

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Humán papillomavírus 16 E6 és E7 onkoproteinek hatása a keratinociták differenciálódásában résztvevő gének transzkripciós szabályozására

Oraveczné Gyöngyösi Eszter

Témavezető: Dr. Veress György



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2015

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
BEVEZETÉS.....	5
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
A humán papillomavírusok általános jellemzése, osztályozásuk.....	7
A HPV által kiváltott karcinogenezis folyamata és méhnyakrák.....	8
A HPV genom felépítése és a virális proteinek funkciói.....	10
A HPV E6 és E7 onkoproteinek.....	12
A keratinocita differenciáció.....	16
A humán papillomavírusok és a keratinocita differenciáció kapcsolata.....	18
CÉLKITŰZÉSEK.....	20
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	21
Sejttenyésztés.....	21
Microarray.....	21
Microarray adatelemzés.....	22
Reverz transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR).....	22
Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (real-time RT-PCR).....	23
Fehérje izolálás és western blot.....	24
Plazmidok.....	24
Tranziens transzfekció.....	26
EREDMÉNYEK.....	28
Humán papillomavírus 16 onkoproteinek hatása az involukrin expressziójára humán keratinocitákban.....	28
HPV 16 onkogéneket expresszáló humán keratinociták jellemzése.....	28
HPV 16 onkoproteinek hatása a keratinociták differenciálódásában résztvevő gének expressziójára.....	29
A HPV 16 onkoproteinek hatása a humán involukrin promóter transzkripció aktiválására.....	32
A HPV 16 onkoproteinek hatásának lokalizálása a humán involukrin promóteren.....	34
Humán papillomavírus 16 onkoproteinek hatása a keratinociták differenciálódásában résztvevő egyéb gének expressziójára.....	36
A HPV 16 onkogénekkal transzdukált HFK sejtek teljes génexpressziós analízise.....	36
HPV 16 onkoproteinek hatása a keratinociták differenciálódásában résztvevő gének endogén mRNS szintjére.....	38
HPV 16 onkoproteinek hatása a keratinociták differenciálódásában résztvevő gének promóter aktivitására.....	41
HPV 16 onkoproteinek hatása az AP-1 és C/EBP transzkripció faktorok aktiválására.....	42
MEGBESZÉLÉS.....	44
ÖSSZEFOGLALÁS.....	50
SUMMARY.....	51
IRODALOMJEGYZÉK.....	52
TÁRGYSZAVAK.....	59
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	60
FÜGGELÉK.....	61

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ANOVA	varianciaanalízis
AP-1	aktivátor protein 1
ATCC	American Type Culture Collection
bp	bázispár
CDC25A	cell division cycle 25A (CDC 25A foszfatáz)
CE	cornified envelope (keratinizált sejtmembránképlet)
C/EBP	CCAAT enhancer binding protein (CCAAT enhancer kötő fehérje)
CIN	cervical intraepithelial neoplasia (cervikális intraepiteliális neoplázia)
CNFN	kornifelin
DK-SFM	Defined Keratinocyte-Serum Free Medium (szérummentes keratinocita tápfolyadék)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Dulbecco-féle módosított Eagle tápfolyadék)
DNS	deoxiribonukleinsav
DRR	distal regulatory region (disztális szabályozó régió)
DSG1	dezmoглеin 1
DSC1	dezmokollin 1
EDC	epidermal differentiation complex (epidermális differenciációs komplex)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGFR	epidermal growth factor receptor (epidermális növekedési faktor receptor)
FBS	fetal bovine serum (borjúszerum)
FLG	filaggrin
G418	geneticin
GAPDH	glicerinaldehid 3-foszfát dehidrogenáz
GEO	Gene Expression Omnibus (Génexpressziós Omnibusz)
hDlg	human discs large protein
HFK	human foreskin keratinocyte (primer humán keratinocita)
HPV	humán papillomavírus
hScrib	human homologue of Drosophila neoplastic tumor suppressor (Drosophila neoplasztikus tumorszuppresszor humán homológja)
HSIL	high-grade squamous intraepithelial neoplasia lesion (magas fokú laphámsejtes intraepiteliális neoplázia)
IFN	interferon
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
IRF	interferon regulatory factor (interferon szabályozó faktor)
IVL	involukrin
KRT1, 4, 5, 10	keratin 1, 4, 5, 10

LB	Luria-Bertani táptalaj
LCE	late cornified envelope protein (késői CE fehérje)
LCR	long control region (a HPV genom nem kódoló, szabályozó régiója)
LOR	lorikrin
LSIL	low-grade squamous intraepithelial neoplasia lesion (alacsony fokú laphámsejtes intraepiteliális neoplázia)
MAGI-1	membrane-associated guanylate kinase (membrán-asszociált guanilát kináz)
MHC	major histocompatibility complex (fő hisztokompatibilitási komplex)
MUPP-1	multi-PDZ domain protein 1 (multi-PDZ domén fehérje 1)
mRNS	messenger (hírvivő) ribonukleisav
NOTCH1	notch1
ORF	open reading frame (nyílt leolvasási keret)
PCR	polimeráz láncreakció
PBS	phosphate buffered saline (foszfát puffer)
pRB	retinoblasztóma protein
PRR	proximal regulatory region (proximális szabályozó régió)
RIN	RNA Integrity Number (RNS integritási szám)
RMA	robust multichip analysis (robusztus multichip elemzés)
RT-PCR	reverz transzkripció polimeráz láncreakció
RQ	relative quantification (relatív kvantifikáció)
S100A8, 9, 10, 12	S100 kalciumkötő fehérje A8, 9, 10, 12
SCC	squamous cell carcinoma (laphámsejtes karcinóma)
SEM	standard error of mean (az átlag standard hibája)
SERPINB2	plazminogén aktivátor inhibitor-2
Sp1	specificity protein 1 (specifitási fehérje 1)
SPRR1A, 1B,	small prolin-rich protein 1A, 1B (kis prolinban gazdag fehérje 1A, 1B)
SPRR2A, 2B, 3	small prolin-rich protein 2A, 2B, 3 (kis prolinban gazdag fehérje 2A, 2B, 3)
TBST	Tris-sel pufferelt sóoldat 0,05 % Tween 20-szal kiegészítve
TCHH	trichohyalin
TERT	telomeráz reverz transzkriptáz
TGM1	transzglutamináz 1
URR	upstream regulatory region (upstream szabályozó régió)
WHO	World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)
YY1	Yin Yang 1 faktor

BEVEZETÉS

Az utóbbi évtizedek egyik központi felfedezése volt a malignus elváltozások tanulmányozásában, hogy igazolták a humán papillomavírusok (HPV) etiológiai szerepét a cervix carcinoma kialakításában. Különböző országokban epidemiológiai és esettanulmányokban molekuláris biológiai módszerek segítségével bizonyították, hogy a méhnyakrákos esetek 90-100 % ában a HPV DNS kimutatható a betegek mintáiból. A leginkább tanulmányozott és leggyakrabban előforduló magas onkogén kockázatú HPV a HPV16, a méhnyakrákos esetek 50 %-ában ez a típus található meg (Bosch *et al.*, 2002; Van Doorslaer & Burk, 2010).

