

EGYETEMI DOKTORI (Ph D) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A HUMÁN PAPILLOMAVÍRUS ÉS A CELLULÁRIS
SURVIVIN GÉN KAPCSOLATÁNAK VIZSGÁLATA**

Borbély Ágnes Anikó

Témavezető: Dr. Veress György

Debreceni Egyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Orvosi Mikrobiológiai Intézet

2006

Bevezetés

A cervix carcinoma (méhnyakrák) a nők egyik leggyakoribb rosszindulatú daganatos megbetegedése világszerte. Számos onkogén vagy más néven magas kockázatú csoportba tartozó humán papillomavírusról (HPV) – 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 70 – bebizonyosodott, hogy fontos etiológiai szerepe van a méhnyakrák kialakulásában. A betegekből vett tumoros szövetmintáknak több mint 90 %-ában tudták kimutatni a HPV különböző típusát, az esetek felében a HPV 16 vírusgenomot detektálták.

A HPV 16 a Papillomaviridae családba tartozó kis méretű, ~ 55 nm átmérőjű, ikozahedrális szimmetriájú, burok nélküli vírus. Kapszidja hozzávetőleg 8000 bázispár hosszúságú, duplaszálú, cirkuláris DNS-t vesz körül, amelyhez hisztonok kötődnek. A vírus genomja egy korai (early, E), a kapszidfehérjéket kódoló késői (late, L) és egy fehérjéket nem kódoló, szabályozó szakaszt (long control region, LCR) tartalmaz.

A HPV 16 két fő transzformáló proteinje, az E6 és E7 hatékonyan vesz részt a fertőzött sejtek immortalizációjában és transzformálásában. Az E6 gén terméke egy kb. 150 aminosavból álló, 18 kilodalton molekulatömegű többfunkciós fehérje. A fehérje transzaktiváló vagy represszálo hatása számos celluláris és virális promóteren érvényesül. Az E6 fehérje az E6AP-n (E6 asszociált protein) keresztül indukálja a celluláris p53 tumorsuppresszor fehérje ubiquitin-függő lebontását, illetve képes megakadályozni annak kötődését célgénjeihez, ami a p53-dependens transzkripció gátlásához vezet. A p53 fehérje különböző káros környezeti hatások következményeként fellépő DNS károsodás esetén olyan folyamatokat indít be, melyek során gátolódnak azok a gének, amelyek szerepet játszanak a sejtciklus G1-S fázis átmenetében. Ily módon a p53 leállítja a sejtciklust, időt hagyva a sejtekben a DNS repair mechanizmusoknak az esetleges DNS sérülések kijavítására, vagy ha a hiba olyan mértékű, hogy azt már nem lehet korrigálni, a sejteket az apoptózis irányába tereli. Mivel az E6 képes kötni és előidézni a p53 degradációját, az apoptózis gátlását is indukálhatja.

A humán papillomavírusok E7 fehérjéje egy 98 aminosavból felépülő nukleáris fosztoprotein. A fehérje képes hozzákapcsolódni a celluláris tumorsuppresszor retinoblasztóma protein hipofoszforilált formájához. Az Rb egy kulcsfontosságú fehérje, aktív hipofoszforilált formája a sejt G0, G1 fázisában köti az E2F transzkripciós faktorokat, ezáltal gátolva az E2F-dependens gének átíródását. Ha a sejt osztódni kezd a Rb fehérje hiperfoszforilálódik, kötésükből felszabadulnak az E2F transzkripciós faktorok, és lehetővé válik számos az S fázisban szükséges gén transzkripciója. Mivel az E7 képes a

hipofoszforilált Rb-hez kapcsolódni, meggátolja az E2F faktorok kötődését, így azok szabadon maradnak, és folyamatosan aktiválják a szabályozásuk alá eső géneket, ezáltal a sejtekben folyamatos lesz a proliferáció, hiszen újra és újra belépnek a sejtciklus S fázisába. A magas kockázati csoportba tartozó HPV-k E7 proteinjei nem csak kötődni tudnak a Rb-hez, de ubiquitin-függő degradációját is képesek előidézni.

