő
1.	98°C	3 perc
2.	98°C	30 sec
3.	Ta*	40 sec
4.	72°C	3 perc
2-4. lépés ismétlése 20 cikluson át		
5.	72°C	7 perc

* Az egyes primer párok esetén használt annealációs hőmérsékleteket az **7. táblázat** mutatja.

7. táblázat: Az irányított mutagenézis során felhasznált primerek adatai.

Mutáció	Primer	Primer szekvencia (5'-3')	Annealációs hőmérséklet (°C)
A7413C	7413 (S)	gtatgtttgtgtttcgtgtgtatatttg	64
	7413 (AS)	caaatatatacacacacgaaacacacaaacatac	
C7479T	7479 (S)	caattattatgtgtttctgttacaccagtg	64
	7479 (AS)	cactgggtgtaacagaacacacataataattg	
7509 T deléció	7509 (S)	ctaagttgtttgcacgcgccgtttg	68
	7509 (AS)	caaacggcgcgtgcaaacacaacttag	

T7546C	7546 (S) 7546 (AS)	gccttcattatattatatacatatttgaatataacc ggtatattacaaatatgtataatataatgaaggc	58
7584 C inzerció	7584 (S) 7584 (AS)	gttaccccccccccacttgaaccg gcaaccgaaaacggt tgcaagtggggggg	68
T7904A	7904 (S) 7904 (AS)	caaccggttcggttaaccacaccctac gtagggtgtgggtaccgaaaccggttg	67

Az amplifikációt követően a termékeket 20 U DpnI enzimmel, 37°C-on, 16 órán át emésztettük, majd a fent említett módszerrel *E. coli* XL-1-be transzformáltuk. Az egyes konstruktokat szekvenálással ellenőriztük, majd HEp-2 sejtekbe transzfektáltuk.

Sejtkultúrák, tranziens transzfekció és luciferáz teszt

Kísérleteinket HPV pozitív HEp-2 (ATCC azonosító: CCL-23) sejteken végeztük. A sejteket 10% magzati borjúsavót (fetal calf serum, FCS), 2 mM glutamint és antibiotikumokat (100 U/mL penicillin és 100 U/mL streptomycin) tartalmazó DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) médiumban, 37°C-on, 5% CO₂ tenzió mellett termosztátban tartottuk fenn. A HEp-2 sejtek tranziens transzfekciója Lipofectamine 2000 reagenssel történt. A transzfekció során 2 µg pALuc reporter vektort és a transzfekció hatékonyságának vizsgálatára 1 µg pRSV-β-Gal plazmidot használtunk. 48 órával a transzfekciót követően a sejteket Reporter Lysis Buffer-rel és fagyasztás-olvasztással lizáltuk, majd a sejt-extraktumok luciferáz aktivitását Luciferase Assay System segítségével luminométeren határoztuk meg a gyártó utasításai szerint. A luciferáz teszt standardizálásához β-galaktozidáz tesztet használtunk. A β-galaktozidáz teszt során a sejtek által kifejezett, pRSV-β-Gal plazmidon hordozott β-galaktozidáz enzim aktivitását 405 és 620 nm-en fotométerrel határoztuk meg, szubsztrátként 1 mg/mL ONPG-t (*ortho*-nitrofenil-β-galaktozid) használva. Minden transzfekciós kísérletet legalább három független ismétlésben végeztünk el. A luciferáz aktivitások összehasonlítása során T-próbát használtunk az SPSS 15.0 for Windows program (SPSS, Chicago, IL, USA) segítségével.

Szekvencia analízis

A szekvenálási eredmények alapján kapott szekvencia adatokat és a mutációk lokalizációját a Génbankban szereplő, Gissmann és mtsai. által fokozottan agresszív papillomatózisból izolált (1982), Dartmann és mtsai. által szekvenált (1986) M14119 azonosító számon szereplő HPV-11 protípushoz viszonyítva adtuk meg (Dartmann és mtsai.,

1986; Gissmann és mtsai., 1982). A HPV-11 prototípust Prof. zur Hausen bocsátotta rendelkezésünkre.

A teljes HPV-11 genomok filogenetikai elemzése során az általunk meghatározott hat HPV-11 teljes genom szekvencián kívül (HE574701-HE574705, FR872717) a Génbankban a közlemény megírása idején (2012) fellelhető teljes genom szekvenciákat használtuk fel (**8. táblázat**).

8. táblázat. A teljes genom analízis során felhasznált HPV-11 szekvenciák

Elváltozás	Geográfiai régió	Génbanki azonosító	Szekvenciák száma	Forrás
RRP	Németország	M14119	1	Dartmann és mtsai., 1986
Genitális condyloma	Kína	EU918768	1	Wu és mtsai., 2009
Cervikális atipia	Thaiföld	JQ773409, JQ773410	2	Chansaenroj és mtsai., 2012
RRP	Thaiföld	JQ773408, JQ773411	2	
RRP	USA	JN644141	1	Yuan és mtsai., 2012
Genitális condyloma	Szlovénia	FN907960, FN907962	1	Burk és mtsai., 2011; Maver és mtsai., 2011
RRP	Szlovénia	FN907957, FN907964, HE611258- HE611274, HE962023- HE962365, HE962366- HE962368	26	
Anális condyloma	Szlovénia	FN870021, FN870022, FN907958, FN907959, FN907961	5	
Cervikális atypia	Szlovénia	FN907963	1	

Az egyes ORF-ek és az LCR filogenetikai elemzések során - a fent említett teljes genom szekvenciákon túl - az alábbi, Génbankban rendelkezésre álló, teljes hosszúságú 49 L1 ORF (FN870688-FN870693, FN870695-FN870699, FN870709, FN870712-FN870717, FN870719-FN870721, FN870723-FN870741, FN870743-FN870746, FN870748-FN870750, AF335602, AF335603), 47 E6 ORF (FN870435-FN870440, FN870449, FN870452-FN870457, FN870459-FN870461, FN870463, FN870464, FN870466-FN870474, FN870476-FN870488, FN870490-FN870493, FN870495-FN870497) és 47 LCR szekvenciát

FN870625-FN870630, FN870632-FN870635, FN870637, FN870646, FN870649-FN870654, FN870656-FN870664, FN870666-FN870678, FN870680-FN870683, FN870685-FN870687) használtuk fel (Burk és mtsai., 2011; Maver és mtsai., 2011).

A Génbank adatbázisában található teljes genom szekvenciák esetén a referencia szekvencián (M14119) és két másik, tüdőbe történő terjedést mutató szekvencián kívül (JN644141, JQ773411) releváns klinikai adatok az értekezés írásának idején nem találhatóak.

A szekvencia elemzéseket CLC Gene Workbench 4.1.2 programmal végeztük (CLC Bio, Aarhus, Denmark).

EREDMÉNYEK

HPV koinfekciók vizsgálata különböző agresszivitású papillomatózisokból származó mintákban

Az MY/GP primerekkel végzett amplifikáció és az amplimerek RsaI/TruI analízise alapján mind a nem agresszív, mind pedig a közepesen-, ill. a fokozottan agresszív papillomatózisokból HPV-11 volt kimutatható, más HPV típussal történő koinfekció nem igazolható.

A virális LCR, E1, E2, E6 és E7 ORF-ek SSCP analízise alapján a 3., 4. és 5. beteg esetén a két, időben távol történő mintavétel esetén azonos HPV-11 variánst detektáltunk. A 6. beteg virológiai státuszának vizsgálata az értekezés későbbi fejezetében kerül tárgyalásra.

A különböző agresszivitású papillomatózisokból származó HPV-11 szekvenciák teljes genom analízise

A teljes genom analízis során két nem- (1. és 2. beteg), két közepesen-, (3. és 4. beteg) és egy fokozottan agresszív papillomatózisban (5. beteg) szenvedő betegből származó szekvenciákat vizsgáltunk. A 3., 4. és 5. beteg esetén a szekvenciákat két, különböző időpontban vett minta esetén is elemeztük. A genom összehasonlító vizsgálatokba a CDV-vel kezelt, fokozottan agresszív papillomatózisban szenvedő beteg (6. beteg) szekvenciája is bevonásra került.

A vizsgált HPV-11 genomok mind egymáshoz, mind pedig a referencia HPV-11 szekvenciához (M14119) képest mutattak eltéréseket. A hat teljes genom analízise során összesen 41 nukleotid szekvencia változást tapasztaltunk (**9. táblázat**). A szekvenálási eredmények alapján a referencia HPV-11 szekvenciában négy lehetséges szekvenálási hibát tártunk fel. Eredményeink alapján az E1 ORF-ben az 1783-1784-es pozíciókban a GC dinukleotid adataink alapján CG-nek olvasandó, ami a 318. aminosav pozícióban az eredeti referencia szekvenciában szereplő alanin helyett arginint kódol. Az LCR-ben detektált, referencia HPV-11 genomban található szekvenálási hibát (7719-7720 GC inzerció) Heinzel és mtsai. eredményei is megerősítik (Heinzel és mtsai., 1995).

9. táblázat: A különböző agresszivitású HPV-11 szekvenciák nukleotid változásai

ORF	Nukleotid pozíció	Referencia szekvencia	1. beteg	2. beteg	3. beteg	4. beteg	5. beteg	6. beteg	Aminosav csere/megjegyzés
Génbanki azonosító	–	M14119	HE574703	HE574705	HE574701	HE574704	HE574702	FR872717	–
E6 (nt102-554)	137	T	C	C	C	C	C	C	–
	380	C	T	T	T	T	T	T	–
E7 (nt 530-826)	662	G	T	T	T	T	T	T	A45S
E1 (nt 832-2781)	1046	C				A			A72E
	1107	A	C	C	C	C	C		–
	1629	A				G			–
	1713	A			T		T		–
	1783	C	G	G	G	G	G	G	R318A
	1784	G	C	C	C	C	C	C	
	1887	T			A				–
	2271	T		G					–
	2358	C	T	T	T	T	T		–
	2580	A	G		G	G		G	–

ORF	Nukleotid pozíció	Referencia szekvencia	1. beteg	2. beteg	3. beteg	4. beteg	5. beteg	6. beteg	Aminosav csere/meg-jegyzés	
E2 (nt 2723-3826)	2884	C	T	T	T	T	T	T	–	
	2888	T	C	C	C	C	C	C	–	
E4 (nt 3255-3581)	2978	C				A			Q86K az E2-ben	
	3391	A	G	G	G	G	G		Q46R az E4-ben	
	3436	G	A	A	A	A	A	A	G61E az E4-ben	
	3487	C	T	T	T	T	T	T	T	S76L az E4-ben
		A	C	C	C	C	C	C	C	–
	3626	A	G	G	G	G	G		K308R az E2-ben	
	3727	A						C	–	
Nem kódoló szekvencia	3832	A	G	G	G	G	G	G	nem kódoló szakasz	
E5A (nt 3871-4146)	3952	A	T	T	T	T	T	T	I28F	
	3991	G	C	C	C	C	C	C	V41L	
E5B (nt 4146-4370)	4370	G						A	–	
L2 (nt 4417-5784)	4647	C	T	T	T		T	T	–	
	4887	C	A	A	A	A	A	A	–	
L1 (nt 5771-7276)	6028	C	T	T	T	T	T	T	–	
	6584	C						T	–	
	6607	C						T	–	
	7197	C					T		A476V	
	7227	C					T		S486F	

ORF	Nukleotid pozíció	Referencia szekvencia	1. beteg	2. beteg	3. beteg	4. beteg	5. beteg	6. beteg	Aminosav csere/megjegyzés
LCR (nt 7277-7933, 1-101)	7413	A					C		
	7479	C			T		T	T	
	7509	T	deléció	deléció	deléció		deléció	deléció	
	7546	T	C	C	C	C	C	C	
	7584	-	C inzerció	C inzerció	C inzerció	C inzerció	C inzerció	C inzerció	lehetséges USF és Sp-1 kötőhely
	7719	-	G inzerció	G inzerció	G inzerció	G inzerció	G inzerció	G inzerció	lehetséges Sp-1
	7720	-	C inzerció	C inzerció	C inzerció	C inzerció	C inzerció	C inzerció	kötőhely mellett
	7904	T						A	közvetlenül az E2 kötőhely mellett

ORF open reading frame; JO-RRP juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis; E early, L late, LCR long control region, CDV cidofovir, USF: upstream transcription factor 1; Sp-1: specificity factor

A 37 szekvencia változás (a feltételezett szekvenálási hibákat nem számolva) közül hat az LCR-ben, egy a nem kódoló genom szakaszban, illetve 30 a fehérjét kódoló régiókban detektálható. Az LCR-ben található szekvencia változások közül kettő (T7546C, 7584 C inzerció), a nem kódoló régióban (A3832G), ill. tizenhárom, a kódoló régiókban található nukleotid csere valamennyi szekvenciában kimutatható.

A kódoló régiókban történt nukleotid szekvencia változások közül 11 eredményezett aminosav szekvencia változást: Ala45Ser az E7 ORF-ben, Ala72Glu az E1 régióban, Gln86Lys és Lys308Arg az E2 génben, Gln46Arg, Gly61Glu, Ser76Leu az E2/E4 ORF-ben (aminosav csere csak az E4-ben), Ile28Phe és Val41Leu az E5A génben, illetve Ala476Val és Ser486Phe az L1 ORF-ben. Hat aminosav csere valamennyi HPV-11 szekvenciában kimutatható. Az E4 fehérjében detektált Gln46Arg mutáció a 6. betegből származó szekvencia kivételével valamennyi szekvenciában kimutatható. Négy aminosav csere egyedi szekvencia változathoz vezetett: az Ala72Glu csere az E1 régióban és a Gln86Lys aminosav szekvencia változás az E2 fehérjében csak a 4. beteg (HE574704; közepesen agresszív papillomatózis) szekvenciáira jellemző; az L1 szekvencia polimorfizmusok (Ala476Val és Ser486Phe) pedig egyedileg csak az 5. beteg (HE574702; fokozottan agresszív papillomatózis) mintáiban mutathatóak ki. Ezen változások egyetlen génbanki szekvenciában sem mutathatóak ki.

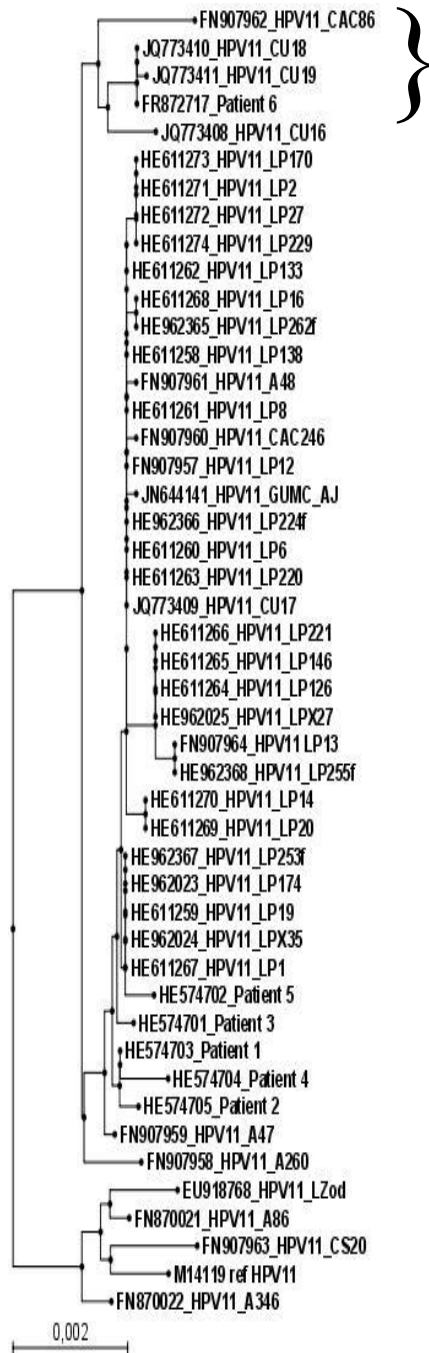
A szekvencia analízis alapján megállapítható, hogy a különböző agresszivitású papillomatózis elváltozásokból származó HPV-11 szekvenciák E5/E6/E7 onkogénjei aminosav szekvenciájukban azonosak. A 3., 4. és 5. beteg két különböző időpontjában vett mintákból azonos genom szekvenciájú HPV-11 genomok detektálhatóak.