Ismert, hogy a vírus E6 és E7 onkoproteinjei felelősek a magas onkogén kockázatú HPV típusok transzformáló képességéért (Bosch *et al.*, 2002; Munger & Howley, 2002). A magas kockázatú típusok E6 onkoproteinje képes a p53 tumorsuppresszor degradációjára az ubiquitin-proteaszóma útvonalon keresztül (Howie *et al.*, 2009; Mantovani & Banks, 2001). Az E7 onkogén pedig a retinoblasztóma proteint (pRB) inaktiválja, amely így nem köti tovább az E2F faktort, és ezzel részt vesz a sejtciklus beindításában (Cheng *et al.*, 1995; Munger *et al.*, 2001).

A HPV-k a többrétegű hám bazális sejteit fertőzik, ahol megtörténik a virális genom alacsony kópiaszámú replikációja és a korai gének, többek között az E6 és az E7 kifejeződése. A vírusciklus további lépései is szorosan kapcsolódnak a gazdasejt érési folyamataihoz, ugyanis a magasabb szintű replikáció, a késői gének kifejeződése és a virionok képződése a differenciálódott rétegekben zajlik (Doorbar *et al.*, 2012; Kajitani *et al.*, 2012; Longworth & Laimins, 2004). Azonban a HPV E6 és E7 onkogénekről kimutatták, hogy képesek befolyásolni a gazdasejt differenciálódási folyamatait (Pei *et al.*, 1998; Sherman & Schlegel, 1996; Zehbe *et al.*, 2009). Ennek fontos szerepe van a produktív vírusfertőzésben, ahol a vírus indukálja a celluláris replikációt a differenciálódó keratinocitákban azért, hogy biztosítsa a vírus genom replikációját (Doorbar *et al.*, 2012; Kajitani *et al.*, 2012; Van Doorslaer & Burk, 2010).

Több munkacsoport igazolta, hogy a keratinocita differenciálódásban résztvevő gének expressziója változik a HPV onkogének jelenétében cervix carcinomás sejtekben és in vitro sejtenyészetekben (Duffy *et al.*, 2003; Karstensen *et al.*, 2006; Kravchenko-Balasha *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2006). Azt azonban mindeddig nem vizsgálták, hogy az

onkoproteinek ezen gének szabályozó régiójára hatnak-e, vagy esetleg poszttranszkripció mechanizmusokkal fejtik ki hatásukat. Ezért munkánk során megvizsgáltuk a HPV16 E6 és E7 onkoproteinek hatását a differenciálódásban résztvevő gének expressziójára, valamint tanulmányoztuk a hatás mechanizmusát. Ehhez kezdetben az involucrin, mint fontos differenciálódási marker expresszióját, majd promóterének aktivitását vizsgáltuk a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek jelenlétében. Munkánk második felében a HPV 16 onkoproteinek hatását tanulmányoztuk több, differenciálódásban résztvevő gén expressziójára, szabályozó régiójuk aktivitására, valamint néhány, a differenciálódás regulációjában fontos szerepet betöltő transzkripció faktor (aktivátor protein 1 (AP-1) és CCAAT enhancer kötő fehérje (C/EBP)) aktivitására.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A humán papillomavírusok általános jellemzése, osztályozásuk

A humán papillomavírusok (HPV) kb. 8 kbp hosszúságú, cirkuláris, kettős szálú DNS genomot tartalmaznak. A virionok kb. 55 nm nagyságúak, burokkal nem rendelkeznek (zur Hausen, 1996). Genomjuk korai (early, E1-E7), késői (late, L1-2) és szabályozó régióra (long control region, LCR) osztható. A vírus ORF-jei (open reading frame) egy DNS szálról íródnak át, és a fehérjék egy policisztronos mRNS-ről expresszálódnak (Ganguly & Parihar, 2009; Longworth & Laimins, 2004).

A *Papillomaviridae* családba tartozó vírusoknak több mint 170 típusát írták már le eddig, és folyamatosan identifikálják az újabb típusokat (de Villiers, 2013). A virális genom legkonzervatívabb eleme az L1 régió, ezért a HPV-k tipizálására, osztályozására és filogenetikai elemzésére is ezt használják. Akkor tekintenek egy vírust új típusnak, ha az L1 régiója 10 %-nál nagyobb mértékben tér el az ismert típusokétól. Amennyiben az eltérés 2 és 10 % között van, akkor szubtypusnak, ha 2 % alatti, akkor variánsnak tekintjük (de Villiers *et al.*, 2004). Szintén de Villiers és munkatársai sorolták a papillomavírusokat genusokba a görög ábécé betűi szerint, ez alapján a HPV-k 5 nemzetségbe (Alfa-, Béta-, Gamma-, Mu- és Nu-papillomavírusok) tartoznak.

A HPV-k a hámréteg szaporodóképes alapi sejtjeit fertőzik, tropizmusuk alapján kután ill. mukozális típusokat írtak le. A kután típusok (HPV 1, 2, 3, 10) okozzák a közösleges szemölcsöket, ill. néhány típus az epidermodysplasia verruciformis örökletes betegségben, okoz elváltozásokat (HPV 5, 8). A nyálkahártyákat fertőző típusok között pedig megkülönböztetünk alacsony és magas onkogén kockázatú (low- és high-risk) típusokat (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b). Ezek leggyakrabban az anogenitális régió benignus és malignus tumoraiban fordulnak elő, de megtalálhatók a bőr, a szájnyálkahártya és a légutak egyes daganataiban is. Az alacsony kockázatú típusok (HPV 6, 11, 42) benignus elváltozásokban és enyhe cervicális dysplasiákban fordulnak elő. A HPV 16, 18 és egyéb magas kockázatú onkogén típusok (HPV 31, 33, 35 stb.) súlyos fokú cervikális intraepitheliális neopláziákban (CIN) és invazív karcinómákban mutathatók ki nagy százalékban (Bosch *et al.*, 2002; Munger *et al.*, 2004).