DNS szekvencia adatok alapján jelenleg több mint 200 humán papillomavírus típus ismert, melyek között 85 jól karakterizált és 120 potenciálisan új genotípus található. Tropizmusuk alapján a humán papillomavírusokat külön csoportokra osztják, a kután típusú, az EV (epidermodysplasia verruciformis) típusú és a genitális-mukózális típusú HPV-kre. Onkogén kockázatuk alapján az úgynevezett alacsony kockázatú (low risk) típusok, mint amilyen a HPV 6 és HPV11 a jóindulatú elváltozásokban – condyloma acuminatum – gyakoribbak, míg a magas kockázatú (high risk) típusokat (HPV 16, 18, 31, 33 stb.) többnyire az alsó genitális traktus rosszindulatú daganataiból, elsősorban a méhnyakrákból és annak rákmegelőző állapotaiból izolálták.

A vírus több évig, évtizedig perzisztálhat tünetmentesen a méhnyak nyálkahártyájában, vagyis a fertőzés és a daganat megjelenése között hosszú idő telhet el. Az invazív cervix carcinoma különböző rákmegelőző állapotokon keresztül alakul ki. A HPV fertőzés és a betegség kialakulása közti hosszú időszak miatt feltételezhető, hogy a vírus jelenléte, típusa és jellemzői mellett számos egyéb tényező is szerepet játszik a tumor létrejöttében. Ilyenek a gazdaszervezet genetikai és immunológiai sajátosságai, celluláris folyamatok, különböző kofaktorok (hormonális hatások, dohányzás, táplálkozás, szexuális szokások).

Celluláris tényező lehet egy nem régóta ismert fehérje a survivin, amely az apoptózis inhibitor (IAP) család egyik új tagja. A survivin gén terméke terminálisan differenciálódott felnőtt szövetekben nem detektálható, de nagy mennyiségben fejeződik ki a fejlődés során az osztódó, embrionális szövetekben. Fokozott az expressziója a legkülönbözőbb daganatokban, így a méhnyakrákban is, különösen annak előrehaladottabb stádiumaiban. Funkciója kettős – az apoptózis gátlása mellett a sejtciklus és a sejtosztódás szabályozásában is részt vesz. A sejtekben legnagyobb mennyiségben a sejtciklus G2/M fázisában van jelen, ekkor lokalizációja a mitotikus apparátushoz, a mitotikus orsók mikrotubulusaihoz és a centroszómákhoz köthető. Szerepe a sejtosztódás korai szakaszában jelentős. Sejtciklus függő expressziója nagyrészt transzkripciós szinten szabályozott, és a promóter proximális szakaszán található sejtciklus homológ régió (CHR, cell cycle homology region) és sejtciklus-függő elemek (CDE, cell cycle dependent element) mediálják. A CDE és CHR jelenléte G2/M

fázisban expresszált gének jellemzője. A survivin promóterében számos egyedi nukleotidot érintő polimorfizmust találtak, amelyek egyike (G/C polimorfizmus) a CDE/CHR represszor elemet érinti (az ATG start kodonhoz viszonyítva a -31 nukleotid pozícióban). A polimorfizmus megléte tumoros sejtvonalakban a survivin mRNS és fehérje mennyiségében is magasabb szintet eredményez, és módosítja a gén sejtciklus függő transzkripcióját, mely a CDE/CHR represszor elem és a hozzájuk kötődő faktorok kölcsönhatásbeli változásának következménye lehet.

A magas kockázati csoportba tarozó humán papillomavírusokra, így a HPV 16-ra is jellemző, hogy a bőr és a nyálkahártya még osztódó, bazális keratinocitáit fertőzik, de szaporodni csak a differenciált epitéliumban képesek, ahol azonban a sejtciklus már leállt, nincs DNS szintézis. Mivel a HPV szaporodásához szükséges, hogy a fertőzött gazdasejt osztódása fennmaradjon, ezért a vírus beavatkozik a sejt folyamatokba, stimulálja a sejtproliferációt, az apoptózis ellen hat, mely folyamatok mutációk felhalmozódásához és rosszindulatú daganat kialakulásához vezethetnek.

A karcinogenezis molekuláris eseményeiben feltételezhető a survivin fokozott átíródásának szerepe, melyre a vírus is befolyással lehet. A survivin a tumorokban – így a méhnyakrákban is – a normális szövetektől eltérően újra expresszálódik és az apoptotikus folyamatok ellen hat, elősegítve a folyamatos sejtosztódást. Szerepe a tumorok kialakulásában valószínű, azon mechanizmus azonban, amely a survivin expresszió szabályozásának sérüléséhez vezet, még kevésbé tisztázott. A survivin fehérje expresszióját a p53 celluláris tumorsuppresszor negatívan befolyásolja. Mivel a HPV 16 E6 fehérje képes a p53 degradációjára, így elképzelhető, hogy valamilyen módon részt vesz a survivin gén transzkripciójában. A survivin génre más virális és celluláris fehérjék is hatással vannak, így nem lehetetlen, hogy a HPV onkoproteinjei is befolyásolják annak átíródását.