A hat HPV-11 szekvencia LCR-ében összesen hat nukleotid szekvencia változást (a feltételezett szekvenálási hibákat nem számolva) detektáltunk: négy nukleotid cserét, egy inzerciót és egy deléció (9. táblázat). A négy nukleotid csere közül kettő (A7413C és T7904A) egyedi nukleotid polimorfizmus, amelyek közül az A7413C csere csak az 5. betegből (fokozottan agresszív papillomatózis), míg a T7904A csere csak a 6. betegből (fokozottan agresszív papillomatózis) származó HPV-11 szekvenciában detektálható változás, utóbbi közvetlenül a harmadik E2 fehérje kötőhely mellett helyezkedik el. Az inzerció valamennyi szekvenciában kimutatható, USF és Sp1 transzkripciós faktor kötőhelyet érintő mutáció, míg a deléció öt szekvenciában detektálható (9. táblázat).

Az általunk vizsgált hat szekvencia közül kettő LCR-e azonos volt, mindkét szekvencia alacsony agresszivitású szoliter papillomából származott (1. és 2. beteg).

Az LCR analízise alapján megállapítható, hogy a nem agresszív papillomatózisokból (1. és 2. beteg) származó HPV-11 szekvenciák LCR-ei azonosak, a közepesen és fokozottan agresszív elváltozásokból származó szekvenciák LCR-ei azonban mind eltérnek egymástól.

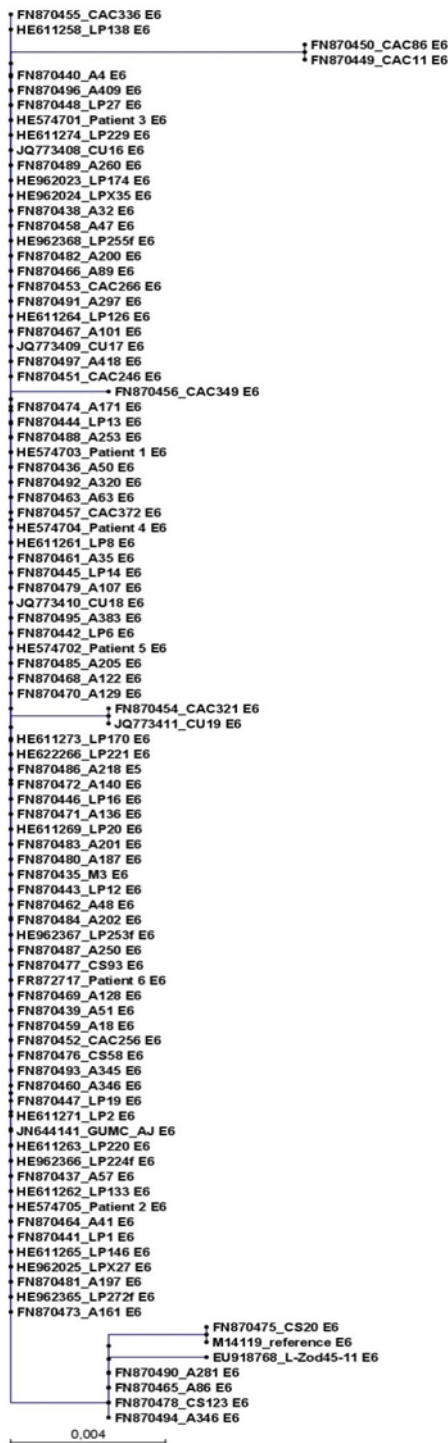
Filogenetikai vizsgálatok



Az adatbázisban található HPV-11 szekvenciák származástaniilag közel állnak egymáshoz, az eddig vizsgálatok alapján két filogenetikai vonal rajzolódik ki (Burk és mtsai., 2011; Maver és mtsai., 2011) (2. ábra). Az általunk vizsgált, 6. betegből származó HPV-11 szekvencia (FR872717) három thaiföldi (JQ773408, JQ773410, JQ773411) és egy szlovén szekvenciával (FN907962) együtt az A2 filogenetikai vonalon belül egy jól megkülönböztethető alcsoportot képez.

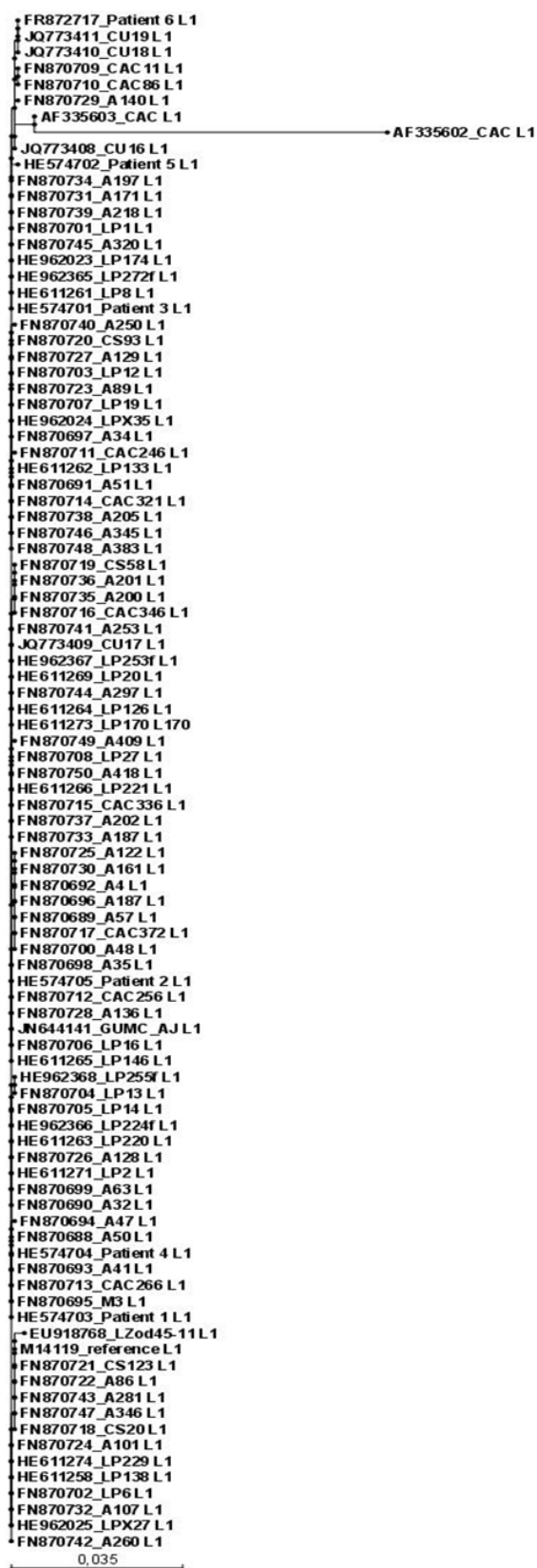
A származástani elemzés alapján megállapítható, hogy az E1 ORF kivételével valamennyi fehérjét kódoló rész és az LCR is egy-hat, a filogenetikai ágra jellemző mutációt hordoz. A két filogenetikai ág közötti nukleotid szekvencia különbség 0,1%, a legjelentősebb differencia a 6 polimorfizmust hordozó E2 ORF-ben figyelhető meg. A két származástani ág közötti nukleotid szekvencia különbség az E7 ORF-ben aminosav szinten is megfigyelhető. Anogenitális és légúti régiókból származó szekvenciák mindkét származástani ágon megtalálhatóak, adott anatómiai régióra jellemző származástani vonal nem figyelhető meg. Valamennyi, általunk szekvenált hat HPV-11 genom az A2 filogenetikai vonalhoz tartozik és a 6. betegből származó szekvenciától eltekintve – származástaniilag, a papillomatózis agresszivitásától függetlenül, közel állnak egymáshoz.

2. ábra: A rendelkezésre álló HPV-11 teljes genom szekvenciák filogenetikai analízise. Az általunk vizsgált, 6. betegből származó HPV-11 szekvencia (FR872717) három thaiföldi (JQ773408, JQ773410, JQ773411) és egy szlovén szekvenciával (FN907962) együtt az A2 filogenetikai vonalon belül egy jól megkülönböztethető alcsoportot képez (az ábrán kapcsos zárójellel jelölve). LP laryngeális papillomatosis; CAC condyloma acuminatum, A anális minta.



A filogenetikai vizsgálatok alapján a legkonzervatívabb régióknak az E6 ORF bizonyult, a 95 rendelkezésre álló E6 szekvencia közül - az általunk közölt hat szekvenciát is beleértve - 82 azonos volt (3. ábra).

3. ábra: A rendelkezésre álló HPV-11 E6 szekvenciák filogenetikai analízise. LP: laryngeális papilloma; CAC: condyloma acuminatum; A: anális minta

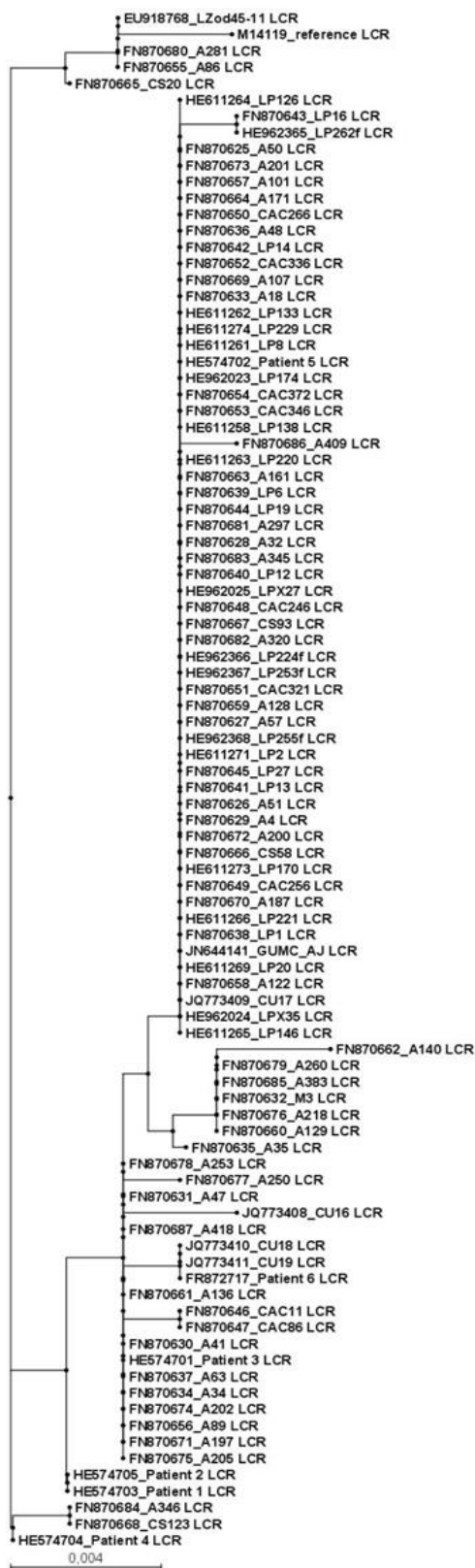


Az L1 ORF a filogenetikai vizsgálatok 15 szekvencia változatot tártak fel, jóllehet a rendelkezésre álló 96 L1 szekvencia közül 62 azonos volt (4. ábra). Az általunk vizsgált szekvenciák közül mind a két nem agresszív-, mind pedig a két közepesen agresszív elváltozásból származó szekvencia ebbe a csoportba tartozik. A fő L1 klaszterben tüdőtumorba progrediáló RRP-ből származó izolátum (JN644141) is található.

A referencia HPV-11 szekvencia (M14119, fokozottan agresszív JO-RRP-ből származó izolátum) egy 6 azonos szekvenciát (M14119, 2 cervikális és 3 anális régióból izolált HPV-11 genom) magában foglaló klasztert képez.

Az általunk vizsgált szekvenciák közül a két fokozottan agresszív papillomatózisból származó szekvencia eltérő klaszterbe tartozik. A 6. betegből származó szekvencia (FR872717) a fő klasztertől két silent SNP-vel különül el és megegyezik két thaiföldi izolátum (egy tüdőbe történő szóródást mutató gégepapillomatózisból származó és egy magas fokú hámdiszpláziát mutató cervikális izolátum) szekvenciájával. A 5. betegből származó szekvencia (HE574702) szintén két SNP-t hordoz, melyek az aminosav szekvenciában is megnyilvánultak.

4. ábra. A rendelkezésre álló HPV-11 L1 szekvenciák filogenetikai analízise. LP: laryngeális papilloma; CAC: condyloma acuminatum; A: anális minta



A filogenetikai elemzések alapján a legjelentősebb szekvencia diverzitást az LCR esetén tapasztaltuk (5. ábra). A fő LCR klaszterbe a vizsgált 95 LCR szekvencia közül 55 sorolható be. Ebbe a klaszterbe az általunk vizsgált hat szekvencia közül pusztán egy, az 5. betegből izolált, fokozottan agresszív papillomatózisból származó szekvencia (HE574702) tartozik.

A két, nem agresszív papillomatózisból származó szekvencia (1. beteg: HE574703; 2. beteg: HE574705) LCR szekvenciája megegyezik, de különbözik minden génbanki LCR szekvenciától.

A 3. betegből származó, közepesen agresszív szekvencia LCR-e (HE574701) 11 anális régióból izolált szekvenciával egyezik meg (Szlovénia).

A 4. betegből, közepesen agresszív papillomatózisból izolált szekvencia (HE574704) egyedi LCR-tképviselet és különbözi valamennyi rendelkezésre álló HPV-11 szekvenciától.

Az 5. betegből (fokozott agresszivitású papillomatózis) származó szekvencia (HE574702) a fő LCR klaszterbe sorolható.