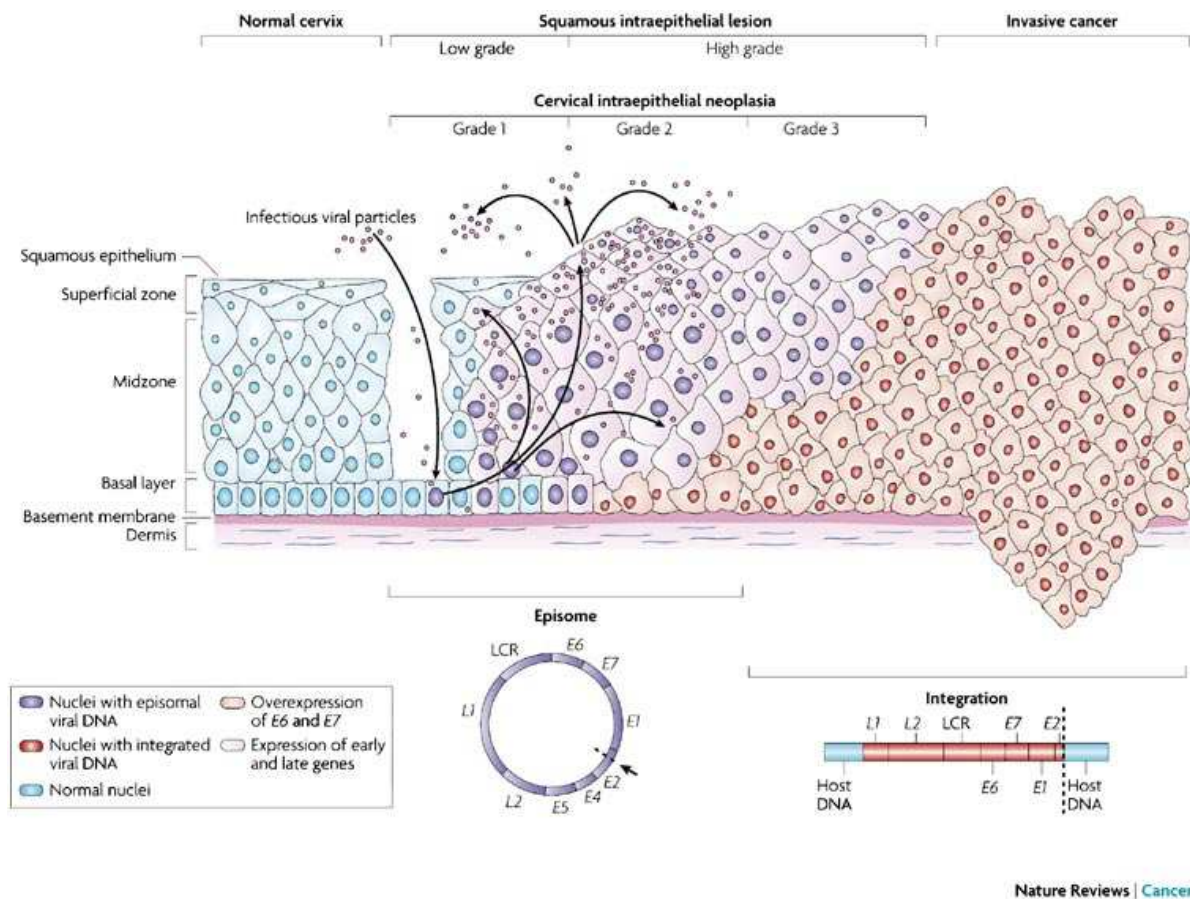
A HPV által kiváltott karcinogenezis folyamata és méhnyakrák

Az anogenitális HPV fertőzés a világon a leggyakoribb szexuális úton terjedő infekció. Megközelítőleg 630 millió HPV fertőzött van világszerte, a nők kb. 80%-a 50 éves koráig átesik HPV fertőzésen (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b). A humán papillomavírusok által okozott cervix carcinoma a nők körében a negyedik legelterjedtebb ráktípus. A WHO (World Health Organization) adatai szerint évente kb. 250000 haláleset történik a méhnyakrák miatt és kb. 500000 új esetet fedeznek fel (Faridi *et al.*, 2011). Az onkogén potenciállal rendelkező HPV 16, 18, 31, 33, 45, 52 és 58 társítható leggyakrabban a méhnyak rákos elváltozásaihoz (Munoz *et al.*, 2003). Az alpha-papillomavírus genusba tartozó magas onkogén kockázatú HPV 16 felelős világszerte a méhnyakrákos esetek feléért, de a cervixen kívül a vaginális, anális és pénisz karcinómák egy részét is ez a típus okozza (Munoz *et al.*, 2006). A szexuális érintkezésen és szokásokon kívül egyéb rizikófaktoroknak, mint az orális fogamzásgátlók használatának, más szexuális úton szerzett fertőzéseknek, immunszuppresszióknak és a dohányzásnak is fontos szerepet tulajdonítanak az cervix carcinoma kialakításában (Bosch *et al.*, 2002; Faridi *et al.*, 2011).

Lényeges momentum a HPV által kiváltott karcinogenezisben, hogy a vírus képes évekig perzisztálni a fertőzés helyén annak ellenére, hogy a többrétegű hám ciklusa gyorsan lezajlik (Munger *et al.*, 2001; Snijders *et al.*, 2006). Ehhez a folyamathoz hozzájárul, hogy a vírus a keratinocitákban speciális helyen, az immunrendszer elől védve van, és az immunrendszer hatásait több ponton is ki tudja védeni. A fertőzés során ugyanis nem alakul ki gyulladás, az interferon válasz gátlódik, valamint a vírus nem lítikus hatású, csak a gazdasejt természetes halálával (kornifikáció) szabadulnak ki a virionok (Stanley, 2006). Ebben, és a következő fejezetben említett folyamatokban betöltött funkcióikkal a vírus E6 és E7 onkoproteinjei központi szerepet játszanak a malignus fenotípus kialakításában.

Azokban a nőkben, akikben a HPV okozta léziók hosszú ideig fennmaradnak CIN1, CIN2, CIN3, majd tovább fejlődve rákos állapot alakulhat ki (Doorbar, 2005). A HPV 16 a leggyakrabban előforduló típus a cervix laphámsejtes karcinómájában (SCC-squamous cell carcinoma), a HPV 18 a második leginkább elterjedt ebben az elváltozásban, és az első az adenokarcinómákban. Ezek a genotípusok ugyanúgy megtalálhatóak azokban a nőkben, akiknél nincs citológiai elváltozás, valamint azoknál, akiknél LSIL vagy HSIL (low- ill. high-grade squamous intraepithelial neoplasia lesion), található. A CIN1 vagy LSIL állapotokban az alacsony és magas kockázatú HPV-k életciklusa még hasonló lehet, mint produktív fertőzés esetén, a kapszid fehérjék a hámréteg felszínén megtalálhatóak, azonban CIN2, 3 és

HSIL esetében a proliferatív fázis lesz intenzívebb, és a produktív szakasz már nem következik be (abortív fertőzés). A neoplázia általában a cervikális transzformációs zónában következik be, ahol az endocervix hengerhámja találkozik az ectocervix lapphámjával (Doorbar, 2006).