Célkitűzések

Vizsgálataink során az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

- I. A HPV 16 E6 és E7 onkogénjének van-e valamilyen hatása a humán survivin gén expressziójára?

Ha igen, akkor ez a hatása függ-e valamilyen celluláris fehérje jelenlététől, és függ-e a sejtciklustól?

A HPV 16 onkogénjei befolyásolják-e az endogén survivin szintet, hatásuk érvényesül-e mRNS szinten?

- II. A survivin promóter CDE/CHR represszor kötő helyét (az ATG start kodontól számított –31 nukleotid) érintő polimorfizmus milyen arányban fordul elő méhnyakrákos betegekben, Papanicolaou osztályozás szerinti P3-as diagnózissal rendelkező páciensekben és a kontroll populációban?

Van-e valamilyen szerepe az említett survivin promóter polimorfizmusnak a HPV asszociált méhnyakrák kialakulásában?

Anyagok és módszerek

Plazmidok, sejt kultúrák

A tranziens transzfekciós kísérleteink során számos plazmidot használtunk. A survivin promóter különböző hosszúságú szakaszait kódoló riporter plazmidok a pLuc-230c, pLuc-441c, pLuc-1430c, pLuc-2840c. A HPV 16 onkoproteinjeit pcDNA-16E6 és pcDNA-16E7 expressziós vektorok, mutáns formáit pedig pJ4 Ω -16E6 Δ 106-110, -16E6 Δ 111-115 és -16E6 Δ 128-132 plazmidok kódolták. A konszenzus p53 kötő helyet tartalmazó p53CON-Luc riporter plazmid mellett tanulmányunkban a humán p53 tumorsuppresszor fehérje 72. kodonján prolint tartalmazó izoformát kódoló pcDNA3-p53Pro expressziós vektort is használtuk. A tranziens transzfekciós kísérleteket a HeLa HPV 18 pozitív cervicalis adenocarcinoma, az MCF-7 humán mellrák eredetű és a Saos-2 humán osteosarcoma sejtvonalakon végeztük. Stabil transzfekciókhoz humán embrionális fibroblasztokat (HEF) használtunk. A PA317-LXSN, -16E6, -16E7 és -16E6E7 rekombináns retrovírus termelő sejtek.

Tranziens és stabil transzfekció

A HeLa és MCF-7 sejteket Lipofectamine 2000-rel transzfektáltuk. Mindkét esetben 2 μ g riporter vektort és 1 μ g expressziós vektort juttatunk a sejtekbe, melyeket ezután 3 cm átmérőjű sejtenyészítő platek-en tartottunk fenn. A Saos-2 sejt esetén 5 μ g riporter vektort és 2 μ g expressziós vektort kotranszfektáltunk (500 μ l DMEM: 10 % FBS, 30 mM Hepes, pH 7.5; 950 μ F, 300 V) elektroporációval, majd a sejteket 6 cm átmérőjű sejtenyészítő platek-en tenyésztettük tovább. Mindhárom sejt esetén 48 órás inkubációt követően Reporter Lysis Buffer-rel és egy fagyasztás-olvasztás ciklussal tártuk fel a sejteket, majd luciferáz teszttel (Luciferase Assay System), luminométeren mértük a sejt-lizátum luciferáz aktivitását.

A stabil transzfekcióban használt retrovírusokat HeLa sejteken titráltuk geneticin (G418) (500 μ g/ml) szelekciós ágens felhasználásával, metilénkék festést követően. HEF sejteket fertőztünk a kontroll (LXSN), E6- (16E6), E7- (16E7) valamint E6E7 onkogéneket (16E6E7) tartalmazó retrovírus vektorokkal, majd 200 μ g/ml G418 tartalmú DMEM tápfolyadékban szelektáltuk a stabilan transzfektált, ezáltal G418 szemben rezisztenssé vált sejteket. Az így létrehozott sejtvonalak elnevezése HEF-LXSN, HEF-16E6, HEF-16E7, HEF-16E6E7.

Sejtciklus-szinkronizálás

A HeLa sejteket 24 óráig kezeltük 10 µM aphidicolinnal (G1), 2 mM thymidinnel (S), illetve 0,2 µg/ml nocodazole-lal (G2/M), annak érdekében, hogy azokat a sejtciklus adott szakaszában leállítsuk.