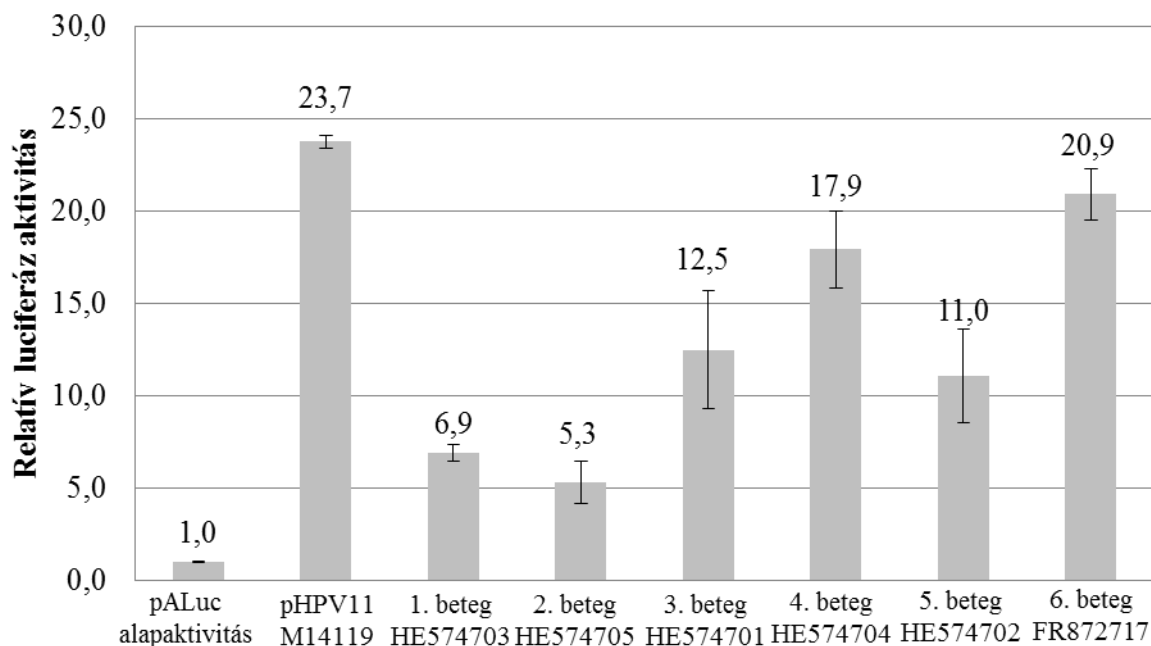
A 6. betegből (fokozott agresszivitású papillomatózis) származó LCR szekvencia (FR872717) két thai földi izolátummal egyezik meg.

5. ábra. A rendelkezésre álló HPV-11 LCR szekvenciák filogenetikai analízise. LP: laryngéalis papilloma; CAC: condyloma acuminatum; A: anális minta

A rendelkezésre álló teljes HPV-11 genomok elemzése egy lehetséges szekvenálási hibára hívja fel a figyelmet a referencia HPV-11 szekvencia E1 régiójában. A referencia HPV-11 szekvencia (Dartmann és mtsai., 1986) E1 ORF-ében 1783 és 1784 pozícióban leírt CG a szekvencia adatok alapján GC sorrendű, amely a 318-as aminosav pozícióban Ala/Arg cserét eredményez. Az LCR-ben található Heinzl és mtsai (1995) által leírt szekvenálási hibát az általunk meghatározott HPV-11 szekvenciák is megerősítik.

A különböző agresszivitású elváltozásokból származó HPV-11 szekvenciák transzaktiváló potenciáljának vizsgálata

Az egyes HPV-11 szekvenciák LCR-ének transzaktiváló hatását a **6. ábra** szemlélteti. Az egyes LCR szekvenciák transzaktiváló képességét a sejtek HPV-11 LCR inzertet nem tartalmazó pALuc plazmidhoz viszonyítva, relatív luciferáz egységekben adtuk meg.



6. ábra: A különböző agresszivitású HPV-11 szekvenciák transzaktiváló képességének analízise. Az ábrán feltüntetett adatok három, független kísérlet eredményei. A luciferáz aktivitás értékeket relatív luciferáz aktivitás formájában adtuk meg, ahol az inzertet nem tartalmazó pALuc vektorral transzfektált HEp-2 sejtek esetén mért luciferáz aktivitást 1-nek vettük.

Valamennyi HPV-11 szekvencia esetén a luciferáz-aktivitás jelentős emelkedését figyeltük meg az inzertet nem tartalmazó vektorral transzfektált kontrollhoz képest, a legmagasabb aktivitást a referencia HPV-11 (M14119) esetén detektáltunk.

A két, fokozottan agresszív papillomatózisból származó szekvencia (5. beteg, 6. beteg) transzaktiváló hatása jelentősen különbözött egymástól ($p=0,004$), magasabb aktivitást a 6. betegből nyert szekvencia esetén mértünk. A 5. betegből izolált, fokozottan agresszív papillomatózisból származó szekvencia (HE574702) transzaktiváló hatása közel azonos volt a 3. beteg közepesen agresszív papillomatózisából származó szekvencia (HE574701) aktivitásával ($p=0,575$) és alacsonyabb volt ($p=0,022$) a szintén közepesen agresszív papillomatózisból izolált szekvencia (4. beteg, HE574704) aktivitásánál. Utóbbi szekvencia (4. beteg; HE574704) aktivitása közel azonos volt a fokozottan agresszív papillomatózisból származó, 6. betegből (FR872717) vett szekvenciával ($p=0,105$).

A nem agresszív elváltozásokból származó szekvenciák (1. és 2. beteg) transzaktiváló képessége jelentősen kisebb volt ($p=0,049$ -tól $p<0,001$ -ig) a közepesen agresszív és a fokozottan agresszív elváltozásokból származó szekvenciákhoz képest.

Irányított mutagenézis

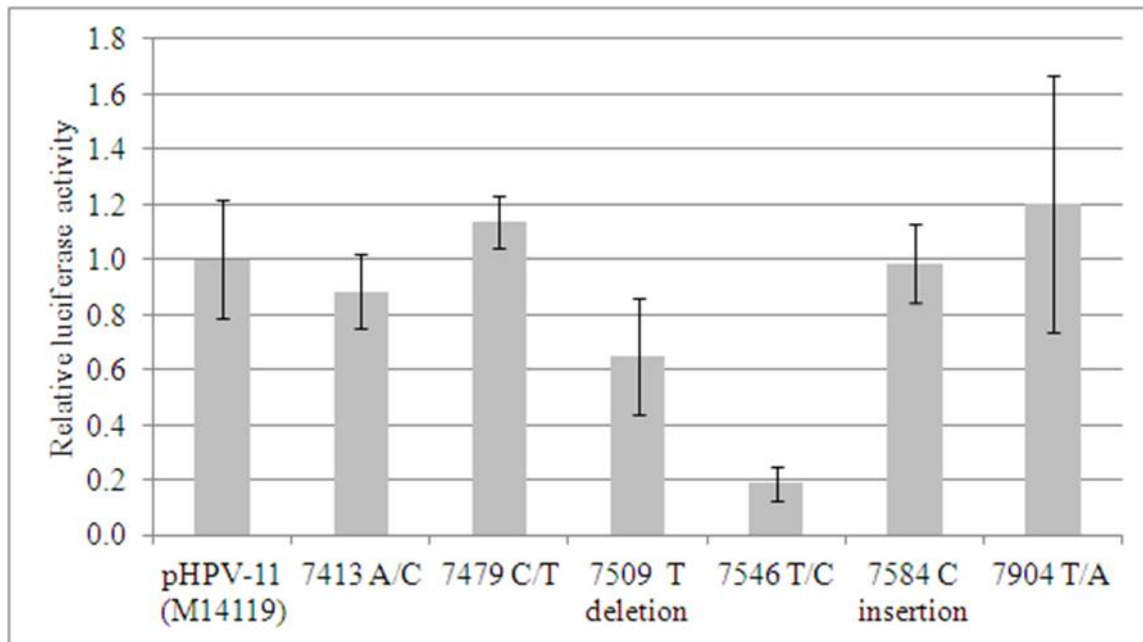
A klinikai mintákban detektált hat, LCR-re lokalizálódó mutáció közül a 7546-os pozícióban detektált T/C nukleotid csere a referencia plazmidhoz (pHPV-11-LCR-pALuc) képest szignifikánsan ($p=0,003$) csökkentette az LCR transzaktiváló hatását (**7. ábra**). Ez a mutáció valamennyi, általunk vizsgált szekvenciában, ill. a Génbankban található csaknem valamennyi (88-ból 83) szekvenciában megtalálható.

A fenti egyedi nukleotid polimorfizmuson túl két másik nukleotid szekvencia változás is *attenuátor* hatást eredményezett (7509 T deléció, a 4. betegtől eltekintve valamennyi szekvenciában; A7413C csere az 5. beteg esetén), amely azonban statisztikailag nem volt szignifikáns ($p=0,111$ és $p=0,472$). Ezen két *attenuátor* mutáció a 88 génbanki LCR szekvencia közül 81 ill. 58 esetén figyelhető meg.

A T7904A és a C7479T csere vizsgálataink alapján *potencírozó* hatással bír. A 7904-es pozícióban detektált, közvetlenül az E2BS#3 mellett található T/A csere pusztán a 6. beteg (fokozottan agresszív papillomatózis) és további két, génbanki szekvenciában mutatható ki. A C7479T pontmutáció a két fokozottan agresszív, a 3. beteg közepesen agresszív, ill. 81 génbanki szekvenciában detektálható. A T7904A és C7479T mutációk esetén tapasztalt *potencírozó* hatás statisztikailag nem volt szignifikáns ($p=0,551$ és $p=0,372$).

A 7584-es pozícióban detektált C inzerció, mely 77 génbanki szekvenciában is megtalálható, az LCR transzaktiváló hatását nem befolyásolta ($p=0,919$).

Az LCR-ben detektált hat mutáció közül tehát három *attenuátor* (A7413C, T7546C, 7509 T deléció), kettő pedig *potenciórozó* (C7479T, T7904A) hatást eredményezett. A 7584-es pozícióban történő C inzerció az LCR transzaktiváló hatását nem befolyásolta. A fenti mutációk közül pusztán a 7546-os pozícióban található T/C hatása bizonyult szignifikánsnak.



7. ábra: Az LCR-mutációk hatása annak transzaktiváló potenciáljára. Az ábrán feltüntetett adatok három, független kísérlet eredményei. A luciferáz aktivitás értékeket relatív luciferáz aktivitás formájában adtuk meg, ahol a referencia HPV-11 (M14119) LCR-ét tartalmazó HPV-11_LCR_pALuc konstrukt luciferáz aktivitását 1-nek vettük.

Humán papillomavírus koinfekciók vizsgálata a CDV kezelt beteg sorozatmintáiban

Az MY/GP PCR és az azt követő RsaI/TruI emésztés eredménye alapján a vizsgált elváltozásokban HPV-11 mutatható ki, más HPV típusal történt koinfekció nem igazolódott.

A CDV kezelésen átesett beteg 24 sorozatmintájában (14 laryngeális és 10 lágyszájpadli szekvencia) az 1999-től 2007-ig terjedő vizsgálati periódusban kizárólag HPV-11-et detektáltunk, más HPV típus nem volt kimutatható. Az egyes genomi régiók vizsgálata során valamennyi szekvencia esetén mind a vizsgált fehérje kódoló régiók (E1, E2, E6 és E7), mind pedig a hipervariábilis LCR esetén azonos SSCP mintázatot detektáltunk, tehát a 8 évet felölelő vizsgálati szakaszban mindvégig azonos HPV-11 variáns volt kimutatható. A fenti régiók SSCP analízise során több, esetleg eltérő onkogenitású vagy CDV érzékenységgű HPV-11 variáns jelenléte nem mutatható ki.

HPV-11 szekvenciák teljes genom analízise a CDV kezelés előtt, a kezelés virológiai szempontból sikeres és sikertelen szakasza során

A teljes genom analízis során a vizsgálatra kiválasztott öt minta esetén azonos nukleotid szekvenciát detektáltunk. A CDV terápia során nukleotid szekvencia változások nem figyelhetőek meg, tehát az egyes terápiás szakaszokból származó HPV-11 szekvenciák nukleotid sorrendje azonos. A teljes genom analízis a vizsgált minták esetén megerősíti az SSCP-vel kapott eredményeket, miszerint a különböző időpontokban vett mintákban mindvégig azonos variáns mutatható ki, egyéb HPV-11 variáns nem detektálható, illetve SNP-k jelenléte sem igazolható.

A referencia HPV-11 szekvenciához (M14119) képest 28 nukleotid szekvencia változást (24 nukleotid cserét, három inzerciót és egy deléció) detektáltunk, amelyek közül az inzerciók (7584 C, 7719 G, 7720 C inzerciók) és a deléció (7509 T deléció) kizárólag a fehérjét nem kódoló szabályozó szekvenciát, az LCR-t érintették. A 7584-es, 7719-es és 7720-as pozícióban történt inzerciók potenciális Sp-1 (Specificity Factor 1) transzkripció faktor kötőhelyet érintenek a virális génexpressziót szabályozó LCR-ben.

Az inzerciókon és deléciókon kívül detektált 24 nukleotid csere közül három az LCR-ben, egy a 3832-es pozícióban fehérjét nem kódoló régióban, hús pedig a korai és kései fehérjéket kódoló régiókban detektálható. A 7902-es pozícióban, az LCR-ben detektálható T/A mutáció egy E2 fehérje kötőhely közvetlen közelében található. A hús, kódoló régióban történt mutáció közül hét „*missense*” mutációt detektáltunk, amelyek aminosav cserét eredményeztek az E7, E1, E4, E5 régiókban, míg tizenhárom szekvencia változás „*silent*” mutációhoz vezetett. A 6. betegből származó HPV-11 (FR872717) szekvenciában detektálható nukleotid- és aminosav szekvencia változásokat a **9. táblázat** (ld. 48-50. oldal) foglalja össze.

A CDV kezelésen átesett beteg sorozatmintáiból származó szekvenciák LCR-ének metilációs analízise

A CDV kezelésen átesett beteg (6. beteg) LCR-ének biszulfid midifikálását követően elvégzett szekvenciális eredmények alapján megállapítható, hogy az E2 kötőhelyekre lokalizálódó nyolc CpG dinukleotid valamennyi vizsgált mintában metilálatlan állapotban volt. A vizsgált szekvenciák LCR-ének sematikus ábrázolását a **8. ábra** szemlélteti.

7277-TATATGTTGTGTCAGTGTGTTGTTATTATATGTTGTTGAGTGTGTATATGTTCTTGTATTGTGTATATGTTGTATATGTTGTGTATATGTTGTATGTTATGTTATGTTATG
TTGTTATGTTGTTTGTGTTTAGTGTGTGTATATTTGTGGAATGTGTATGTATGTTTGTGCAATAAA⁷⁴⁷⁹CAATTATTATGTGTGTC^{C/T}TGTTACACCCAGTGACTAA
7509 7546 7584
GTTGTGTTT - GCACGCGCCGTTTGTGTTGCCCTCATATTATATAA^{T/C}CATATTGTAAATACCTATACTATGTTACCCCCCCC^CACTTGCA^{ACCGTTTTCGGT}TGCCCT
7719-7720
TACATACACTTACCTCAAATTTGTTATAACGTGTTTGTACTAATCCCATATGTTGTGTGCCAAGGTACATATTGCCCTGCCAAGTATCTTGCCAACAACACACCTG^{GC}CAGGG
CGCGGTATTGCATGACTAATGTAC^{AATAAA}CCTGTCGGTTTGTACAATGTTGTGATTGCAGCCAAAGGTTAAAAGCATTTTGGCTTCTAGCTGAACATTTTGTACCCCTTA
7904
GTATATTATGCACAATACCCACAAAATGAGTAACCTAAGGTCACACACCTGCA^{ACCGTTTTCGGT}^{T/A}ACCCACACCCTACATATTTCTTCTTATA[↑]CTTAATAACAATC
TTAGTTTAAAAAAGAGGAGGG^{ACCGAAAACGGT}CA^{ACCGAAAACGGT}TATA^{TATAAA}CCAGCCCAAAAAATTAGCAGACGAGGCATT-101

8. ábra: A teljes genom szekvenálás során vizsgált JO-RRP_6 szekvencia LCR-ére lokalizálódó E2 kötőhelyek metilációs analízise. A tört nyíl az 1. nukleotid pozíciót jelöli. A számozott nukleotidok a referencia HPV-11 szekvenciához (M14119) viszonyított mutációkat jelzik. Az E2 fehérje kötőhelyeit fekete téglalap jelöli. Az E2 kötőhelyekre lokalizálódó CpG dinukleotidokat aláhúzással emeltük ki. A poliadenilációs szignált vastag betűvel jelöltük, míg a TATA-boxot szürke téglalappal emeltük ki.