1. ábra: A cervikális karcinogenezis folyamata a vírusfertőzéstől az invazív karcinómáig (Woodman *et al.*, 2007)

Az onkogenezishez hozzájárul, hogy a vírus genomja a magas onkogén kockázatú típusok okozta enyhébb elváltozásokban általában episzomális formában van jelen, a progresszió előrehaladtával azonban integrálódhat a gazdasejt DNS-ébe. Az integráció véletlenszerűen történik, a humán genomban nincsenek olyan kifejezett helyek, ahová a vírus DNS-e beépülne. Az integráció általában a vírus E2 ORF-jének felbomlásával történik, ami az E6/E7 expresszióját szabályozza az LCR-hez való kötődés révén. Ennek eredményeképpen az E6 és E7 onkogének szintje megnő, mivel az E2 represszálo hatása eltűnik. Az onkogének fokozott jelenlétében pedig a következő fejezetben említett hatások is kifejezettebbek

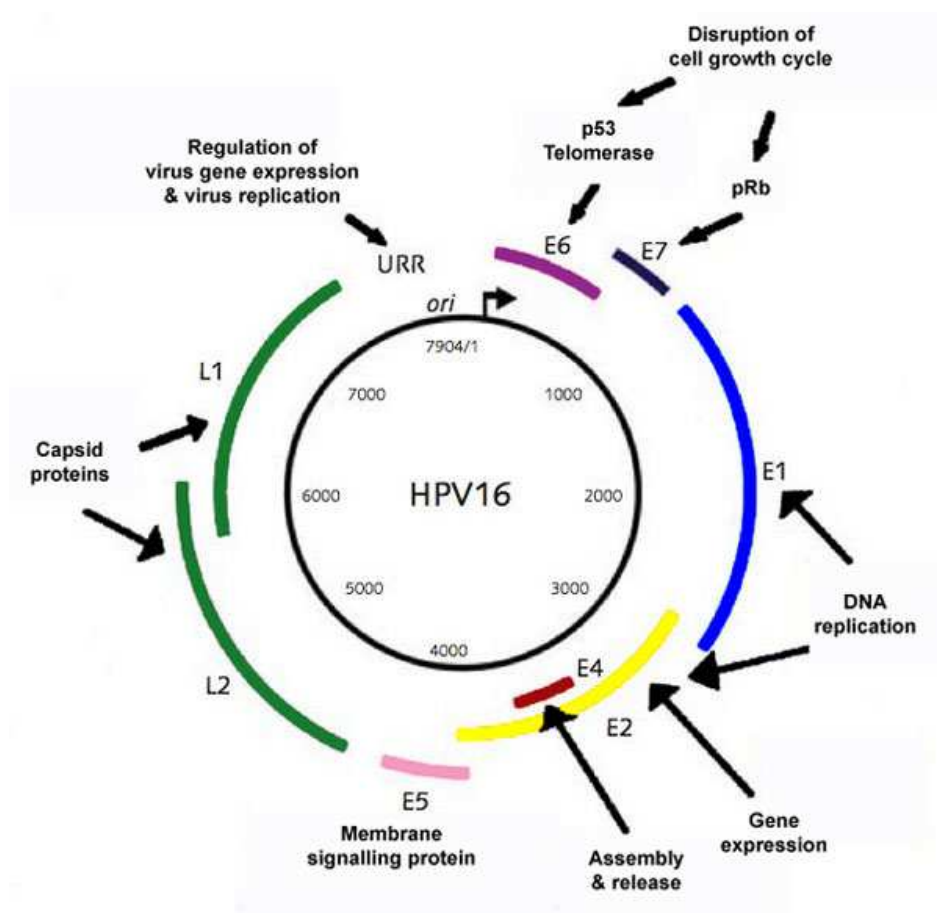
(Doorbar *et al.*, 2012; McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b; Pett & Coleman, 2007). A cervikális karcinogenezis folyamatát, valamint a vírusgenom állapotát a folyamat során az 1. ábra mutatja.

Fontosnak tartom kiemelni, hogy bár a magas onkogenitású HPV-k kockázatot jelentenek az intraepiteliális elváltozások megjelenésére, és ezek malignus transzformációjára, sok fertőzésnek nincs klinikai manifesztációja, ill. az évek során a már meglévő elváltozások is visszaalakulhatnak. A HPV fertőzés magas prevalenciájának ellenére a nők 90 %-ának szervezete eliminálja a vírust (Huh, 2009). Mivel a malignus folyamatok kialakulása általában több évet, akár évtizedet igényel az eredeti fertőzéstől számítva, így elég hosszú időintervallum áll rendelkezésünkre, hogy detektálni tudjuk a fertőzést és az elváltozásokat (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b). A prevenció lehetősége a már létező bivalens (*Cervarix*-HPV 16 és 18 ellen) és tetravalens (*Gardasil*-HPV 6, 11, 16, 18 ellen) vakcinák használatával (Dochez *et al.*, 2014), valamint a rendszeres szűrővizsgálatok elvégzésével adott. Azonban azt is lényeges megemlíteni, hogy specifikus antivirális kezelés és terápiás vakcina jelenleg nem áll rendelkezésünkre (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b).

A HPV genom felépítése és a virális proteinek funkciói

A HPV 16 genomja 7904 bp-ból áll és 7 funkcionális kódoló régiót tartalmaz, genomjának szerkezetét az 2. ábra mutatja be. Az E1 és az E2 korai fehérjék a virális replikáció és transzkripció regulátorai. Az E2 a virális genom expressziójának represszora, és emellett az E1 virális DNS helikázzal kapcsolatba lépve is szabályozza a génexpressziót és virális replikációt. Ezek a gének felelősek a virális DNS episzomális formában tartásáért és sejtosztódás során a vírus genom megfelelő szétválásáért (Doorbar, 2005; 2006; Munger *et al.*, 2004). Emellett az E2-nek még számos funkciója ismert vagy feltételezett, melyek révén a virális karcinogenezisben is fontos szerepet tölt be (Bellanger *et al.*, 2011). Az E4 fehérje a keratin intermediér filamentumokkal kapcsolatba lépve a virionok kiszabadulásában játszik fontos szerepet (Munger *et al.*, 2004). A HPV-k fő onkogénjei az E5, E6 és E7, ezek közül az E5 rendelkezik a leggyengébb onkogén tulajdonsággal. Az E5 az EGFR (epidermal growth factor receptor) megnövekedett aktivitását okozza, és az MHC (major histocompatibility complex) expresszióját gátolja, de tumorokban általában nem expresszálódik (Venuti *et al.*, 2011). Az E6 és az E7 onkogének sokoldalú szerepét a következő részben mutatom be részletesen. Az L1 és az L2 a késői, strukturális proteineket kódolják, a komplett

víruspartikulák felépítését szolgálják. Az L1 az elsődleges struktúrkomponens, amelyből 360 db van a 72 kapszomerben, míg az L2 minor elem, ami a pentavalens kapszomerek közepén található. A genomi LCR (a 2. ábrán URR-upstream szabályozó régió néven szerepel) régió a korai és késői kódoló régiók között található és fontos szerepe van a vírus replikációban és a génexpresszió szabályozásában (Doorbar, 2006; Faridi *et al.*, 2011). A virális gének transzkripcióját két fő promóter szabályozza, a HPV 16 esetén ez a p97 és a p670. A p97 az E6 ORF előtt helyezkedik el, és a vírus korai génjeit szabályozza, még a késői L1 és L2 géneket reguláló szakasz a p670 (Bernard, 2013; Longworth & Laimins, 2004).