A stabilan transzfektált HEF sejtvonalak szinkronizálása G1 fázisban 18 + 24 óráig tartó 10 µM aphidicolinos kezeléssel történt, míg a G2/M fázis blokkot 18 órás aphidicolinos kezelést követő 24 órás 0,2 µg/ml nocodazole kezeléssel értük el.

Áramlási citometria (FACS)

A sejtek arányát a sejtciklus különböző fázisaiban, propidium-jodidos festést követően a DNS tartalom mérésével, FACScan citométerrel határoztuk meg.

Reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakció (RT-PCR)

A stabilan transzfektált sejtvonalainkból TRI Reagent-tel vontuk ki az RNS-t. A mintákban a survivin, HPV 16 E6, E7 és a GAPDH mRNS-ek kimutatását specifikus primerek (1. táblázat) felhasználásával, reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakcióval végeztük.

	Sense és antisense primerek szekvenciái
survivin	5'-GGCAGCCCTTTCTCAAGGACCACC-3' 5'-GATGGCACGGCGCACTTTCTTCGC-3'
HPV 16 E6	5'-TGTTTCAGGACCCACAGGAG-3' 5'-TTCTTCAGGACACAGTGGCT-3'
HPV 16 E7	5'-GCAACCAGA-GACAACCTGATCTCTAC-3' 5'-GGTCTTCCAAAGTACGAATGTCTACG-3'
GAPDH	5'-AATCCCATCACCATCTTCCAG-3' 5'-TCATGAGTCCTTCCACGATACC-3'
survivin promóter	5'-GTTCTTTGAAAGCAGTCGAG-3' 5'-GCCAGTTCTTGAATGTAGAG-3'
MY09-MY11	5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3' 5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'
	M = A/C, W = A/T, Y = C/T, R = A/G
GP5+-GP6+	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3' 5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'

1. táblázat Az első és második közleményben felhasznált primerek szekvenciái

Northern blot hibridizáció

Az RNS mintáinkat formaldehides agar gélen is megfuttattuk, majd Hybond-N⁺ nylon membránra blottoltuk és radioaktívan jelölt survivin, illetve GAPDH próbákkal

hibridizáltattuk. A hibridizáció helyén a radioaktív jel detektálása Bio-Rad phosphorimagerrel (Personal Molecular Imager FX) zajlott.

Vizsgálati csoportok, klinikai minták, DNS izolálás

A survivin promóter polimorfizmus esetleges hatását epidemiológiai vonatkozásban az alábbi csoportokon vizsgáltuk. 81 radikális hysterectomián és lymphadenectomián átesett méhnyakrákos beteg szövetmintája alkotta a tumoros vizsgálati csoportot. 122 páciens tartozott a Papanicolaou osztályozás szerinti P3 csoportba (átmeneti citológiai eredmény – enyhe-súlyos diszkariózis, – ahol nem zárható ki premalignus elváltozás). A kontroll minták közé 180 véradó perifériás vérmintája tartozott.

A méhnyakrákos szövetekből a DNS-t proteináz K emésztést követően fenol-kloroform-izoamilalkohol 25:24:1 arányú elegyével vontuk ki. A P3 minták DNS tartalmát a méhnyak laphámsejtjeiből nyertük ki. A kontroll DNS-t a véradók fehérvérsejtjeiből izoláltuk azok lizálását követő fenol-kloroform-izoamilalkohol 25:24:1 arányú elegyének felhasználásával.

Humán papillomavírus (HPV) kimutatása és tipizálása

A méhnyakrákos és P3 mintákból standard nested MY/GP-PCR-rel, MY09-MY11/GP5+-GP6+ primerek (1. táblázat) felhasználásával mutattuk ki a HPV DNS-t. A HPV típusok meghatározása érdekében a PCR termékeket *MseI* és *RsaI* restrikciós enzimekkel emésztettük, majd az emésztések során kapott fragment mintázat alapján azonosítottuk a HPV típusokat.

PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism), PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism)

A survivin promóter polimorfizmus vizsgálatához a promóter megfelelő szakaszát felszaporítottuk, a PCR terméket *EcoO109I* restrikciós enzimmel emésztettük, majd a kapott fragment mintázatokból megállapítottuk, hogy adott mintában melyik allél található a polimorf nukleotid helyén. Kontrollként különböző sejtvonalból (A549, Caski, HeLa) izolált DNS szolgált.