MEGBESZÉLÉS

A különböző agresszivitású elváltozásokból származó HPV-11 szekvenciák protein kódoló régióinak szekvencia analízise

Az E6/E7 onkogének szekvenciáinak elemzése alapján megállapítható, hogy az általunk vizsgált szekvenciák esetén a papillomatózis agresszivitása az E6/E7 régiókban tapasztalt mutációkkal nem magyarázható, mivel valamennyi HPV-11 genom E6/E7 szekvenciája azonos (a referencia M14119 szekvenciához képest azonban megfigyelhetőek eltérések). Az E6/E7 szekvenciákban megfigyelhető variabilitás a szekvencia adatbázisokban szereplő más HPV-11 izolátumok esetén is minimális, tehát az E6/E7 onkogének a HPV-11 esetén jelentős konzerváltságot mutatnak.

Az E5 ORF-ben az általunk vizsgált szekvenciák esetén az E6/E7 régiókhoz hasonló konzerváltság figyelhető meg, valamennyi szekvencia E5 régiója - az elváltozás agresszivitásától függetlenül - azonos. Az adatbázisban található, elsősorban Szlovéniából származó minták esetén az E5 ORF variabilitása némileg nagyobb.

Az általunk vizsgált valamennyi szekvencia esetén az E5/E6/E7 onkogének aminosav szekvenciái azonosak, tehát az RRP agresszivitásában mutatkozó különbségek az egyes betegek esetén az E5/E6/E7 onkogén régiók különbségeivel nem magyarázhatóak. Ez a tény érdekes ellentétet mutat a magas onkogén kockázatú HPV típusok (HPV-16, -18) esetén tapasztaltakkal, ahol az egyes intratípusos variánsok, sőt ugyanazon variáns különböző szekvenciájú izolátumai az E6 régió nukleotid- és aminosav szekvenciáiban különbözőek, ami egyes variánsok E6 fehérjéhez köthető eltérő onkogenitásban nyilvánul meg (Tornesello és mtsai., 2000; Villa és mtsai., 2000; Zehbe és mtsai., 1998 és 2009). Az E7 régióban a magas onkogén kockázatú típusok esetén jelentős konzerváltságot írták le, ami az általunk vizsgált HPV-11 szekvenciák esetén is megfigyelhető (Zehbe és mtsai., 1998).

A E1/E2 régiókban, a 4. beteg esetén detektált egyedi nukleotid polimorfizmusok (E1 ORF: A72E; E2 ORF: Q86K) az E1 és E2 fehérje esetén is a proteinek szekvencia specifikus DNS kötésért felelős régiókban találhatóak. Mindkét fehérje - egyéb funkciók mellett - fontos szerepet játszik a vírusreplikáció szabályozásában, így részben magyarázhatják az elváltozásokból származó HPV-11 szekvencia közepesen agresszív viselkedését (Chiang és mtsai., 1992).

Az 5. betegből származó HPV-11 szekvencia esetén detektált két L1 mutáció a fehérje C-terminális részét érinti, melynek fontos szerepe van a HPV virionok összeszerelődésében (Bishop és mtsai., 2007). A két, C-terminálisan elhelyezkedő mutáció az L1 fehérje negyedleges szerkezetének módosításával befolyásolhatja a neutralizáló antitest epitóp(ok) hozzáférhetőségét a szervezet antitestjei számára és gátolhatja a hatékony immunválasz kialakulását (Yang és mtsai., 2005). Az L1 mutációk immunválaszt befolyásoló hatásán túl elősegíthetik a virionok összeszerelődését és a virionok képződésének folyamatát. Az 5. betegből származó szekvencia csökkent immunogenitását és/vagy fokozott virion képződését a beteg kórlefolrásában megfigyelhető nagyfokú extralaryngeális szóródás is alátámaszthatja.

Jelen tudásunk a különböző agresszivitású RRP elváltozások és az adott elváltozásból származó HPV-11 szekvenciák nukleotid sorrendje (onkogén potenciálja) közötti összefüggést eddig még nem vizsgálták, ill. a nukleotid adatbázisokban elérhető HPV-11 teljes genom szekvenciák esetén releváns, a kórlefolrást is magában foglaló adatok, a referencia HPV-11 genom-, egy thaiföldi- és egy USA-ból származó izolátum kivételével, az értekezés írásának idején nem állnak rendelkezésre.

A különböző agresszivitású elváltozásokból származó HPV-11 szekvenciák szabályozó (LCR) régiójának szekvencia analízise

A HPV-k LCR-e fontos szerepet játszik a vírus replikációjában és a vírus mediált sejtosztódásban (Hoppe-Seyler és Butz, 1994; O'Connor és mtsai., 1995). Az LCR transzaktiváló képessége közvetlenül befolyásolja az onkogén expressziót és ezáltal a vírus onkogén potenciálját, ami magas onkogén kockázatú HPV típusoknál már bizonyított (Lace és mtsai., 2009; Tornesello és mtsai., 2000;). A különböző HPV-16 intratípusos variánsok LCR aktivitása összefüggésbe hozható az adott variáns agresszivitásával (Kämmer és mtsai., 2000).

Vizsgálataink során transzaktivációs kísérletekben tanulmányoztuk az RRP agresszivitása és az egyes HPV-11 szekvenciák LCR-ének transzaktiváló hatásának összefüggését. Kísérleteink során a HEp-2 sejtekben a legalacsonyabb LCR aktivitást a két, egyetlen epizódot okozó, kevésbé agresszív elváltozásból származó HPV-11 szekvencia (1. és 2. beteg) esetén tapasztaltuk, mely feltehetően a két *attenuátor* mutáció következménye lehet.

A közepesen agresszív papillomatózisból (3. és 4. beteg) származó szekvenciák esetén mért magasabb LCR aktivitás a pusztán egyetlen *attenuátor* mutáció jelenléte (4. beteg), ill. a 3. beteg esetén a két *attenuátor* mellett egy *potencírozó* mutáció következménye lehet.

Az 5. beteg agresszív papillomatózisából származó szekvencia LCR aktivitása a közepesen agresszív elváltozásból származó szekvenciákkal közel azonos volt. Az 5. betegből származó HPV-11 szekvencia a 3. beteg két *attenuátor* és egy *potencírozó* mutáció mellett egy további, igen enyhe hatású *attenuátor* mutáció detektálható. Az elváltozás agresszív viselkedése feltehetően az L1 ORF-ben detektált két, aminosav cserét is eredményező mutációra és erre adott gyenge antitest válaszra vezethető vissza. A 6. beteg agresszív papillomatózisából származó szekvencia fokozott LCR aktivitása a 3. és 5. betegnél is detektálható két *attenuátor* és egy *potencírozó* mutáción túl egy további *potencírozó* hatású szekvencia változásra vezethető vissza. Utóbbi mutáció (T7904A) két thaiföldi izolátumban is megtalálható, melyek egyike súlyos, tüdőbe történő szóródást mutató gégepapillomatózisból, míg a másik súlyos, a magas onkogén kockázatú HPV típusokra jellemző, cervikális hámdiszpláziából származik.

Összefoglalva, az egyetlen papillomatózis epizódot okozó HPV-11 szekvenciák esetén csökkent LCR aktivitást és pusztán *attenuátor* mutációkat detektáltunk, míg a relapszusokkal megjelenő elváltozásokból izolált szekvenciák esetén az *attenuátor* mutációk mellett *potencírozó* szekvencia változásokat és a nem agresszív papillomatózisból származó szekvenciákhoz képest fokozott LCR aktivitást tapasztaltunk.

A Génbankban található referencia HPV-11 izolátum (M14119) igen agresszív papillomatózisból származik, amely több mint 70 sebészi kimetszést tett szükségessé (Dartmann és mtsai., 1986). A rendelkezésre álló szekvencia adatok valószínűsíthetjük, hogy a 7546-os nukleotid pozícióban általunk is detektált *attenuátor* mutáció reprezentálhatja a vad típust, míg az igen agresszív referencia HPV-11 izolátum ugyanebben a pozícióban *potencírozó* mutációt tartalmaz.

Eredményeinkhez hasonlóan, a HPV-16 intratípusos variánsok esetén az LCR aktivitás korrelál az adott izolátum patogenitásával (Kammer és mtsai., 2000). Magas onkogén kockázatú HPV típusok esetén az LCR aktivitás közvetlenül hatással van az onkogén expresszióra és ezáltal az adott izolátum onkogén potenciáljára (Lace és mtsai., 2009; Tornesello és mtsai., 2000).

Transzfecciók kísérleteink eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy az általunk vizsgált izolátumok esetén - a HPV-16 intratípusos variánsokhoz hasonlóan - összefüggés lehet az elváltozás agresszivitása és az adott izolátum LCR-ének transzaktivációs képessége között.

A vizsgált HPV-11 szekvenciák filogenetikai analízise

A magas onkogén kockázatú HPV típusok (pl. HPV-16) intratípusos variánsainak geográfiai megoszlásáról, előfordulásáról és az egyes variánsok eltérő onkogenitásáról a HPV kutatás egy jól tanulmányozott területe (Berumen és mtsai., 2001; Tornesello és mtsai., 2011; Xi és mtsai., 2010).

A HPV-16 intratípusos variánsok létezésére számos bizonyíték áll rendelkezésre, melyek a jellemző földrajzi eloszlási mintázat mellett patogenitásukban (onkogén kockázat) is jelentősen különböznek (Berumen és mtsai., 2001; Xi és mtsai., 1997 és 2002). Mindez felvetheti annak a lehetőségét, hogy az RRP-s elváltozások esetén megfigyelhető jelentős agresszivitásbeli különbségek háttérében eltérő onkogén potenciállal rendelkező HPV-11 intratípusos variánsok állhatnak, mely indokoltá teszi az adatbázisokban található HPV-11 szekvenciák filogenetikai analízisét.

Az alacsony onkogén kockázatú HPV típusok által okozott elváltozások (pl. RRP) eltérő agresszivitásának háttérében álló virológiai, vírus-genetikai tényezők feltárása jelen tudásunk szerint a HPV kutatások eddig nem vizsgált területe, az egyes elváltozások agresszivitása és az adott elváltozásból származó mintában detektálható variáns(ok) szekvencia adatai értékes prognosztikai jelentőséggel bírhatnak.

Burk és mtsai. által végzett szekvencia vizsgálatok alapján a HPV-11 izolátumok kapcsán két lehetséges filogenetikai vonal /A1 és A2/ rajzolódik ki (Burk és mtsai., 2011). A két filogenetikai vonal közötti távolság meglehetősen kicsi (0,2%), azonban a HPV-16 intratípusos variánsok esetén megfigyelhető hasonló mintázat kapcsán felvetődhet, hogy a HPV-16-hoz hasonlóan a HPV-11 esetén is léteznek intratípusos variánsok (Yamada és mtsai., 1997). Az általunk vizsgált HPV-11 izolátumok és az adatbázisban található HPV-11 szekvenciák filogenetikai analízise alapján megállapítható, hogy az eltérő anatómiai régiókból (anogenitális és légúti) származó minták mindkét filogenetikai ágon megtalálhatóak, tehát adott anatómiai lokalizációhoz köthető leszármazási vonal nem határozható meg. A

filogenetikai elemzések szerint a legkonzervatívabb régió az E6 ORF, míg a legváltozatosabb az LCR volt.

Az általunk vizsgált hat szekvencia azonos filogenetikai vonalhoz tartozik és származástaniilag közel állnak egymáshoz (a papillomatózis agresszivitásától függetlenül), tehát esetünkben az egyes elváltozásokból származó HPV-11 izolátumok agresszivitásában megfigyelhető különbségek filogenetikai tényezőkkel nem magyarázhatóak. Az esetleg eltérő agresszivitású HPV-11 intratípusos variánsok azonosítását és ezek filogenetikai viszonyainak tanulmányozását nehezíti az a tény, hogy szekvencia adatok kapcsán publikált releváns klinikai adatok meglehetősen hiányosak. Néhány Ázsiából és egy USA-ból származó izolátumon kívül csak Közép-Európából, két szomszédos országból (Szlovénia és Magyarország) állnak rendelkezésre teljes HPV-11 genom szekvenciák a Génbankban, így az intratípusos variánsok és további filogenetikai ágak feltárása a jövőben folytatott munkák feladata.

HPV-11 variáns analízis a CDV kezelés során

A CDV egyike a HPV fertőzések során elsőként felhasznált kemoterápiás szereknek, jóllehet HPV ellen kifejtett pontos hatásmechanizmusa még nem teljesen ismert. A HPV-CDV összefüggésben megjelent közlemények elsősorban a CDV kezelésre adott terápiás választ vizsgálják (Akst és mtsai., 2003; Tanna és mtsai., 2008). A beszámolók szerint a CDV kezelés a HPV fertőzéshez kapcsolható papillomatózisban az esetek mintegy 60%-ában sikerrel jár, a kezelt betegek mintegy 40%-ában csak átmeneti, részleges terápiás siker, vagy annak teljes sikertelensége figyelhető meg (Chadha és James, 2007).

A CDV kezelés terápiás- és virológiai sikertelenségének hátterét vizsgáló tanulmányok azonban jelen tudásunk szerint nem állnak rendelkezésre. A CDV kezelés kezdeti terápiás sikere, majd a relapszusok számának növekedése, ill. a teljes terápiás sikertelenség felvetheti több olyan HPV mutáns/variáns jelenlétét, akár azok CDV kezelés során történő létrejöttét, melyek CDV érzékenysége eltérő lehet. Ezt a feltevést támaszthatja alá a CDV kezelésen átesett, agresszív papillomatózisban szenvedő beteg esetén Major és mtsai által megfigyelt kezdeti, jelentős HPV-11 kópiaszám csökkenés, majd ezt követő markáns növekedés a CDV terápia során (Major és mtsai., 2008).

Az eltérő HPV variánsok jelenlétének vizsgálata papillomatózis elváltozásokban viszonylag ritka, ezek is inkább magas onkogén kockázatú HPV típusokra terjednek ki.

Azonos betegből származó, különböző időpontokban vett sorozatmintákban történő HPV variáns analízis is elsősorban magas onkogén kockázatú HPV típusokra és döntően a variábilis LCR-re terjednek ki, légúti papillomatózisok esetén az ilyen irányú vizsgálatok teljesen hiányoznak (Mayrand és mtsai., 2000; Steinau és mtsai., 2010; Xi mtsai., 2010). Az 1. közleményben leírt vizsgálatok során a CDV kezelés virológiai sikertelenségének vírusgenetikai hátterét vizsgáltuk. A CDV kezelés előtti terápiás-virológiai siker, majd az ezt követő virológiai sikertelenség szakaszaiból származó mintákból izolált HPV-11 szekvenciák E6, E7, E1, E2 régiójának és LCR-ének SSCP- és teljes genom analízise alapján megállapítható, hogy a vizsgált, mintegy 8 évet magában foglaló periódusban (1999-2007) mind a gégeből, mind a lágyszájpadból származó mintákban ugyanazon HPV-11 variáns mutatható ki. A szekvenciák elemzése alapján az eltérő CDV érzékenységgű HPV-11 genomok jelenléte és csökkent CDV érzékenységet biztosító mutációk kialakulása nem igazolható, a CDV terápia virológiai sikertelensége a kezelés során kialakult mutációk létrejöttével esetünkben nem magyarázható, hiszen a CDV kezelést megelőzően, mind pedig azt követően azonos teljes genom szekvenciákat detektáltunk.