2. ábra: A HPV 16 genomjának felépítése és proteinjeinek fő funkciója (forrás: <http://www.microbiologybytes.com/virology/Papillomaviruses.html>)

A HPV E6 és E7 onkoproteinek

A magas kockázatú HPV-k E6 és E7 onkoproteinjei fontos szerepet játszanak a karcinogenezis folyamatában és felelősek a vírus transzformáló képességéért (Munger & Howley, 2002). Sokan vizsgálták különböző sejtvonalakon és modellrendszerekben az onkoproteinek transzformáló képességét, erre mégis a legalkalmasabb rendszer a vírus természetes gazdasejtjének, a primer humán keratinocitáknak a vizsgálata. Számos tanulmány arra a következtetésre jutott, hogy a magas onkogén kockázatú HPV-k E6 ill. E7 onkogénjei együtt képesek indukálni a gazdasejt immortalizációját (Mantovani & Banks, 2001).

A HPV onkogének transzkripcióját az E6 ORF előtt elhelyezkedő közös promóter, a fent már említett p97 szabályozza. Ez a szakasz különböző transzkripciós faktor kötőhelyeket (többek között a virális E2 kötőhelyet is) tartalmaz, amelyek részt vesznek az onkogének transzkripciójának regulációjában. Ezek többek között az Sp1 (Specificity protein 1), C/EBP (CCAAT enhancer binding protein), valamint YY1 (Yin Yang 1) faktorok (Bernard, 2013). Az onkogének egy közös policisztronos mRNS-ről fejeződnek ki, amelyről alternatív splicing mechanizmusokkal képződnek az E6 és E7 onkoproteinek (Mantovani & Banks, 2001).

A HPV E6 proteinje egy 150 aminosavból álló polipeptid, ami 2 cink-ujj motívumot tartalmaz. A fehérje vizsgálata során számos információt nyertünk arról, hogy az E6 milyen celluláris proteinekkel lép kapcsolatba, és ez hogyan járul hozzá a malignus transzformáció kialakításához. Az elsőként felfedezett és egyben talán legfontosabb ilyen célpont a p53 tumorszuppresszor, amit az adenovírus E1B proteinhez és az SV40 T antigénhez hasonlóan a HPV E6 is képes inaktiválni. Normál körülmények között a p53 akkor aktiválódik, ha DNS károsodás történik, ekkor leállíthatja a sejtciklust és apoptózist indukálhat. A magas onkogén kockázatú HPV-ok E6 proteinje a p53 tumorszuppresszor ubiquitin-proteaszóma-mediált degradációját indukálja. Ez a folyamat az E6AP ubiquitin-ligázon keresztül történik (Mantovani & Banks, 2001). Az, hogy a p53 fentebb említett funkciói kiesnek, hozzájárul a gazdasejtek genomjának mutációjához és a malignus folyamatok elindításához. A különböző típusba tartozó HPV-k különböznek a p53, valamint az E6AP kötő képességükben is. A magas kockázatú HPV-k E6-ja ugyanis az E6AP jelenlétében a p53 'core' régióját is nagyobb affinitással képes kötni, és ezáltal a p53-at hatékonyan degradálni (a HPV 16 típus ebben talán a leghatékonyabb). Számos tanulmány szerint a p53 degradációja nem az egyetlen módja annak, hogy az E6 protein a p53 funkcióit gátolja. Mind az alacsony, mind a magas kockázatú HPV E6 proteinek képesek a p53 C-terminálisát kötni, így *in vivo* képesek gátolni a p53-mediálta transzkripciós repressziót. Emellett az E6 megakadályozza a p53 kötődését DNS

felismerő helyeihez, sőt a HPV 16 E6 a p300/CBP transzkripció koaktivátorral kapcsolatba lépve a p53 által szabályozott promóterek represszióját okozza, tehát a p53 által szabályozott gének transzaktivációját is megváltoztatja. Továbbá kimutatták még, hogy a HPV pozitív sejtvonalakban a p53 nukleáris lokalizációja is gátolt, így a protein a citoplazmában marad. Az E6-p53 interakció lényeges mechanizmusa a malignus folyamatoknak, ugyanis a p53 degradálásával a fertőzött sejtekben sorozatos mutációk keletkeznek (Howie *et al.*, 2009; Mantovani & Banks, 2001).

Az E6 proteinnek számos p53-tól független hatása is ismert. A HPV E6 celluláris célpontjai közé tartozik néhány proapoptotikus faktor, például a Bak és Bax proteinek. Ezek a differenciálódó keratinocitákban a vírus replikáció gátjai lennének. Mind az alacsony, mind a magas onkogén kockázatú HPV típusok E6 onkoproteinjei számos celluláris és virális promótert képesek befolyásolni. A már korábban említett p300/CBP transzkripció koaktivátor fontos szerepet játszik a sejtciklus, a differenciáció és az immunválasz szabályozásában résztvevő gének aktiválásában. A HPV 16 E6-ról kimutatták, hogy képes kötni p300/CBP-at és ezzel gátolni a transzkripció aktivitását is a p53 és az NF- κ B által szabályozott promótereken. Az NF- κ B útvonal gátlása több szempontból is érdekes folyamat, ugyanis ez okozza a stratum spinosum hiperproliferációját, ahol a HPV replikáció zajlik és segíti azt, hogy a vírus ki tudja kerülni a lokális immunválaszt (Howie *et al.*, 2009). Az E6 néhány más, a transzkripció szabályozásában részt vevő proteinnel is interakcióba lép, ilyen például az E6TP1 és a hADA3, ezáltal is fontos tumorszuppresszorokat inaktivál (Tungteakkhun & Duerksen-Hughes, 2008). Emellett a HPV 16 E6 kötődik az IRF-3-hoz (interferon regulatory factor), ami az interferon- β (IFN- β) promóter fontos transzaktivátora, így az IFN- β választ is gátolja (Howie *et al.*, 2009; Mantovani & Banks, 2001; Munger & Howley, 2002). Az E6 képes még a celluláris replikációs mechanizmusok szabályozását is megváltoztatni azáltal, hogy a humán telomeráz reverz transzkriptáz gén (hTERT) promóterének transzkripció aktiválását indukálja a c-myc-vel interakcióba lépve (Veldman *et al.*, 2003). A magas onkogén kockázatú HPV-ok E6 proteinjének jól konzervált C-terminális PDZ-kötő motívummal rendelkezik, így a PDZ doménekkel rendelkező fehérjékkel is képes kapcsolódni és az ubiquitin proteaszóma útvonalon keresztül lebontani. Ezek közé a proteinek közé tartoznak például különböző ioncsatornák, szignalizációs enzimek és adhézións molekulák: hDlg (human discs large protein), hScrib (human homologue of Drosophila neoplastic tumor suppressor), MAGI-1 (membrane-associated guanylate kinase), MUPP-1