A survivin promóter specifikus PCR során kapott terméket SSCP analízissel is megvizsgáltuk. *HaeIII* restrikciós enzimmel történő emésztést követően az emésztett mintákat SSCP töltő pufferben 5 percig 95 °C-on denaturáltuk, majd 10 %-os poliakrialamid gélen megfuttattuk (1 x TBE puffer, 350 V, 4 °C, 4-5 óra), végül a gélen ezüstfestéssel tettük

láthatóvá az eredményt. Az SSCP módszerrel már egyetlen nukleotid eltérést is kimutathatunk, így megfelelő kontrollok mellett – A549, Caski, HeLa DNS – az általunk vizsgált polimorfizmus meghatározására is alkalmas.

Szekvenálás

A survivin promóter specifikus PCR-ből származó egy-egy reprezentatív terméket a promóter specifikus primerekkel mindkét irányban megszekvenáltuk.

Statisztikai módszer

A survivin promóter polimorfizmus vizsgálat során a genotípus megoszlások elemzése a három vizsgálati csoportban chi-négyzet teszttel történt. A $p < 0,05$ esetben tekintettük az eredményeket statisztikailag szignifikánsnak.

Eredmények és következtetések

I. A humán papillomavírus 16 onkoproteinjeinek hatása a survivin gén expressziójára (I. közlemény)

HeLa, MCF-7 és Saos-2 sejtekben a különböző survivin riporter plazmidokat együtt transzfektáltuk a HPV 16 E6 (pcDNA-16E6), E7 (pcDNA-16E7) onkoproteint kódoló plazmidokkal, valamint az üres expressziós vektorokkal.

A survivin és a HPV 16 onkoproteinjei közti kölcsönhatás tanulmányozása során arra a következtetésre jutottunk, hogy az általunk használt humán tumoros sejtvonalakban – HeLa, MCF-7 – a HPV 16 E6 fehérjéje transzaktiválta a humán survivin promótert. Ezen hatása az E6-nak összefüggésben volt a p53 celluláris tumorszuppresszor fehérje jelenlétével. A magas kockázati csoportba tartozó HPV E6-ról köztudott, hogy képes a p53 ubiquitin-függő degradációját indukálni, mely folyamatnak lényeges szerepe van a gazdasejtek transzformálásában. A p53 negatív Saos-2 sejtekben a HPV 16 E6 nem fejtett ki transzaktiváló hatást a survivin promóterére, a HeLa és MCF-7 sejtvonalakban viszont, melyekben funkcionálisan aktív a p53 fehérje, az E6 képes volt a survivin promóterét transzaktiválni. Transzfekciós kísérleteinkből az is kiderült, hogy a p53 expressziója a survivin promóter plazmidokra – melyeket az E6 transzaktivált – gátlólag hatott. A p53 survivin represszáló hatását korábban mások is kimutatták, bár a hatás mechanizmusa még nem teljesen tisztázott.

A survivin promóteren belül egy feltételezett p53 kötő hely található, mely Hoffmann és munkatársainak 2002-es tanulmányában leírtak szerint képes a p53-t megkötni. Ez a kötődés elengedhetetlen a promóter repressziójához. Mások úgy vélik, hogy ez a represszió nem a közvetlen interakció révén valósul meg, hanem vagy a kromatin struktúra módosításán, vagy a p21/waf1/cip1 gén expressziójának indukálásán keresztül. Ezek alapján feltételezhető, hogy az E6-nak a humán survivin promóterre kifejtett transzaktiváló hatása a p53 fehérje degradációján keresztül valósul meg. A HeLa sejteken elvégzett transzfekcióban survivin riporter plazmidot (pLuc-230c) juttatunk vad típusú HPV 16 E6-ot (pJ4 Ω -16E6) kódoló, valamint a különböző deléciós mutánsokat kódoló plazmidokkal (pJ4 Ω -16E6 Δ 106-110, -16E6 Δ 111-115 és -16E6 Δ 128-132) együtt a sejtekbe. A mutáns E6 plazmidokkal végzett vizsgálataink a fenti feltevésünket támasztják alá, ugyanis azoknál a deléciós mutánsoknál (16E6 Δ 106-110, 16E6 Δ 111-115), melyek elveszítették p53 kötő és degradáló képességüket,

nem vagy csak nagyon alacsony survivin promóter transzaktiváló hatást tapasztaltunk, míg azon mutáns (16E6 Δ 128-132) esetében, mely képes a p53 kötésére és degradálására, a survivin promóterére kifejtett transzaktiváló hatás megmaradt, annak ellenére, hogy az adenovírus E2 promóterének (AdE2) transzaktiválására képtelen.