A HPV-11 genom nagyfokú stabilitását támaszthatja alá az a tény, hogy a 8 évet felölelő vizsgálati periódus során a HPV tipizálás alapján mindvégig ugyanazon HPV-11 szekvencia volt kimutatható, eltérő HPV-11 altípusok és variánsok nem detektálhatóak. Ez feltehetően arra a tényre vezethető vissza, hogy a papillomavírusok replikációját a nagy másolási hűséggel rendelkező humán DNS polimeráz végzi.

HPV-11 teljes genom- és LCR metilációs analízis a CDV kezelés során

A HPV-k LCR-ére lokalizálódó konszenzus E2 fehérje kötőhelyek szekvenciájukból (5'- ACCG(N)4CGGT-3) adódóan lehetőséget teremtenek az E6/E7 onkogén expresszió CpG metiláció útján történő epigenetikai szabályozásra. Thain és mtsai. megfigyelése szerint az E2 kötőhelyek *in vitro* metilációja gátolja az E2 fehérje LCR-hez történő kötődését, a regulatorikus E2 kötődésének gátlása így hatással lehet az E2 onkogén expressziót szabályozó működésére (Thain és mtsai., 1996).

A referencia HPV-11 genommal (M14119) összehasonlítva a CDV kezelt betegből származó HPV-11 (FR872717) E1, E4, E5, E7 és LCR szekvenciákban detektált mutációk a terápia sikertelenségét és a papillomatózis agresszivitását ugyan magyarázhatják, a kezelés során a vírus kópiaszám változásaira és a kezelés kinetikájának lefutására nem adnak magyarázatot, mivel valamennyi, különböző időpontban vett mintában kimutathatóak. A

vizsgált öt szekvencia E2 kötőhelyinek metilációs mintázata feltehetően nem ad magyarázatot a kezelés virológiai sikertelenségére, mivel a metilációs analízis során mind a kezelést megelőző, mind pedig az követő vizsgálati periódusból származó HPV-11 szekvenciák esetén az E2 kötőhelyek CpG dinukleotidjai egyöntetűen metilálatlanok voltak.

A CDV kezelt beteg kapcsán rendelkezésre álló sorozatminták - a CDV rezisztenciához kapcsolható metilációs analízis mellett - egyedülálló lehetőséget jelentettek a HPV-11 szekvenciák metilációs mintázatának mintegy 8 évet felölelő, időbeli nyomonkövetésére. A vizsgált öt szekvencia analízise a HPV-11 metilációs mintázatának stabilitására utalhat.

Az alacsony onkogén kockázatú HPV típusok LCR-ének metilációs analízisét célzó tanulmányok az értekezés írásának idején meglehetősen hiányosak. A rendelkezésre álló irodalmi adat az aerodigestív papillomákból származó HPV-6 izolátumok LCR-ének metilálatlanságáról számol be (Ure és Forslund, 2012). A rendelkezésre álló csekély számú irodalmi adat szükségessé teszi a terület behatóbb, jelentős mintaszámot magában foglaló analízisét, mely magában foglalhatja a több papillomatózis epizóddal rendelkező izolátumok esetén a metilációs mintázat esetleges változásainak időben történő nyomon követését, esetleg az extralaryngeális szóródást mutató elváltozások esetén az eltérő anatómiai lokalizációkból nyert minták metilációs elemzését is.

Konklúziók

1. Az eltérő agresszivitású elváltozásokból származó HPV-11 szekvenciák esetén többféle HPV-11 variáns jelenléte a vizsgált régiók SSCP- és nukleotid szekvencia analízise alapján nem valószínűsíthető.
2. Az általunk vizsgált HPV-11 szekvencia azonos filogenetikai vonalhoz tartozik és származástaniilag közel állnak egymáshoz (a papillomatózis agresszivitásától függetlenül). A filogenetikai és nukleotid szekvencia adatok relevancia értékét a kórlefolysra vonatkozó adatok jelentősen növelik.
3. Munkánk során elsőként vizsgáltuk a HPV-11 vírusgenom és virulencia közötti lehetséges összefüggést, melynek során megállapítható, hogy az eltérő agresszivitású csoportokra (enyhén-, közepesen agresszív, agresszív) egyértelműen jellemző mutáció nem határozható meg. Az eltérő agresszivitás virológiai tényezőkkel egyértelműen nem magyarázható. Az egyes szekvenciák eltérő transzaktivációs képessége az eltérő agresszivitás egyik lehetséges oka lehet, amelyet magyarázhatnak a kutatócsoportunk által elsőként leírt nukleotid polimorfizmusok az LCR-ben.
4. A CDV-vel kezelt beteg esetén a teljes vizsgálati periódusban (1999-2007) egyetlen HPV-11 variáns mutatható, amely a juvenilis légúti HPV fertőzés esetén a vírusgenom nagyfokú stabilitására utal.
5. A CDV kezelésen átesett beteg esetén a kezelést megelőző időszakból, a terápiás siker, majd a virológiai sikertelenség szakaszából származó HPV-11 szekvenciák SSCP mintázata, nukleotid szekvenciája és az LCR metilációs mintázata azonos, tehát a CDV kezelés kinetikája és a kezelés virológiai sikertelensége mutációkkal, eltérő érzékenységgű variánsok jelenlétével, illetve az LCR metilációs mintázatában történő változásokkal nem magyarázható.

ÖSSZEFOGLALÁS

A HPV által okozott légúti papillomatózis különböző agresszivitású papillomatózus elváltozások formájában nyilvánulhat meg, amelyek a relapszusok és a szükséges sebészeti beavatkozások eltérő gyakorisága, az elváltozások különböző anatómiai régiókra történő kiterjedésre, valamint az esetleges adjuváns terápia szükségessége alapján enyhe, közepesen és fokozott agresszivitású elváltozásokra csoportosíthatóak.

Munkánk során a papillomatózis agresszivitása és virológiai státusza közötti összefüggéseket vizsgáltuk az elváltozásokból származó HPV-11 genomok szekvencia-, variáns- és filogenetikai analízisével. Munkánk másik vonalát egy cidofovir kezeléssel átesett beteg sorozatmintáinak szekvencia- és metilációs analízise képezi, melynek során a cidofovir kezelés sikertelenségének virológiai hátterét vizsgáltuk.

A különböző agresszivitású elváltozásokból származó HPV-11 genomok szekvencia analízise alapján megállapítható, hogy az egyes RRP elváltozások agresszivitásában megfigyelhető különbségek az egyes HPV-11 szekvenciák nukleotid/aminósav sorrendjének különbségeivel egyértelműen nem magyarázhatóak, az eltérő agresszivitás nem hozható összefüggésbe pusztán az adott (kevésbé, közepesen vagy fokozott) agresszivitást mutató csoportra jellemző mutációval/szekvencia változással.

Az eltérő agresszivitás lehetséges, bár nem egyértelmű magyarázata az LCR transzaktiváló hatásában megfigyelhető különbségek lehetnek. Az egyes szekvenciák esetén a virális transzkripciót szabályozó E1/E2, ill. az L1 kapszid fehérjében található mutációk magyarázhatják annak agresszívabb viselkedését. Az agresszivitás mértéke és a nukleotid/aminósav szekvencia különbségek közötti összefüggés közötti kapcsolat vizsgálatát nehezíti az a tény, hogy a rendelkezésre álló HPV-11 szekvenciák kapcsán a hozzáférhető releváns klinikai adatok erősen limitáltak.

Az agresszivitás mértékében megfigyelhető különbségek virológiai tényezőkkel egyértelműen nem magyarázhatóak, az eltérő agresszivitásban feltehetően fontos szerepet kap a beteg egyedi génexpressziós profilja, immunológiai státusza, immunválasza is, ill. az esetleges más vírusokkal történő koinfekció is.

A CDV kezelt beteg sorozatmintáinak szekvencia és SSCP vizsgálata alapján megállapítható, hogy a vizsgálati periódus (1999-2007) során valamennyi anatómiai lokalizációban ugyanazon HPV-11 típus detektálható, melyek LCR-e azonos metilációs mintázatot mutatott, a kezelés virológiai sikertelensége HPV-11 mutációkkal és eltérő érzékenységű HPV-11 variánsokkal nem magyarázható.

SUMMARY

Previous studies on HPV-16 isolates described five distinct variants of HPV-16. Some of these variants were associated with increased oncogenic potential. Several studies revealed that the differences in the severity of HPV-16 and other high-risk HPV type-related (HPV-18, -33, -52) diseases can be attributed to single nucleotide polymorphisms or deletions in the HPV genome. These findings suggest that such nucleotide polymorphisms in the HPV genome may influence the clinical course of low-risk HPV-related diseases such as recurrent respiratory papillomatosis (RRP). Two recently published papers reported that two HPV-11 genetic lineage may exist based on the sequence analysis of HPV-11 isolates from Slovenia. Unfortunately, clinical data are not reported, therefore, the link between the aggressivity of HPV-11 related diseases and HPV-11 sequence polymorphism remained unclear. Cidofovir is one of the most frequently applied antiviral agent in RRP therapy. However, authors reported that that 60% of CDV-treated RRP show partial or no response to the treatment. Present study examined the role genetic alterations in the virological failure of CDV therapy in the case of a highly aggressive papillomatosis. In addition, we studied the feasible association of nucleotide alterations with the pathogenic potential of HPV-11 isolates from two weakly aggressive solitary papillomas, two moderately and two highly aggressive RRP.

Consistent changes in the virus genome explaining the clinical behaviour of RRP with different severity associated with HPV11 were not identified; virulence seems to be determined by interaction of multiple genetic differences. LCR activities corresponded well to severity, except one case with L1 alterations. The variability of oncoproteins does not seem to play a role; this finding contrasts the situation of the high oncogenic risk types HPV16 and HPV18, where intratypic variants differ in the sequences of the E6/E7 ORFs. All Hungarian sequences belonged to phylogenetic lineage A2 and clustered closely together, excepting that of Patient 6 from highly aggressive RRP, regardless of severity of the disease caused.

Our data showed that virological failure of CDV therapy was not associated with genetic or epigenetic changes in the HPV-11 genome suggesting that cidofovir action may depend more heavily on the host.

IRODALOMJEGYZÉK

Hivatkozott közlemények jegyzéke

Aaltonen LM, Wahlstrom T, Rihkanen M, Vaheri A (1998). A novel method to culture laryngeal human papillomaviruspositive epithelial cells produces papillomas-type cytology on collagen rafts. *Eur J Cancer* 34:1111–1116.

Abbate EA, Berger JM, Botchan MR (2004). The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes Dev* 18:1981–1996.

Abdulkarim B, Sabri S, Deutsch E, Chagraoui H, Maggiorella L, Thierry J, Eschwege F, Vainchenker W, Chouaib S, Bourhis J (2002). Antiviral agent cidofovir restores p53 function and enhances the radiosensitivity in HPV-associated cancers. *Oncogene* 21:2334–2346.

Abramson AL, Steinberg BM, Winkler B (1987). Laryngeal papillomatosis: clinical, histopathologic and molecular studies. *Laryngoscope* 97:678–685.

Agarwal C, Hembree JR, Rorke EA, Eckert RL. (1994) Interferon and retinoic acid suppress growth of human papillomavirus type 16 immortalized cervical epithelial cells, but only interferon suppresses the level of the human papillomavirus transforming oncogenes. *Cancer Res* 54:2108–2112.

Alberts DS, Coulthard SW, Meyskens FL Jr (1986). Regression of aggressive laryngeal papillomatosis with 13-cis-retinoic acid (accutane). *Journal of Biological Response Modifiers* 5:124–128.

Andrei G, Snoeck R, Piette J, Delvenne P, De Clercq E (1998). Antiproliferative effects of acyclic nucleoside phosphonates on human papillomavirus (HPV)-harboring cell lines compared with HPV-negative cellines. *Oncol Res* 10:523–531.

Andrei G, Snoeck R, Schols D, De Clercq E (2000). Induction of apoptosis by cidofovir in human papillomavirus (HPV)-positive cells. *Oncol Res* 12:397-408.

Apt D, Chong T, Liu Y, Bernard HU (1993). Nuclear factor I and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus type 16. *J Virol* 67:4455-4463.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (editors) (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol. 1. John Wiley and Sons, New York.

Badal V, Chuang LS, Tan EH, Badal S, Villa LL, Wheeler CM, Li BF, Bernard HU (2003). CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J Virol* 77:6227-6234.

Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 61:962-971.

- Bedell MA, Hudson JB, Golub TR, Turyk ME, Hosken M, Wilbanks GD, Laimins LA (1991). Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *J Virol* 65:2254-2260.
- Bell R, Hong WK, Itri LM, McDonald G, Strong MS (1988). The use of cis-retinoic acid in recurrent respiratory papillomatosis of the larynx: a randomized pilot study. *American Journal of Otolaryngology* 9:161-164.
- Ben-Bassat H, Rosenbaum-Mitrani S, Hartzstark Z, Shlomai Z, Kleinberger-Doron N, Gazit A, Plowman G, Levitzki R, Tsvieli R, Levitzki A (1997). Inhibitors of epidermal growth factor receptor kinase and of cyclin-dependent kinase 2 activation induce growth arrest, differentiation, and apoptosis of human papilloma virus 16-immortalized human keratinocytes. *Cancer Res* 57:3741-3750.
- Bennett RS, Powell KR (1987). Human papillomaviruses: associations between laryngeal papillomas and genital warts. *Pediatr Infect Dis J* 6:229-232.
- Benson JD, Lawande R, Howley PM (1997). Conserved interaction of the papillomavirus E2 transcriptional activator proteins with human and yeast TFIIB proteins. *J Virol* 71:8041-8047.
- Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, 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* 93:1325-1330.
- Bhattacharjee B, Sengupta S (2006). CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology* 354:280-285.
- Bishop B, Dasgupta J, Chen XS (2007). Structure-based engineering of papillomavirus major capsid L1: controlling particle assembly. *Virol J* 4:3.
- Blumin JH, Handler EB, Simpson CB, Osipov V, Merati AL (2009). Dysplasia in adults with recurrent respiratory papillomatosis: incidence and risk factors. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 118:481-485.
- Boner W, Taylor ER, Tsirimonaki E, Yamane K, Campo MS, Morgan IM (2002). A Functional interaction between the human papillomavirus 16 transcription/replication factor E2 and the DNA damage response protein TopBP1. *J Biol Chem* 277:22297-22303.
- Bostrom B, Sidman J, Marker S, Lander T, Drehner D (2005). Gefitinib therapy for life-threatening laryngeal papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 131:64-67.
- Bouvard V, Storey A, Pim D, Banks L (1994). Characterization of human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J* 13:5451-5459.
- Boyer SN, Wazer DE, Band V (1996). E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* 56:4620-4624.