(multi-PDZ domain protein 1), paxillin (Howie *et al.*, 2009; Mantovani & Banks, 2001; Munger & Howley, 2002).

A HPV E7 proteinek kb. 100 aminosavból álló foszfoproteinek, amik az E6-hoz hasonlóan szintén tartalmaznak cinkkötő doméneket a C terminálison. Az onkoprotein fő biológiai funkciója az, hogy a sejtciklus a differenciálódó keratinocitákban is aktív maradjon, így lehetővé váljon a vírus replikációja is. Az E7 a retinoblasztóma protein (pRb) inaktiválásával a sejtciklus fontos szabályozó pontját teszi inaktívvá. Normál sejtekben az E2F a pRb-vel, és a p107, p130 'pocket' proteinekkel egy transzkripció represszor komplexben van, amelyet a ciklin-dependens kinázok általi foszforiláció szabályoz. A HPV E7 egy LXCXE motívumon keresztül képes kötni a pRB proteineket, ezzel az E2F által szabályozott promótereket transzkripciósan aktiválni és a sejtciklust a G1-ből az S fázisba juttatni. Az alacsony kockázatú HPV típusok (HPV 6, 11) kisebb affinitással kötik a pRB-t, mint a magas kockázatúak (HPV 16, 18) (Banerjee *et al.*, 2006; Munger & Howley, 2002). Számos modell azt bizonyítja, hogy az E7 hatása a pRB/E2F komplexre nem feltétlenül áll szoros kapcsolatban a celluláris transzformációban játszott szerepével, ugyanis néhány alacsony kockázatú HPV (HPV 1, 6) E7 proteinje is képes a pRB kötésén keresztül transzaktiválni az E2F-függő promótereket, azonban mégsem képesek a hatékony transzformációra. Az E2F transzaktiváló hatásán keresztül az E7 képes a ciklin A és E a virális DNS replikációjáért felelős celluláris fehérjéket is szabályozni (Doorbar, 2006). Már korábban kimutatták, hogy a HPV E7 onkogént tartalmazó retrovírus vektorokkal transzdukált primer keratinocitákban az E7 megemeli a ciklin A és E szintjét (Jones *et al.*, 1997; Pei *et al.*, 1998). Ezzel összefüggésben a cdk2-t (ciklin-dependens kináz 2) is aktiválja az E7, valamint a pRB-re kifejtett hatásától függetlenül az enzimatis aktivitását is fokozza (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009a). Továbbá az E7 expresszió a CDC25, celluláris foszfatáz expresszióját is növeli, ami szintén a cdk2 aktivációját idézi elő (Katich *et al.*, 2001).

Leírták, hogy egy másik tumorsuppresszor, a p53 féléletideje megnő az E7-et expresszáló sejtekben, valószínűleg az E7 a p53 degradációját akadályozza meg, és a stabilitását növeli (Munger *et al.*, 2001). Az E7 onkoprotein képes még aktiválni (az adenovírus E1A proteinhez, valamint az SV40 T antigénhez hasonlóan) az adenovírus E2 promótert (Cheng *et al.*, 1995). A HPV 16 E7 gátolja a p21^{CIP1} és p27^{KIP1} ciklin dependens kináz inhibitorok működését, ami szintén lényeges szerepet tölthet be abban, hogy a vírus a differenciálódó hámsejtekben is replikálódni tudjon (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009b; Munger & Howley, 2002). A proliferációban szerepet játszó fehérjék közül a hiszton

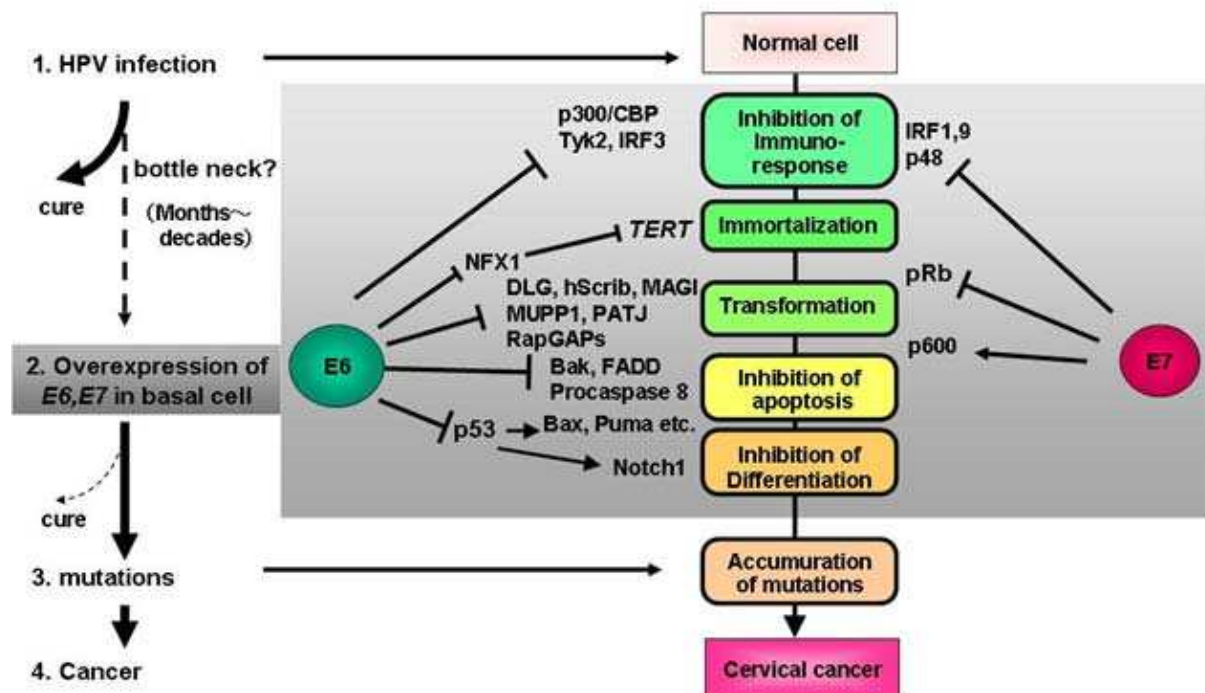
deacetilázokat (HDAC) és az AP1 transzkripció faktor komplex tagjait is szabályozza (Doorbar, 2006).