A HPV 16 E6 és E7 onkogének endogén survivin transzkripcióra kifejtett hatásának tanulmányozását HEF sejtvonalakon végeztük. RT-PCR-rel és Northern blot analízissel vizsgálva, a kontroll HEF (HEF-LXSN) sejtekben a survivin mRNS szint alacsony volt, míg a retrovírus vektorok segítségével bejuttatott HPV 16 E6-ot és E7-et expresszáló sejtekben (HEF-16E6, -16E7, -16E6E7) az onkoproteinek indukálták az endogén survivin transzkripcióját. Az E6 esetében ez összhangban volt a tranziens transzfekciós kísérleteinkkel, melyek során az E6 transzkripciósan aktiválta a survivin promótert. Az E7 a korábbi transzfekciós vizsgálatokban ugyan nem transzaktiválta a survivin promótert, de az endogén survivin mRNS szint emelkedését képes volt indukálni HEF sejtekben. Nees és munkatársai is hasonló eredményre jutottak cDNS microarray kísérleteikben, miszerint humán keratinocitákban a HPV 16 E6 és E7 képes a survivin expressziójának fokozására.

Mivel a survivin expressziója a sejtciklus által erősen szabályozott folyamat, a HPV onkoproteinjeiről pedig ismert tény, hogy képesek a sejtciklust módosítani, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy a HPV onkogének hatása a survivin expressziójára függ-e a sejtciklustól. HeLa sejteken elvégzett transzfekciós kísérletekben – melyekben a pLuc-230c survivin riporter plazmidot kontroll, vagy HPV 16 E6 onkoproteint kódoló expressziós vektorral együtt juttattuk a sejtekbe, – sejtciklus szinkronizálást követően az E6 survivin promótert transzaktiváló hatása sejtciklustól függetlenül alakult. HEF sejtekben az endogén survivin mRNS szint változása a HPV 16 E6/E7 jelenlétében szintén független volt a sejtciklustól. Ezen eredmények alapján feltételezzük, hogy a HPV 16 E6 onkoproteinje nem a sejtciklus módosításán keresztül aktiválja a survivin promótert.

A magas kockázati csoportba tartozó HPV-k onkoproteinjei képesek az apoptózis folyamatát befolyásolni. A HPV 16 E6 természetes gazdasejtjében (primer keratinocitában) gátolja a differenciálódás vagy Fas ligand indukálta apoptózist. Bár az E6 pontos anti-apoptotikus hatásának háttere még nem ismert, a pro-apoptotikus fehérjék (p53, Bax és Bak) kötése és gátlása szerepet játszhat ebben. Mivel a p53 képes a survivin expressziójának gátlására, és a survivin egy anti-apoptotikus fehérje, feltételezzük, hogy a p53 részben a survivin transzkripciójának gátlása útján indukálja az apoptózist, melyek alapján elképzelhetőnek tartjuk, hogy a HPV 16 E6 survivinre kifejtett transzaktiváló hatása a p53 degradációján keresztül szerepet játszhat ezen onkoprotein anti-apoptotikus funkciójában.

II. Survivin promóter polimorfizmus és a méhnyak karcinogenezise (II. közlemény)

Az élő szervezetben a sejtosztódás és az apoptózis közti egészséges egyensúly fenntartása és szabályozása rendkívül fontos a normális fejlődés szempontjából. A szabályozó fehérjék nem megfelelő időben és helyen történő kifejeződése a sejtek kóros működéséhez és kontrollálatlan osztódásához vezethet. A különböző daganatokban a survivin fokozott átíródása arra utal, hogy az apoptózisban résztvevő géneknek jelentős szerepük lehet a tumorok kialakulásában és progressziójában.

Számos tanulmányban közölték, hogy a survivin kifejeződése fontos lehet a méhnyakrák kialakulásában is. Ezt a fokozott expressziót nemcsak az invazív rákban, hanem a rákmegelőző állapotokban is tapasztalták.

A HPV-nek régóta nagy jelentőséget tulajdonítanak a cervix carcinoma kifejlődésében. A vírus onkoproteinjei (E6 és E7) beavatkozva a normál sejtciklusba, a tumorképződés irányába hatnak. A survivin és a magas kockázatú HPV fertőzés közti esetleges kapcsolatról méhnyakrák esetén is vannak megfigyelések.