- Bradlow HL, Michnovicz J, Telang NT, Osborne MP (1991). Effects of dietary indole-3-carbinol on estradiol metabolism and spontaneous mammary tumors in mice. *Carcinogenesis* 12:1571-1574.
- Bream GL, Ohmstede CA, Phelps WC (1993). Characterization of human papillomavirus type 11 E1 and E2 proteins expressed in insect cells. *J Virol* 67:2655-2663
- Brimer N, Lyons C, Vande Pol SB (2007). Association of E6AP (UBE3A) with Human Papillomavirus Type 11 E6 Protein. *Virology* 358:303–310.
- Broekema FI és Dikkers FG (2008). Side-effects of cidofovir in the treatment of recurrent respiratory papillomatosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 265:871-879.
- Buck CB, Cheng N, Thompson CD, Lowy D, Steven AC, Schiller JT, Trus BL (2008). Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virol* 82:5190–5197.
- Buck CB, Thompson CD, Pang YY, Lowy DR, Schiller JT (2005). Maturation of papillomavirus capsids. *J Virol* 79:2839-2846.
- Carrillo E, Garrido E, Gariglio P (2004). Specific in vitro interaction between papillomavirus E2 proteins and TBP-associated factors. *Intervirology* 47:342-349.
- Centers for Disease Control and Prevention, Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines (2002). vol. 51, no. RR-6, MMWR 2002
- Chadha NK, James AL (2007). Antiviral agents for the treatment of recurrent respiratory papillomatosis: a systematic review of the English-language literature. *Otolaryngol Head Neck Surg* 136:863-869.
- Chaiwongkot A, Vinokurova S, Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingoes B, Kleebkaow P, Chumworathayi B, Patarapadungkit N, Reuschenbach M, Doeberitz MV (2012). Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions. *Int J Cancer* 132:2087-2094.
- Chen SL, Huang CH, Tsai TC, Lu KY, Tsao YP (1996). The regulation mechanism of c-jun and junB by human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein. *Arch Virol* 141:791–800.
- Chen SL, Mounts P (1990). Transforming activity of E5a protein of human papillomavirus type 6 in NIH 3T3 cells and C127 cells. *J Virol* 64:3226–3233.
- Chetri DK, Shapiro NL (2003). A scheduled protocol for the treatment of juvenile recurrent respiratory papillomatosis with intralesional cidofovir. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129:1081-1085.
- Chiang CM, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT (1992). Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5799-5803.
- Chin MT, Hirochika R, Hirochika H, Broker TR, Chow LT (1988). Regulation of human papillomavirus type 11 enhancer and E6 promoter by activating and repressing proteins from the E2 open reading frame: functional and biochemical studies. *J Virol* 62:2994–3002.
- Chong T, Apt D, Gloss B, Isa M, Bernard HU (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* 65:5933-5943.
- Chow LT, Broker TR, Steinberg BM (2010). The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS* 118:422-449.
- Chung CT, Niemela SL, Miller RH (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2172–2175
- Cihlar T, Chen MS (1996). Identification of enzymes catalyzing two-step phosphorylation of cidofovir and the effect of cytomegalovirus infection on their activities in host cells. *Mol Pharmacol* 50:1502–1510.
- Clower RV, Fisk JC, Melendy T (2006). Papillomavirus E1 protein binds to and stimulates human topoisomerase I. *J Virol* 80:1584-1587.
- Cohn AM, Kos JT II, Taber LH, Adam E (1981). Recurring laryngeal papilloma. *Am J Otolaryngol* 2:129–132.
- Conrad M, Bubb VJ, Schlegel R (1993). The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol* 67:6170–6178.
- Conrad M, Goldstein D, Andresson T, Schlegel R (1994). The E5 protein of HPV-6, but not HPV-16, associates efficiently with cellular growth factor receptors. *Virology* 200:796–800.
- Cook TA, Brunschwig JP, Butel JS, Cohn AM, Goepfert H, Rawls WE (1973). Laryngeal papilloma: etiologic and therapeutic considerations. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 82:649–655.
- Crusius K, Auvinen E, Steuer B, Gaissert H, Alonso A (1998). The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCaT. *Exp Cell Res* 241:76–83.
- Cueille N, Nougarede R, Mechali F, Philippe M, Bonne-Andrea C (1998). Functional interaction between the bovine papillomavirus virus type 1 replicative helicase E1 and cyclin E-Cdk2. *J Virol* 72:7255-7262.
- Dartmann K, Schwarz E, Gissmann L, zur Hausen H (1986). The nucleotide sequence and genome organization of human papillomavirus type 11. *Virology* 151:124-130.
- De Clercq E. Therapeutic potential of Cidofovir (HPMPC, Vistide) for the treatment of DNA virus (i.e. herpes-, papova-, pox- and adenovirus) infections (1996). *Verh K Acad Geneesk Belg* 58:19-47.
- de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ (1995). The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 76:1057–1062.
- de Villiers EM (2001). Taxonomic classification of papillomaviruses. *Papillomavirus Rep* 12: 57–63.

- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27
- Dedo HH, Yu KC (2001). CO₂ laser treatment in 244 patients with respiratory papillomatosis. *Laryngoscope* 111:1639–1644.
- Degenhardt YY és Silverstein S (2001). Gps2, a protein partner for human papillomavirus E6 proteins. *J Virol* 75:151–160.
- Degenhardt YY és Silverstein S (2001). Interaction of zyxin, a focal adhesion protein, with the E6 protein from human papillomavirus type 6 results in its nuclear translocation. *J Virol* 75:11791–11802.
- Derkay CS (1995). Task Force on Recurrent Respiratory Papillomas. A preliminary report. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121:1386–1391.
- Derkay CS (2001). Recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope* 111:57-69.
- Derkay CS (2005). Multi-Disciplinary Task Force on Recurrent Respiratory Papillomas. Cidofovir for recurrent respiratory papillomatosis (RRP): a re-assessment of risks. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 69:1465-1467.
- Derkay CS, Wiatrak B (2008). Recurrent respiratory papillomatosis.: a review. *Laryngoscope* 118:1236-47
- Ding DC, Chiang MH, Lai HC, Hsiung CA, Hsieh CY, Chu TY (2009). Methylation of the long control region of HPV16 is related to the severity of cervical neoplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 147:215-220.
- Donne AJ, Hampson L, He XT, Rothera MP, Homer JJ, Hampson IN (2009). Cidofovir induces an increase in levels of low-risk and high-risk HPV E6. *Head Neck* 31:893-901.
- Donne AJ, Hampson L, He XT, Rothera MP, Homer JJ, Hampson IN (2007). Effects of cidofovir on a novel cell-based test system for recurrent respiratory papillomatosis. *Head Neck* 29:741-50.
- Donne AJ, Rothera MP, Homer JJ (2008). Scientific and clinical aspects of the use of cidofovir in recurrent respiratory papillomatosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 72:939-944.
- 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* 352:824–827.
- Dürst M, Croce CM, Gissmann L, Schwarz E, Huebner K (1987). Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:1070-1074.
- Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243:934-93.
- Eicher SA, Taylor-Cooley LD, Donovan DT (1994). Isotretinoin therapy for recurrent respiratory papillomatosis. *Archives of Otolaryngology – Head & Neck Surgery* 120:405–409.

Endres DR, Bauman NM, Burke D, Smith RJ (1994). Acyclovir in the treatment of recurrent respiratory papillomatosis. A pilot study. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology* 103:301–305.

Enzenauer C, Mengus G, Lavigne A, Davidson I, Pfister H, May M (1998). Interaction of human papillomavirus 8 regulatory proteins E2, E6 and E7 with components of the TFIID complex. *Intervirology* 41:80-90.

Fensterl V, Sen GC (2009). Interferons and viral infections. *Biofactors* 35:14-20

Fernandez AF, Rosales C, Lopez-Nieva P, Graña O, Ballestar E, Ropero S, Espada J, Melo SA, Lujambio A, Fraga MF, Pino I, Javierre B, Carmona FJ, Acquadro F, Steenbergen RD, Snijders PJ, Meijer CJ, Pineau P, Dejean A, Lloveras B, Capella G, Quer J, Buti M, Esteban JI, Allende H, Rodriguez-Frias F, Castellsague X, Minarovits J, Ponce J, Capello D, Gaidano G, Cigudosa JC, Gomez-Lopez G, Pisano DG, Valencia A, Piris MA, Bosch FX, Cahir-McFarland E, Kieff E, Esteller M (2009). The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer. *Genome Res* 19:438-51.

Frattini MG, Laimins LA (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* 91:12398-12402.

Frattini MG, Lim HB, Laimins LA (1996). In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3062-3067.

Fredericks BD, Balkin A, Daniel HW, Schonrock J, Ward B, Frazer IH (1993). Transmission of human papillomaviruses from mother to child. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 33:30–32.

Freed GL és Derkay CS (2006). Prevention of recurrent respiratory papillomatosis: role of HPV vaccination. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 70:1799-1803.

Gage JR, Meyers C, Wettstein FO (1990). The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol* 64:723–730.

Gale N, Poljak M, Kambic V, Ferluga D, Fischinger J (1994). Laryngeal papillomatosis: molecular, histopathological, and clinical evaluation. *Virchows Arch* 425:291-295.

Giri I és Yaniv M (1988). Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *EMBO J* 7:2823–2829.

Gupta HT, Robinson RA, Murray RC, Karnell LH, Smith RJ, Hoffman HT (2010). Degrees of dysplasia and the use of cidofovir in patients with recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope* 120:698-702.

Hall JE, Chen K, Yoo MJ, Fletcher KC, Ossoff RH, Garrett CG (2011). Natural progression of dysplasia in adult recurrent respiratory papillomatosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 144:252-256.

Hallden C, Majmudar B (1986). The relationship between juvenile laryngeal papillomatosis and maternal condylomata acuminata. *J Reprod Med* 31:804–807.

Hallmo P, Naess O (1991). Laryngeal papillomatosis with human papillomavirus DNA contracted by a laser surgeon. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 248:425–427.

Harris SF és Botchan MR (1999). Crystal structure of the human papillomavirus type 18 E2 activation domain. *Science* 284:1673–1677.

Haugen TH, Turek LP, Mercurio FM, Cripe TP, Olson BJ, Anderson RD, Seidl D, Karin M, Schiller J (1988). Sequence-specific and general transcriptional activation by the bovine papillomavirus-1 E2 transactivator require an N-terminal amphipathic helix-containing E2 domain. *EMBO J* 7:4245–4253.

Healy GB, Gelber RD, Trowbridge AL, Grundfast KM, Ruben RJ, Price KN (1998). Treatment of recurrent respiratory papillomatosis with human leukocyte interferon. Results of a multicenter randomized clinical trial. *N Engl J Med* 319:104–107.

Heck DV, Yee CL, Howley PM, Munger K (1992). Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4442–4446.

Heinzel PA, Chan SY, Ho L, O'Connor M, Balaram P, Campo MS, Fujinaga K, Kiviat N, Kuypers J, Pfister H, Steinberg BM, Tay SK, Villa LL, Bernard HU (1995) Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol* 33:1746-1754.

Heinzel PA, Chan SY, Ho L, O'Connor M, Balaram P, Campo MS, Fujinaga K, Kiviat N, Kuypers J, Pfister H, és mtsai (1995). Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol* 33:1746-1754.

Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, Scott SR, Rush BB, Lawler P, Sherman ME, Kurman RJ, Manos MM (1994). Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 169:235–240.

Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R, Rodriguez A, Bratti MC, Sherman ME, Scarpidis U, Lin QQ, Terai M, Bromley RL, Buetow K, Apple RJ, Burk RD (2001). Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 93:315-318.

Hoppe-Seyler F és Butz K (1994). Cellular control of human papillomavirus oncogene transcription. *Mol Carcinog* 10:134-141.

Hoppe-Seyler F, Butz K, zur Hausen H (1991). Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1. *J Virol* 65:5613-5618.

Howley P és Lowy D (2001). Papillomaviruses and their replication. In: Knipe D, Howley P (szerk) *Fields Virology* 4th Edition. Lippincott-Raven, Philadelphia, 2231-2264

Howley P és Lowy D (2007). Papillomaviruses. In: Knipe, DM.; Howley, PM., editors. *Fields Virology*. Vol. 5. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, PA: 2007. p. 2299-2354.

HPA (2006). Trends in anogenital warts and anogenital herpes simplex virus infection in the United Kingdom: 1996 to 2005. *CDR Wkly* 16:1–4

Huh K, Zhou X, Hayakawa H, Cho JY, Libermann TA, Jin J, Harper JW, Munger K (2007). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol* 81:9737–9747

Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J* 10:4129-4235.

Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM (1993a). 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* 13:775–784.

Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM (1993b). Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol* 13:4918–4927.

Hummel M, Hudson JB, Laimins LA (1992). Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J Virol* 66:6070-6080.

ICTV (2002) The International Code of Virus Classification and Nomenclature. In: International Committee on Taxonomy of Viruses VD, International Union of Microbiological Societies. (http://ictvdb.bio-mirror.cn/ictv/fs_papil.htm)

Ingimarsson S, Cantell K, Strander H (1979). Side effects of long-term treatment with human leukocyte interferon. *Journal of Infectious Diseases* 140:560–563.

Ishiji T, Lace MJ, Parkkinen S, Anderson RD, Haugen TH, Cripe TP, Xiao JH, Davidson I, Chambon P, Turek LP (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* 11:2271-2281.

Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF (1995). Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* 69:2989-97.

Johnson JA, Hochkeppel HK, Gangemi JD (1999). IFN-tau exhibits potent suppression of human papillomavirus E6/E7 oncoprotein expression. *J Interferon Cytokine Res* 10:1107-1116.

Johnston D, Hall H, DiLorenzo TP, Steinberg BM (1999). Elevation of the epidermal growth factor receptor and dependent signaling in human papillomavirus-infected laryngeal papillomas. *Cancer Res* 59:968-974.

Kabsch K és Alonso A (2002). The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol* 76:12162-12172.

Kalantari M, Calleja-Macias IE, Tewari D, Hagmar B, Lie K, Barrera-Saldana HA, Wiley DJ, Bernard HU (2004). Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol* 78:12762-12772.

- Kämmer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, 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* 81:1975-1981.
- Kashima H, Mounts P, Leventhal B, Hruban RH (1993). Sites of predilection in recurrent respiratory papillomatosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 102:580-583.
- Kashima HK, Kessis T, Mounts P, Shah K (1991). Polymerase chain reaction identification of human papillomavirus DNA in CO2 laser plume from recurrent respiratory papillomatosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 104:191-195.
- Kashima HK, Shah F, Lyles A, Glackin R, Muhammad N, Turner L, Van Zandt S, Whitt S, Shah K (1992). A comparison of risk factors in juvenile-onset and adult-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope* 102:9-13
- Kikuchi K, Taniguchi A, Yasumoto S (1996). Induction of the HPV16 enhancer activity by Jun-B and c-Fos through cooperation of the promoter-proximal AP-1 site and the epithelial cell type-specific regulatory element in fibroblasts. *Virus Genes* 13:45-52.
- Kim K, Garner-Hamrick PA, Fisher C, Lee D, Lambert PF (2003). Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J Virol* 77:12450-12459.
- Kiroglu M, Cetik F, Soylu L, Abedi A, Aydogan B, Akcali C, Kiroglu F & Ozsahinoglu C (1994). Acyclovir in the treatment of recurrent respiratory papillomatosis: a preliminary report. *American Journal of Otolaryngology* 15:212-214.
- Ko MJ és Chu CY (2004). Disseminated human papillomavirus type 11 infection in a patient with pemphigus vulgaris: confirmed by DNA analysis. *J Am Aca Dermatol* 51:190-S193.
- Koutsky LA, Galloway DA, Holmes KK (1988). Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol Rev* 10:122-163.
- Ksiazek J, Prager JD, Sun GH, Wood RE, Arjmand EM (2011). Inhaled cidofovir as an adjuvant therapy for recurrent respiratory papillomatosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 144:639-641.
- Kuhne C és Banks L (1998). E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box. *J Biol Chem* 273:34302-34309.
- Kukimoto I, Aihara S, Yoshiike K, Kanda T (1998). Human papillomavirus oncoprotein E6 binds to the C-terminal region of human minichromosome maintenance 7 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 249:258-262.
- Lace MJ, Isacson C, Anson JR, Lörincz AT, Wilczynski SP, Haugen TH, Turek LP (2009). Upstream regulatory region alterations found in human papillomavirus type 16 (HPV-16) isolates from cervical carcinomas increase transcription, ori function, and HPV immortalization capacity in culture. *J Virol* 83:7457-7466.
- Lalezari JP, Holland GN, Kramer F, McKinley GF, Kemper CA, Ives DV, Nelson R, Hardy WD, Kuppermann BD, Northfelt DW, Youle M, Johnson M, Lewis RA, Weinberg DV, Simon GL, Wolitz RA, Ruby AE, Stagg RJ, Jaffe HS (1998). Randomized, controlled study of the safety and efficacy of intravenous cidofovir for the treatment of relapsing

cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 17:339–344.