A magas onkogén kockázatú HPV-ok E7 onkoproteinje gátolja a TGF- β -nak (transforming growth factor β) azt a hatását, hogy képes az epiteliális sejtek növekedését felfüggeszteni. A TNF (tumor necrosis factor α) által okozott citosztatikus aktivitásra szintén rezisztenssé teszi a fertőzött cervix carcinomás sejteket. A HPV E7 képes gátolni az interferonok hatására bekövetkező celluláris választ is azzal, hogy az IRF-1-hez (interferon regulatory factor) kapcsolódik és megakadályozza annak transzkripció aktivitását (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009a).

A HPV E7-et expresszáló sejtek gyakran poliploidok vagy aneuploidok, köszönhetően az abnormális centroszóma duplikációnak és mitózisnak (Munger & Howley, 2002). A magas kockázatú HPV fertőzés egyik markere többek között az aneuploidia és a genetikai változékonyság (Munger *et al.*, 2001). A HPV E7 lényeges szerepet játszik a karcinogenezis folyamatában azzal, hogy aktiválja a gazdasejt DNS szintetizáló rendszerét. Ezek a folyamatok szabálytalan sejtciklushoz, korlátlan sejtosztódáshoz, mutációkhoz és a differenciálódási program megzavarásához vezethetnek. Ehhez járulnak még hozzá az E6 onkogén hatásai is (Cheng *et al.*, 1995; Munger *et al.*, 2001).

Az E6 és E7 onkoproteineknek nincs direkt DNS kötő aktivitása, de képesek transzkripció faktorokkal asszociálódni és megváltoztatni aktivitásukat. Erre a legjobb példa a p53-on vagy E2F-en keresztül kifejtett hatások, amiket már említettem. Ezen kívül az E6 köti a c-myc-et és a transzkripció represszor NFX1-et. Az E7 pedig képes asszociálódni az MPP2 és az AP-1 faktorokkal, valamint gátolni az NF- κ B aktivációt (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009a).

Az E6 és E7 onkoproteinek a többrétegű laphám felsőbb rétegeiben is képesek stimulálni a sejtciklust, így a fertőzött sejtek újra belépnek a sejtciklusba (Doorbar *et al.*, 2012). A két protein több stratégia révén is képes kikerülni az immunrendszert, perzisztenciát alakítanak ki, megváltoztatják a sejtciklust és az apoptózis kontrollját, elősegítik a DNS károsodását és sorozatos mutációját. Erősen szinergista módon hatnak, és összehangolt működésükkel képesek a gazdasejtjüket transzformálni és a HPV-mediált tumorgenezist beindítani (Ganguly & Parihar, 2009; Ghittoni *et al.*, 2010). A HPV onkoproteinek legfontosabb funkcióit és hatásait a celluláris proteinek a 3. ábra mutatja be.



3. ábra: A HPV E6 és E7 onkoproteinek hatása a celluláris proteinekre (forrás: <http://www.ncc.go.jp/en/nccri/divisions/10vir/10vir01.html>)

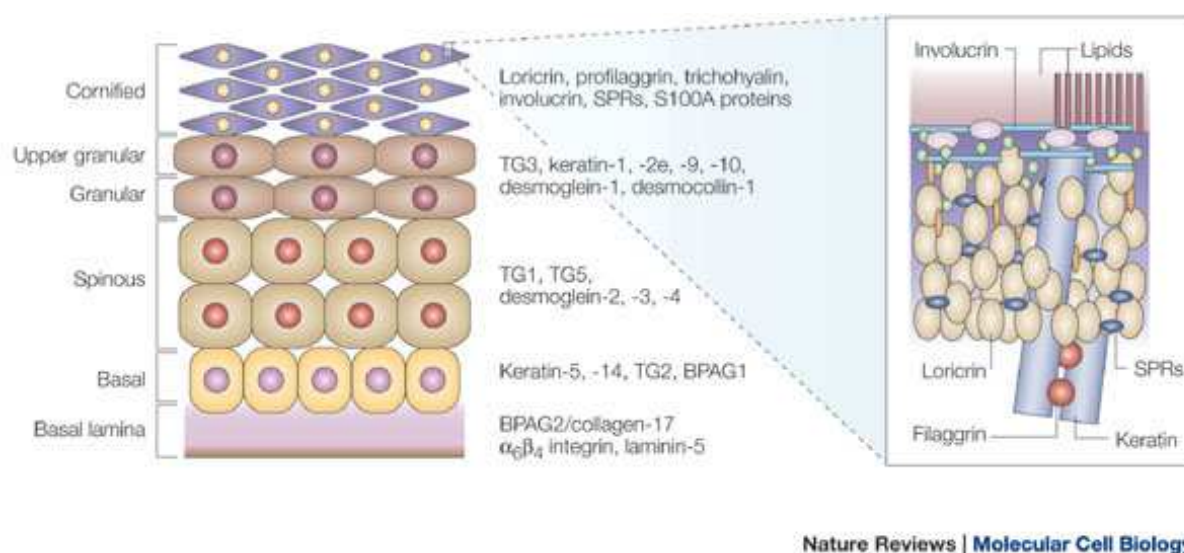
A keratinocita differenciáció

A többrétegű hám legnagyobb mennyiségben jelenlévő, fő strukturális komponense a keratinocita. A bazális sejtek osztódása után, az utódsejtek a hám felsőbb rétegeibe lépve jelentős morfológiai és biokémiai változáson mennek át. A differenciálódás során a folyamathoz köthető gének (involukrin (IVL), lorikrin (LOR), keratinok (KRT), transzglutaminázok (TGM), S100A kalciumkötő fehérjék (S100A) és small prolin-rich proteinek (SPRR)) aktivitása megnő, és számos strukturális protein szintetizálódik. Ezeknek a fehérjéknek egy része (IVL, LOR) a 'cornified envelope' (keratinizált membránképlet, CE) prekursora, ezeket a kalciumion által aktivált keratinocita transzglutamináz (transzglutamináz 1, TGM1) köti kovalensen a sejtek membránjához. Ehhez, valamint a dezmoszomákhoz is kapcsolódnak a keratin filamentumok, így a dezmoszomális fehérjék (dezmooglein, DSG; dezmozokollin, DSC; dezmozoplakin, stb.) és a keratinok (KRT1, 4, 10) is a CE részei lesznek. A folyamat időben és térben szigorúan szabályozott, végeredménye a bőr elhalt, felső rétege, a stratum corneum (Eckert *et al.*, 2004; Eckert & Rorke, 1989; Eckert *et al.*, 2005; Nemes &

Steinert, 1999; Robinson *et al.*, 1997). A keratinocita differenciálódás folyamatát a 4. ábra szemlélteti.