Hogy mi lehet a pontos mechanizmusa a daganatokban a survivin szabálytalan átíródásának még nem teljesen világos. Számos elképzelés született azonban, ilyen a neuroblasztómában a 17q25 kromoszóma helyen a survivin lókuszt felszaporodása, a survivin exon1 demetilálása petefészekrákban, a p53 transzkripció represszor hatásának valamint a Wnt/TCF szignál útvonalnak a módosítása.

A survivin gén promótere normál sejtekben nem aktív, míg a tumor sejtekben intenzíven működik. A promóter számos, a G2/M fázisban expresszáldó gének esetén jellemző sejtciklus függő elemet (CDE, cell cycle dependent element) és sejtciklus homológ régiót (CHR, cell cycle homology region) tartalmaz. Ezen elemek felelősek azért, hogy a survivin gén átíródása sejtciklus függő módon alakuljon. Xu és munkatársai nemrégiben egy polimorfizmust (G/C) azonosítottak a survivin promóterben az ATG start kodonhoz viszonyított -31 nukleotid pozícióban. Rákos sejtvonalakban vizsgálva azt találták, hogy a polimorfizmusból adódó survivin promóter variánsok különböznek transzkripció aktivitásukat tekintve. Mivel ez a polimorfizmus a CDE/CHR represszor kötő helyen található, ezért a kapcsolódó elemek kötését befolyásolva hatással lehet a survivin gén sejtciklus függő transzkripciójára, ezáltal szerepe lehet a tumorokban a survivin expresszió szabályozásának felborulásában.

Annak érdekében, hogy megismerjük a survivin polimorfizmus és a HPV asszociált cervix carcinoma kialakulása közti kapcsolatot, a survivin promóter variánsok genotípus megoszlását és az allél frekvencia alakulását méhnyakrákos és Papanicolaou osztályozás szerinti P3 diagnózisú betegekben, valamint kontroll populációban tanulmányoztuk.

A survivin promóter specifikus PCR-t követő RFLP analízissel meg tudtuk határozni, hogy mintáink melyik nukleotid variánst (G vagy C) tartalmazzák a polimorf -31 nukleotid helyen. RFLP mellett mintáinkat SSCP analízissel is megvizsgáltuk, és az ezüsfestést követően a kontrollként használt sejtvonalak SSCP mintázata alapján meghatároztuk a polimorfizmust. Az SSCP analízis eredménye teljesen egybevágott az RFLP módszerrel kapottakkal.

A három genotípus variáns egy-egy reprezentatív képviselőjét megszekvenáltuk, a szekvenciák szintén alátámasztották az RFLP és SSCP eredményeit.

A vizsgálati populációk genotípus gyakoriságának eloszlásában nem találtunk statisztikailag szignifikáns eltérést ($p = 0,4$). A kontroll csoport adatait összevetve a tumoros esetekkel ($p = 0,37$) valamint a P3 populációval ($p = 0,5$) szintén nem tudtunk statisztikailag szignifikáns különbséget kimutatni. Ugyancsak nem találtunk statisztikailag jelentős eltérést a survivin promóter genotípus eloszlásokban a kontroll csoport és a HPV pozitív (P3 és méhnyakrákos) esetek ($p = 0,7$), illetve a tumoros és tumormentes (kontroll és P3) esetek ($p = 0,27$) között.

A cervix carcinomában leggyakrabban előforduló HPV típus a HPV 16, ezért az adataink elemzése során összevetettük a HPV 16 pozitív P3 és méhnyakrákos populációk adatait a kontroll csoportéval. Ebben az esetben sem találtunk szignifikáns különbséget a HPV 16 pozitív esetek és a kontroll minták genotípus eloszlásában ($p = 0,74$).

A vizsgálati csoportjainkban kiszámolt allélgyakoriságok között, nem volt statisztikailag értékelhető különbség ($p = 0,99$), az allélgyakoriság alapján kalkulált genotípus eloszlás megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúlynak.

Megfigyeléseink azt feltételezik, hogy az általunk vizsgált populációkban a survivin promóter polimorfizmus nem jelent kockázati tényezőt a cervix carcinoma kialakulása szempontjából. További tanulmányokra lenne szükség annak vizsgálatára, hogy más földrajzi területeken a survivin promóter polimorfizmus szerepet játszik-e a cervikális karcinogenezisben.