Lee D, Hwang SG, Kim J, Choe J (2002). Functional interaction between p/CAF and human papillomavirus E2 protein. *J Biol Chem* 277:6483-6489.

Lee D, Lee B, Kim J, Kim DW, Choe J (2000). cAMP response element-binding protein-binding protein binds to human papillomavirus E2 protein and activates E2-dependent transcription. *J Biol Chem* 275:7045-7051.

Lee K, Magalhaes I, Clavel C, Briolat J, Birembaut P, Tommasino M, Zehbe I (2008). Human papillomavirus 16 E6, L1, L2 and E2 gene variants in cervical lesion progression. *Virus Res* 131:106-110.

Leptak C, Ramon Y, Cajal S, Kulke R, Horwitz BH, Riese DJ II, Dotto GP, DiMaio D (1991). Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the E5 genes of bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16. *J Virol* 65:7078–7083.

Leventhal BG, Kashima HK, Mounts P, Thurmond L, Chapman S, Buckley S, Wold D (1991). Long-term response of recurrent respiratory papillomatosis to treatment with lymphoblastoid interferon alfa-N1. Papilloma Study Group. *New England Journal of Medicine* 325:613–617.

Leventhal BG, Kashima HK, Weck PW, Mounts P, Whisnant JK, Clark KL, Cohen S, Dedo HH, Donovan DJ, Fearon BW, et al (1988). Randomized surgical adjuvant trial of interferon alfa-n1 in recurrent papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 114:1163–1169.

Lin SB, Huang SS, Choo KB, Chen PJ, Au LC (1995). Inhibition of alpha-fetoprotein production in a hepatoma cell line by antisense oligonucleotide analogues. *J Biochem* 117:1100-1104.

Liu JS, Kuo SR, Broker TR, Chow LT (1995). The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication. *J Biol Chem* 270:27283-27291.

Lott DG és Krakovitz PR (2009). Squamous cell carcinoma associated with intralesional injection of cidofovir for recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope* 119:567-570.

Lu B, Kumar A, Castellsagué X, Giuliano AR (2011). Efficacy and safety of prophylactic vaccines against cervical HPV infection and diseases among women: a systematic review & meta-analysis. *BMC Infect Dis* 11:13.

Major T, Sziklai I, Czeglédy J, Gáll T, Gergely L, Szarka K (2008). Follow-up of HPV DNA copy number in cidofovir therapy of recurrent respiratory papillomatosis. *Anticancer Res* 28:2169-2174.

Malmgaard L (2004). Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res* 24:439-54.

Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM (1989). The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cell* 7:209–214.

- Maufort JP, Shai A, Pitot HC, Lambert PF (2010). A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res* 70:2924–2931.
- Maver PJ, Kocjan BJ, Seme K, Potočnik M, Gale N, Poljak M (2011). Prevacination genomic diversity of human papillomavirus genotype 11: a study on 63 clinical isolates and 10 full-length genome sequences. *J Med Virol* 83:461–470.
- Mayrand MH, Coutlée F, Hankins C, Lapointe N, Forest P, de Ladurantaye M, Roger M (2000). Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis. *J Clin Microbiol* 38:3388–3393.
- McBride AA, Romanczuk H, Howley PM (1991). The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* 266:18411–18414.
- McBride AA, Oliveira JG, McPhillips MG (2006). Partitioning viral genomes in mitosis: same idea, different targets. *Cell Cycle* 5:1499–1502.
- McGlennen RC, Adams GL, Lewis CM, Faras AJ, Ostrow RS (1993). Pilot trial of ribavirin for the treatment of laryngeal papillomatosis. *Head Neck* 15:504–513.
- McMurray JS, Connor N, Ford CN (2008). Cidofovir efficacy in recurrent respiratory papillomatosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 117:477–483.
- Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J (2003). Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol* 77:10186–10201.
- Moody CA, Laimins LA (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 10:550–60.
- Morgan AH, Zitch RP (1986). Recurrent respiratory papillomatosis in children: a retrospective study of management and complications. *Ear Nose Throat J* 65:19–28.
- Mounts P, Shah KV, Kashima H (1982). Viral etiology of juvenile and adult-onset squamous papilloma of the larynx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:5425–5429.
- Mudry P, Vavrina M, Mazanek P, Machalova M, Litzman J, Sterba J (2011). Recurrent laryngeal papillomatosis: successful treatment with human papillomavirus vaccination. *Arch Dis Child* 96:476–477.
- Muller A, Ritzkowsky A, Steger G (2002). Cooperative activation of human papillomavirus type 8 gene expression by the E2 protein and the cellular coactivator p300. *J Virol* 76:11042–11053.
- Munger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM (1989). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* 8:4099–4105.
- Munoz N, Bosch FX, De Sanjos ES, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ (2003). International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer

Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348:518-527.

Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 78:11451–11460.

Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM (1989). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* 8:4099-4105.

Münger K., Phelps WC, Bubb V, Howley PM és Schlegel R (1989). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 63:4417–4421.

Naiman AN, Roger G, Gagnieu MC, Bordenave J, Mathaut S, Ayari S, Nicollas R, Bour JB, Garabedian N, Froehlich P (2004). Cidofovir plasma assays after local injection in respiratory papillomatosis. *Laryngoscope* 114:1151– 1156.

Newfield L, Goldsmith A, Bradlow HL, Auburn K (1993). Estrogen metabolism and human papillomavirus-induced tumors of the larynx: chemo-prophylaxis with indole-3-carbinol. *Anticancer Res* 13:337-41.

Neyts J, Snoeck R, Schols D, Balzarini J, De Clercq E (1990). Selective inhibition of human cytomegalovirus DNA synthesis by (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxy-propyl)cytosine [(S)-HPMPC] and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine (DHPG). *Virology* 179:41–50.

O'Connor M, Chan SY, Bernard HU (1995). Transcription factor binding sites in the long control region of genital HPVs. In: Myer G, Bernard HU, Delius H, Baker C, Icenogle J, Halpern A, Wheeler C (szerkesztők) 1995. *Human Papillomaviruses 1995 Compendium*, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, part III-A:21-40.

O'Connor MJ, Stünkel W, Koh CH, Zimmermann H, Bernard HU (2000). The differentiation-specific factor CDP/Cut represses transcription and replication of human papillomaviruses through a conserved silencing element. *J Virol* 74:401–410.

O'Connor MJ, Stünkel W, Zimmermann H, Koh CH, Bernard HU (1998). A novel YY1-independent silencer represses the activity of the human papillomavirus type 16 enhancer, *J Virol* 72:10083–10092.

O'Connor MJ, Tan SH, Tan CH, Bernard HU (1996). YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J Virol* 70:6529–6539.

Oh ST, Longworth MS, Laimins LA (2004). Roles of the E6 and E7 Proteins in the Life Cycle of Low-Risk Human Papillomavirus Type 11. *J Virol* 78:2620–2626

Ozbun MA, Meyers C (1997). Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J Virol* 71:5161-5172.

Ozbun MA, Meyers C (1998). Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. *J Virol* 72:2715-2722.

- Park RB, Androphy EJ (2002). Genetic analysis of high-risk E6 in episomal maintenance of human papillomavirus genomes in primary human keratinocytes. *J Virol* 76:11359-11364.
- Pasquale K, Wiatrak B, Woolley A, Lewis L (2003). Microdebrider versus CO2 laser removal of recurrent respiratory papillomas: a prospective analysis. *Laryngoscope* 113:139–143.
- Peh WL, Brandsma JL, Christensen ND, Cladel NM, 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* 78:2142-2151.
- Peh WL, Middleton K, Christensen N, Nicholls P, Egawa K, Sotlar K, Brandsma J, Percival A, Lewis J, Liu WJ, Doorbar J (2002). Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. *J Virol* 76: 10401-10416.
- Petti L, Nilson L, DiMaio D (1991). Activation of the platelet-derived growth factor receptor by the bovine papillomavirus E5 transformin protein. *EMBO J* 10:845–855.
- Pignatari S, Smith EM, Gray SD (1992). Detection of human papillomavirus infection in diseased and nondiseased
- Piyathilake CJ, Macaluso M, Alvarez RD, Chen M, Badiga S, Edberg JC, Partridge EE, Johanning GL (2011). A higher degree of methylation of the HPV 16 E6 gene is associated with a lower likelihood of being diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 117:957-63.
- Pou AM, Rimell FL, Jordan JA, Shoemaker DL, Johnson JT, Barua P, Post JC, Ehrlich GD (1995). Adult respiratory papillomatosis: human papillomavirus type and viral coinfections as predictors of prognosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104:758–762.
- Pransky SM, Brewster DF, Magit AE, Kearns DB (2000). Clinical update on 10 children treated with intralesional cidofovir injections for severe recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126:1239-1243.
- Pransky SM, Magit AE, Kearns DB, Kang DR, Duncan NO (1999). Intralesional cidofovir for recurrent respiratory papillomatosis in children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 125:1143-1148.
- Quick CA, Watts SL, Krzyzek RA, Faras AJ (1980). Relationship between condylomata and laryngeal papillomata. Clinical and molecular virological evidence. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 89:467–471.
- Rank NM, Lambert PF (1995). Bovine papillomavirus type 1 E2 transcriptional regulators directly bind two cellular transcription factors, TFIID and TFIIB. *J Virol* 69: 6323-6334.
- Reeves WC, Ruparelia SS, Swanson KI, Derkay CS, Marcus A, Unger ER (2003). National registry for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129:976–982.
- Rehtanz M, Schmidt HM, Warthorst U, Steger G (2004). Direct interaction between nucleosome assembly protein 1 and the papillomavirus E2 proteins involved in activation of transcription. *Mol Cell Biol* 24:2153-2168.

- Rimell FL, Shoemaker DL, Pou AM, Jordan JA, Post JC, Ehrlich GD (1997). Pediatric respiratory papillomatosis: prognostic role of viral typing and cofactors. *Laryngoscope* 107:915–918.
- Roberts S, Ashmole I, Johnson GD, Kreider JW, Gallimore PH (1993). Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology* 197:176–187.
- Rogel-Gaillard C, Pehau-Arnaudet G, Breitburd F, Orth G (1993). Cytopathic effect in human papillomavirus type 1-induced inclusion warts: in vitro analysis of the contribution of two forms of the viral E4 protein. *J Invest Dermatol* 101:843–851.
- Romanczuk H, Thierry F, Howley PM (1990). Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J Virol* 64:2849–2859.
- Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP (2009). Perinatal transmission of human papillomavirus DNA. *Virology Journal* 6:83.
- Ruesch MN, Laimins LA (1998). Human papillomavirus oncoproteins alter differentiation-dependent cell cycle exit on suspension in semisolid medium. *Virology* 250:19-29.
- Ruparelia S, Unger ER, Nisenbaum R, Derkay CS, Reeves WC (2003). Predictors of remission in juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129: 1275–1278.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354.
- Samuel CE (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14:778-809
- Sang BC, Barbosa MS. Single amino acid substitutions in “low-risk” human papillomavirus (HPV) type 6 E7 protein enhance features characteristic of the “high-risk” HPV E7 oncoproteins (1992). *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8063–8067.
- Sawchuk WS, Weber PJ, Lowy DR, Dzubow LM (1989). Infectious papillomavirus in the vapor of warts treated with carbon dioxide laser or electrocoagulation: detection and protection. *J Am Acad Dermatol* 21:41–49.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63:1129-1136.
- Schraff S, Derkay CS, Burke B, Lawson L (2004). American Society of Pediatric Otolaryngology members’ experience with recurrent respiratory papillomatosis and the use of adjuvant therapy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130:1039–1042.
- Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314:111-114.
- Schweiger MR, You J, Howley PM (2006). Bromodomain protein 4 mediates the papillomavirus E2 transcriptional activation function. *J Virol* 80:4276-4285.

- Sedman J, Stenlund A (1995). Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro. *EMBO J* 14:6218-6228.
- Senechal H, Poirier GG, Coulombe B, Laimins LA, Archambault J (2007). Amino acid substitutions that specifically impair the transcriptional activity of papillomavirus E2 affect binding to the long isoform of Brd4. *Virology* 358:10-17.
- Shah K, Kashima H, Polk BF, Shah F, Abbey H, Abramson A (1986). Rarity of cesarean delivery in cases of juvenile-onset respiratory papillomatosis. *Obstet Gynecol* 68:795–799.
- Shah KV és Howley PM (1996). Papillomaviruses. In: Bernard N. Fields, David M. Knipe and P.M. Howley, szerkesztők (3. kiadás) *Fields Virology* vol. 2, Lippincott-Raven, Philadelphia, 2077–2109
- Shikowitz MJ, Abramson AL, Freeman K, Steinberg BM, Nouri M (1998). Efficacy of DHE photodynamic therapy for respiratory papillomatosis: immediate and long-term results. *Laryngoscope* 108:962–967.
- Shikowitz MJ, Abramson AL, Steinberg BM, DeVoti J, Bonagura VR, Mullooly V, Nouri M, Ronn AM, Inglis A, McClay J, Freeman K (2005). Clinical trial of photodynamic therapy with meso-tetra (hydroxyphenyl) chlorine for respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 131:99–105.
- Smith EM, Pignatari SS, Gray SD, Haugen TH, Turek LP (1993). Human papillomavirus infection in papillomas and nondiseased respiratory sites of patients with recurrent respiratory papillomas using the polymerase chain reaction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 119:554–557.
- Snoeck R, Andrei G, De Clercq E (2001). Cidofovir in the treatment of HPV-associated lesions. *Verh K Acad Geneesk Belg* 63:93-120, discussion 120-122.
- Snoeck R, Wellens W, Desloovere C, Van Ranst M, Naesens L, De Clercq E, Feenstra L (1998). Treatment of severe laryngeal papillomatosis with intralesional injections of cidofovir [(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine]. *J Med Virol* 54: 219-225.
- Soldatski IL, Onufrieva EK, Steklov AM, Schepin NV (2005). Tracheal, bronchial, and pulmonary papillomatosis in children. *Laryngoscope* 15:1848–1854.
- Spalholz BA, Yang YC, Howley PM (1985). Transactivation of a bovine papilloma virus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. *Cell* 42:183–191.
- Stamatakis S, Nikolopoulos TP, Korres S, Felekis D, Tsangaroulakis A, Ferekidis E (2007). Juvenile recurrent respiratory papillomatosis: still a mystery disease with difficult management. *Head Neck* 29:155–162.
- Stanley M (2010). HPV - immune response to infection and vaccination. *Infect Agent Cancer* 5:19.
- Steger G, Ham J, Lefebvre O, Yaniv M (1995). The bovine papillomavirus 1 E2 protein contains two activation domains: one that interacts with TBP and another that functions after TBP binding. *EMBO J* 14:329-340.

- Steinau M, Swan,DC, Onyekwuluje JM, Brooks JT, Vellozzi C, Unger ER, Study Investigators, S.U.N., (2010). Differences and changes in human papillomavirus 16 variant status in human immunodeficiency virus–positive adults are not uncommon. *J Gen Virol* 91:2068–2072.
- Steinberg BM, DiLorenzo TP (1996). A possible role for human papillomaviruses in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 15:91–112.
- Steinberg BM, Meade R, Kalinowski S, Abramson AL (1990). Abnormal differentiation of human papillomavirus-induced laryngeal papillomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 116:1167-1171.
- Steinberg BM, Topp WC, Schneider PS, Abramson AL (1983). Laryngeal papillomavirus infection during clinical remission. *N Engl J Med* 308:1261–1264.
- Stubenrauch F, Lim HB, Laimins LA (1998). Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of oncogenic human papillomavirus type 31. *J Virol* 72:1071-1077.
- Swan DC, Vernon SD, Icenogle JP (1994). Cellular proteins involved in papillomavirus-induced transformation. *Arch Virol* 138:105–115.
- Tan SH, Leong LE, Walker PA, Bernard HU (1994). The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *J. Virol.* 68:6411–6420.
- Tasca R, Clarke R (2006). Recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Dis Child* 91:689-691.
- Thain A, Jenkins O, Clarke AR, Gaston K (1996). CpG methylation directly inhibits binding of the human papillomavirus type 16 E2 protein to specific DNA sequences. *J Virol* 70:7233-7235.
- Thierry F és Howley PM (1991). Functional analysis of E2-mediated repression of the HPV18 P105 promoter, *New Biol* 3:90–100.
- Thierry F, Spyrou G, Yaniv M, Howley P (1992). Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J Virol* 66:3740-3748.
- Thomas JT, Hubert WG, Ruesch MN, Laimins LA (1999). Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U SA* 96:8449-8454.
- Thomas M és 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* 80:1513–1517.
- Thorne MC, Zur KB (2009). Transoral trans-stomal microdebrider excision of tracheal papillomatosis. *Laryngoscope* 119:964-966.
- Thyrell L, Sangfelt O, Zhivotovsky B, Pokrovskaja K, Wang Y, Einhorn S, Grandér D (2005). The HPV-16 E7 oncogene sensitizes malignant cells to IFN-alpha-induced apoptosis. *J Interferon Cytokine Res* 25:63-72

Tornesello ML, Buonaguro FM, Buonaguro L, Salatiello I, Beth-Giraldo E, Giraldo G (2000). Identification and functional analysis of sequence rearrangements in the long control region of human papillomavirus type 16 Af-1 variants isolated from Ugandan penile carcinomas. *J Gen Virol* 81:2969-2982.

Tornesello ML, Losito S, Benincasa G, Fulciniti F, Botti G, Greggi S, Buonaguro L, Buonaguro FM (2011). Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 121:32-42.

Trus BL, Buck CB, Cheng N, Lowy D, Steven AC, Schiller JT (2005). Localization of the HPV-16 minor capsid L2 by difference imaging. *Microsc Microanal* 11:642-643.

Tsao YP, Chu TY, Chen TM, Yang YF, Chen SL (1994). Effects of E5a and E7 of human papillomavirus type 11 on immortalized human epidermal keratinocytes and NIH 3T3 cells. *Arch Virol* 138:177-185.

Tsao YP, Kuo SW, Li SF, Tsai TC, Li LY, Chen SL (1995). Human papillomavirus 11 E5a delays the growth restriction induced by temperature shift in temperature sensitive simian virus 40 T antigen immortalized keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 217:712-720.

Tsao YP, Li LY, Tsai TC, Chen SL (1996). Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21(Waf1/Sdi1/Cip1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes. *J Virol* 70:7535-7539.

Tungteakkhun SS és Duerksen-Hughes PJ (2008). Duerksen-Hughes Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol* 153:397-408

Ulualp SO, Ryan MW, Wright ST (2007). Microdebrider removal of tracheal papilloma via tracheostomy in the child with an obliterated larynx. *J Laryngol Otol* 121:1070-1072.

Ure AE, Forslund O (2012). Lack of methylation in the upstream region of human papillomavirus type 6 from aerodigestive tract papillomas. *J Virol* 86:13790-13794.

Vambutas A, Di Lorenzo TP, Steinberg BM (1993). Laryngeal papilloma cells have high levels of epidermal growth factor receptor and respond to epidermal growth factor by a decrease in epithelial differentiation. *Cancer Res* 53:910-914.

Van Cutsem E, Snoeck R, Van Ranst M, Fiten P, Opdenakker G, Geboes K, Janssens J, Rutgeerts P, Vantrappen G, de Clercq E, et al. (1995). Successful treatment of a squamous papilloma of the hypopharynx-esophagus by local injections of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) cytosine (cidofovir). *J Med Virol* 45:230-235.

Van Valckenborgh I, Wellens W, De Boeck K, Snoeck R, De Clercq E, Feenstra L (2001). Systemic cidofovir in papillomatosis. *Clin Infect Dis* 32:62-64.

Veress G, Szarka K, Dong XP, 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* 80:1035-1043

- Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL (2000). Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 81:2959-2968.
- Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M (2011). Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation. *PLoS One* 6:e24451.
- Wachsman M, Petty BG, Cundy KC, Jaffe HS, Fisher PE, Pastelak A, Lietman PS (1996). Pharmacokinetics, safety and bioavailability of HPMPC (cidofovir) in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Antiviral Res* 29:153–161.
- Ward P, Coleman DV, Malcolm AD (1989). Regulatory mechanisms of the papillomaviruses. *Trends Genet* 5:97–99.
- Wemer RD, Lee JH, Hoffman HT, Robinson RA, Smith RJ (2005). Case of progressive dysplasia concomitant with intralesional cidofovir administration for recurrent respiratory papillomatosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 114:836-839.
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248:76–79.
- Wiatrak BJ, Wiatrak DW, Broker TR, Lewis L (2004). Recurrent respiratory papillomatosis: a longitudinal study comparing severity associated with human papilloma viral types 6 and 11 and other risk factors in a large pediatric population. *Laryngoscope* 114:1–23.
- Wilson R, Fehrmann F, Laimins LA (2005). Role of the E1^{E4} protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* 79:6732-6740.
- Wilson WR, Hashemiyooun R, Hawrych A (2000). Intralesional cidofovir for recurrent laryngeal papillomas: preliminary report. *Ear Nose Throat J* 79:236-238, 240.
- Wu SY, Lee AY, Hou SY, Kemper JK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Chiang CM (2006). Brd4 links chromatin targeting to HPV transcriptional silencing. *Genes Dev* 20:2383-2396.
- Wu X, Zhang C, Feng S, Liu C, Li Y, Yang Y, Gao J, Li H, Meng S, Li L, Zhang Y, Hu X, Wu X, Lin L, Li X, Wang Y (2009). Detection of HPV types and neutralizing antibodies in Gansu province, China. *J Med Virol* 81:693-702.
- Xi LF, Jiang M, Shen Z, Hulbert A, Zhou XH, Lin YY, Kiviat NB, Koutsky LA (2011). Inverse Association between Methylation of Human Papillomavirus Type 16 DNA and Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grades 2 or 3. *PLoS One* 6:e23897.
- Xi LF, Koutsky LA, Castle PE, Edelstein ZR, Hulbert A, Schiffman M, Kiviat NB (2010). Human papillomavirus type 16 variants in paired enrollment and follow-up cervical samples: implications for a proper understanding of typespecific persistent infections. *J Infect Dis* 202:1667–1670.
- Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, Holmes KK, Kiviat NB (1997). Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 89:796–802.

- Xin CY, Matsumoto K, Yoshikawa H, Yasugi T, Onda T, Nakagawa S, Yamada M, Nozawa S, Sekiya S, Hirai Y, Shiromizu K, Tomoyuki Fujii T, Taketani Y (2001) Analysis of E6 variants of human papillomavirus type 33, 52 and 58 in Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia/cervical cancer in relation to their oncogenic potential. *Cancer Lett* 170:19–24
- Xiong X, Smith JL, Chen MS (1997). Effect of incorporation of cidofovir into DNA by human cytomegalovirus DNA polymerase on DNA elongation. *Antimicrob Agents Chemother* 41:594-599.
- Xue Q, Wang H, Wang J (2010). Recurrent respiratory papillomatosis: an overview. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29:1051-1054.
- Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 71:2463-2472.
- Yang R, Day PM, Yutzy IV WH, Lin K, Hung C-F, Roden BS (2003). Cell surface-binding motifs of L2 that facilitate papillomavirus infection. *J Virol* 77:3531–3541.
- Yang R, Wheeler CM, Chen X, Uematsu S, Takeda K, Akira S, Pastrana DV, Viscidi RP, Roden RB (2005). Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer. *J Virol* 79:6741-6750.
- Yang Y, Zhao X, Chen W, Gao Z, Liu A, Guo J, Yan Z, Dou Y, Wang H, Li Y (2010). Effects of cidofovir on human papillomavirus-positive cervical cancer cells xenografts in nude mice. *Oncol Res* 18:519-527.
- Yao JM, Breiding DE, Androphy EJ (1998). Functional interaction of the bovine papillomavirus E2 transactivation domain with TFIIB. *J Virol* 72:1013-1019.
- Zehbe I, Richard C, DeCarlo CA, Shai A, Lambert PF, Lichtig H, Tommasino M, Sherman L (2009). Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology* 383:69-77.
- Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M (1998). Human Papillomavirus 16 E6 Variants Are More Prevalent in Invasive Cervical Carcinoma than the Prototype. *Cancer Res* 58:829-833.
- Zeitels SM, Akst LM, Burns JA, Hillman RE, Broadhurst MS, Anderson RR (2006a). Office-based 532-nanometer pulsed KTP laser treatment of glottal papillomatosis and dysplasia. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 115:679–685.
- Zeitels SM, Burns JA, Akst LM, Hillman RE, Broadhurst MS, Anderson RR (2006b). Office-based and microlaryngeal applications of a fiber-based thulium laser.
- Zerr DM és Frenkel LM (1999). Advances in antiviral therapy. *Current Opinion in Pediatrics* 11:21–27.



Iktatószám: DEENKÉTK/303/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

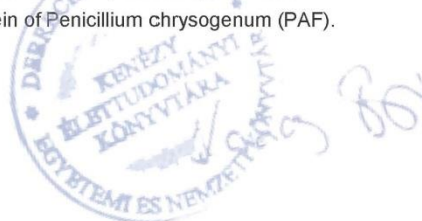
Jelölt: Gáll Tamás
Neptun kód: FUA5FH
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

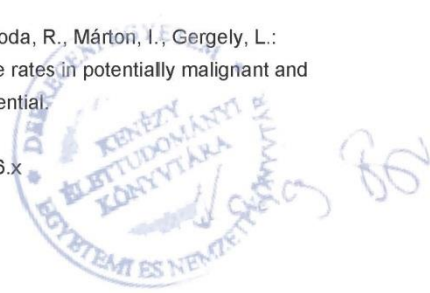
1. **Gáll, T.**, Kis, A., Tatár, T.Z., Kardos, G., Gergely, L., Szarka, K.: Genomic differences in the background of different severity in juvenile-onset respiratory papillomatosis associated with human papillomavirus type 11.
Med. Microbiol. Immunol. Epub ahead of print (2013)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-013-0297-y>
IF:3.545 (2012)
2. **Gáll, T.**, Kis, A., Fehér, E., Gergely, L., Szarka, K.: Virological failure of intralesional cidofovir therapy in recurrent respiratory papillomatosis is not associated with genetic or epigenetic changes of HPV11: Complete genome comparison of sequential isolates.
Antiviral Res. 92 (2), 356-358, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.09.007>
IF:4.301

További Közlemények

3. Palicz, Z., Jenes, Á., **Gáll, T.**, Miszti-Blasius, K., Kollár, S., Kovács, I., Emri, M., Márián, T., Leiter, É., Pócsi, I., Csósz, É., Kalló, G., Hegedűs, C., Virág, L., Csemoch, L., Szentesi, P.: In vivo application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF).
Toxicol. Appl. Pharmacol. 269 (1), 8-16, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.02.014>
IF:3.975 (2012)



4. Ruzsnavszky, O., Dienes, B., Oláh, T., Vincze, J., **Gáll, T.**, Balogh, E., Nagy, G., Bátori, R., Lontay, B., Erdődi, F., Csemoch, L.: Differential Effects of Phosphatase Inhibitors on the Calcium Homeostasis and Migration of HaCaT Keratinocytes.
PLoS One. 8 (4), e61507-, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061507>
IF:3.73 (2012)
5. Csoma, E., Mészáros, B., **Gáll, T.**, Asztalos, L., Kónya, J., Gergely, L.: Dominance of variant A in human Herpesvirus 6 viraemia after renal transplantation.
Virology. 8, 403, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-8-403>
IF:2.343
6. Fehér, E., Kardos, G., **Gáll, T.**, Kis, A., Gergely, L., Szarka, K.: Comparison of diversity of torque teno virus 1 in different mucosal tissues and disorders.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 58 (4), 319-337, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/AMicr.58.2011.4.8>
IF:0.787
7. Fehér, E., **Gáll, T.**, Murvai, M., Kis, A., Boda, R., Sápy, T., Tar, I., Gergely, L., Szarka, K.: Investigation of the occurrence of torque tenovirus in malignant and potentially malignant disorders associated with human papillomavirus.
J. Med. Virol. 81 (11), 1975-1981, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21627>
IF:2.47
8. Kis, A., Fehér, E., **Gáll, T.**, Tar, I., Boda, R., D. Tóth, E., Méhes, G., Gergely, L., Szarka, K.: Epstein-Barr virus prevalence in oral squamous cell cancer and in potentially malignant oral disorders in an eastern Hungarian population.
Eur. J. Oral. Sci. 117 (5), 536-540, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0722.2009.00660.x>
IF:1.956
9. Szarka, K., Tar, I., Fehér, E., **Gáll, T.**, Kis, A., D. Tóth, E., Boda, R., Márton, I., Gergely, L.: Progressive increase of human papillomavirus carriage rates in potentially malignant and malignant oral disorders with increasing malignant potential.
Oral Microbiol. Immunol. 24 (4), 314-318, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-302X.2009.00516.x>
IF:2.336



10. Major, T., Sziklai, I., Czeglédy, J., Gáll, T., Gergely, L., Szarka, K.: Follow-up of HPV DNA copy number in cidofovir therapy of recurrent respiratory papillomatosis.
Anticancer Res. 28 (4B), 2169-2174, 2008.
IF:1.39

Összesített impakt faktor: 26.833

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 7.846

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.09.13



TÁRGYSZAVAK

Magyar nyelven

rekurrens légúti papillomatózis, HPV-11 variánsok, teljes genom analízis, patogenitási potenciál, LCR aktivitás, klinikai kép, filogenetikai analízis

Angol nyelven

recurrent respiratory papillomatosis, HPV-11 variants, whole genome analysis, pathogenic potential, LCR activity, clinical course, phylogenetic analysis

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, dr. Szarka Krisztina egyetemi adjunktusnak, hogy kiemelkedő szakmai vezetése mellett végezhettem tudományos munkámat.

Köszönettel tartozom továbbá dr. Kónya József egyetemi docensnek és Gergely Lajos professzor úrnak, az Orvosi Mikrobiológiai Intézet jelenlegi és korábbi vezetőinek, hogy lehetővé tették számomra az intézetben való kutatómunkát.

Köszönöm dr. Bakk Juditnak és dr. Major Tamásnak a mintagyűjtésben nyújtott segítségét.

Köszönöm kollégáimnak, dr. Fehér Enikőnek, Kis Andreának, dr. Kardos Gábornak, valamint az Orvosi Mikrobiológiai Intézet valamennyi dolgozójának önzetlen segítségét.

Függelék