Összefoglalás

1. A HPV 16 E6 fehérje transzkripciósan aktiválta a survivin gén promóterét. Ez a hatás a p53 tumorszuppresszor fehérje jelenlétével összefüggésben van, mivel p53 negatív sejtvonalban nem érvényesült. A p53 kötésére és degradációjára képes HPV 16 E6 mutánsokat kódoló plazmidokkal folytatott transzkripciós kísérletekben a survivin promóterének fokozott transzaktiválását tapasztaltunk, míg a p53 kötő és degradáló képességében sérült HPV 16 E6 mutáns esetén nem vagy alig volt változás a survivin promóter aktivitásában.
2. A HPV 16 E7 onkoproteinnek, ellentétben az E6 fehérjével nem volt direkt hatása a survivin promóterre.
3. A HPV 16 mindkét onkogénje fokozott endogén survivin mRNS szintet eredményezett humán embrionális fibroblasztokban. Ez a hatása az E6/E7 onkogéneknek a sejtciklus valamennyi fázisában érvényesült, ugyanúgy, ahogy az E6 transzaktiviációs hatása a survivin gén promóterére, mely a sejtciklusnak szintén mindegyik szakaszában kimutatható volt. Az E6 és az E7 endogén survivin mRNS szintre kifejtett hatása, valamint az E6 survivin promóterre gyakorolt transzaktiváló hatása sejtciklustól függetlenül alakult.
4. Survivin promóter CDE/CHR régióját (ATG kodonhoz viszonyítva –31 nukleotid pozíciót) érintő G/C variánsok genotípus megoszlása az általunk vizsgált méhnyakrákos, Papanicolaou osztályozás szerinti P3 diagnózisú, és kontroll populációban nem tér el statisztikailag szignifikáns mértékben. Megvizsgálva az érintett polimorfizmust a HPV fertőzöttséggel kapcsolatban, szintén nem találtunk összefüggést. A vizsgálati csoportjainkban végzett elemzés alapján a survivin promóter fent említett polimorfizmusa nem szerepel kockázati tényezőként a méhnyakrák kialakulása szempontjából.

Közlemények

Az értekezésben felhasznált közlemények

- I **Ágnes A. Borbély**, Melinda Murvai, József Kónya, Zoltán Beck, Lajos Gergely, Fengzhi Li, and György Veress
Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression.
J. Gen. Virol., Feb 2006; 87: 287-294. IF: 3,221
- II **Ágnes A Borbély**, Melinda Murvai, Krisztina Szarka, József Kónya, Lajos Gergely, Zoltán Hernádi, and György Veress
Survivin promoter polymorphism and cervical carcinogenesis.
J. Clin. Pathol., May 2006; (online) IF: 2,619

Egyéb közlemények

M. Murvai, **A. A. Borbély**, J. Kónya, L. Gergely, and G. Veress
Effect of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes on the activity of the transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2) promoter.
Arch. Virol., Dec 2004; 149: 2379-2392. IF: 1,841

Fontosabb előadások, poszterek

Borbély Ágnes Anikó, Szarka Krisztina, Veress György, Murvai Melinda, Gergely Lajos:
A humán papillomavírus 16 E6 intratípusos variánsok hatása a p53 tumorszuppresszor fehérje izoformáira

Magyar Mikrobiológiai Társaság 2001. évi Jubileumi Nagygyűlése, 2001. október 10-12., Balatonfüred

Ágnes Anikó Borbély, Melinda Murvai, György Veress, Lajos Gergely, Krisztina Szarka:
Biological effects of the intratypic variants of the human papillomavirus type 16 (HPV16) E6 oncoprotein

20th International Papillomavirus Conference, 2002. október 4-9., Párizs

Ágnes Anikó Borbély, Melinda Murvai, Lajos Gergely, György Veress:
Effect of the oncoproteins of human papillomavirus (HPV) type 16 on the transcriptional activity of the survivin gene

14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, 2003. október 9-11., Balatonfüred

Borbély Ágnes Anikó, Murvai Melinda, Gergely Lajos, Veress György:

A humán papillomavírus 16 (HPV 16) E6 és E7 onkogénjének hatása a survivin gén expressziójára

A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium, 2004. október 7-9., Keszthely

Ágnes Anikó Borbély, Melinda Murvai, Lajos Gergely, György Veress:

Relationship between survivin promoter polymorphism and human papillomavirus associated cervical carcinoma

A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2005. évi Nagygyűlése és a 1st Central European Forum for Microbiology (CEFORM), 2005. október 26-28., Keszthely