Az IVL fehérje egy 68 kDa nagyságú, rúd alakú, glutaminban gazdag citoszolikus molekula. A protein más fehérjékkel (mint pl. a LOR) együtt a CE alapját adja és a membrán proteinekhez a transzglutamináz 1 (TGM1) köti a keratinocita differenciálódás során (Eckert *et al.*, 1993). Expresszióját az AP-1, Sp1 és C/EBP transzkripciós faktorok, valamint a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK), a protein-kináz C (PKC) és RAS szignáltranszdukciós útvonalak szabályozzák (Eckert *et al.*, 2004; Eckert *et al.*, 2005).

Az S100 kalciumkötő fehérjék és a SPRR-ek szintén kalciumion által szabályozódnak, és más prekursorok kapcsolódását segítik elő a CE-hez (Robinson *et al.*, 1997). A keratinok (KRT) közül a KRT5 és 14 a bazális rétegben, KRT1, 4, 10 a differenciálódó rétegekben expresszálódnak (Lippens *et al.*, 2005; Porter & Lane, 2003).



4. ábra: Keratinocita differenciálódás folyamata a többrétegű hámban és a CE (cornified envelope) felépítése (Candi *et al.*, 2005)

A keratinocita differenciálódásban résztvevő gének nagy része a humán kromoszóma 1q21 régiójában lokalizálódik, többek között IVL és más CE prekursorok (LOR; SPRR-ek és late cornified envelope proteinek, LCE), S100A és az ehhez fuzionáló egyéb proteinek (fillaggrin, FLG; trichohyalin, TCHH) kódoló régiói. Ezen gének által alkotott klaszter az EDC (epidermal differentiation complex). Általánosan elmondható, hogy az EDC gének forbol-észterrel és az intracelluláris kalciumionszint megemelésével indukálhatók a PKC útvonalon keresztül, azonban retinoidok gátolják az aktivitásukat. Eddig nem sikerült

felfedezni egy olyan fő szabályozó mechanizmust, ami az EDC géneket egységesen szabályozná annak ellenére, hogy a kromoszómán egy klaszterbe rendeződnek. Úgy tűnik, hogy az EDC gének a transzkripció szintjén szabályozódnak, több transzkripciós faktor (AP-1, AP-2, Sp1, Ets és POU faktorok) szoros összehangoltságában (Eckert *et al.*, 1997; Kypriotou *et al.*, 2012; Rossi *et al.*, 1998). Botchkarev és munkatársai összefoglalták, hogy a differenciációval összefüggő gének kifejeződése más epigenetikai mechanizmusoktól sem független, például hatással vannak rá a DNS ill. hiszton modifikációk és a kromatin átrendeződések is (Botchkarev *et al.*, 2012).

A keratinociták differenciálódásának tanulmányozására számos modellrendszert kipróbáltak. A leggyakrabban használt rendszerben a primer keratinocitákat alacsony kalciumtartalmú tápfolyadékban tartják szaporodóképes állapotban, és a differenciáltatást a kalciumionszint emelésével, esetleg szérum hozzáadásával idézik elő. Borowiec és munkatársai azt találták, hogy a kalciumion, a szérum, a konfluencia és az alacsonyabb tenyésztési hőmérséklet együtt növelik leghatásosabban a differenciálódás mértékét (Borowiec *et al.*, 2013).

A HPV fertőzés és a keratinocita differenciáció kapcsolata

A HPV-k az epiteliális sejteket fertőzik, és a hámréteg differenciálódásától függ az életsiklusuk. A vírus a többrétegű hám bazális sejtjeihez mikrosérüléseken keresztül jut el. Ezután a vírus alacsony kópiaszámban (10-200) episzomális formában marad fenn az alapi sejtekben. A replikációjához a vírus a sejt DNS szintetizáló rendszerét használja fel. A hámréteg felsőbb rétegeiben a sejtek kilépnek a sejtciklusból, azonban a fertőzött keratinocitákban a HPV onkoproteinjeinek hatására a sejtciklus aktív marad. Ezáltal a differenciálódott rétegekben is működésbe lépnek azok a celluláris replikációs faktorok, amik nélkülözhetetlenek a vírusok replikációjához. Ahhoz, hogy infektív virionok képződjenek a genom amplifikációján kívül, a virális DNS-nek fertőzőképes partikulákba kell csomagolódnia. A papillomavírusok nem lítikusak, a virionok felső réteget elért keratinocitákkal együtt válnak le a hámrétegről, és innen szabadulnak ki. A lefűződés után a vírus a környezetben képes fennmaradni és innen fertőzni. A vírus életsiklusa tehát a keratinociták differenciálódási folyamatával szoros kapcsolatban van (Doorbar, 2005; Doorbar *et al.*, 2012; Kajitani *et al.*, 2012).

Ismert, hogy a magas kockázatú genitális HPV-k megzavarják a gazdasejt differenciálódási folyamatát, amelynek célja valószínűleg az, hogy a differenciálódó hámsejtekben is biztosítva legyenek a vírus számára a replikációjához szükséges celluláris faktorok, amelyek fertőzetlen differenciálódó sejtekben már általában nincsenek jelen. Ebben fontos szerepet játszanak a vírus onkoproteinjai, amit előbbi fejezetekben már taglaltam. A magas onkogén kockázatú HPV-k keratinocita differenciálódásra kifejtett gátló hatása még kifejezettebb premalignus és malignus léziókban, úgymint a CIN és a cervix carcinoma. Ezekben az elváltozásokban a vírus életciklusa nem produktív, és a késői gének expressziója, valamint a vírusprodukció elmarad (Doorbar, 2005; Doorbar *et al.*, 2012).

A differenciálódó sejtek DNS replikációja az E7 onkoprotein hatására reaktiválódik, ezáltal biztosítja a vírus a virális genom replikációját is (Cheng *et al.*, 1995; Longworth & Laimins, 2004). A HPV 16 E7-ről kimutatták, hogy késlelteti az involucrin és keratin 10 differenciálódási markerek szintjét humán keratinocitákban (Jones *et al.*, 1997). A HPV 16 E6 jelenléte gátolja a kalcium és szérum indukálta differenciálódást humán keratinocytákban (Sherman & Schlegel, 1996). Organotipikus sejt kultúrákban is megzavarja a hámréteg differenciálódását az E6 (Zehbe *et al.*, 2009). Xenograft modellt használva Lehr és munkatársai mutatták meg, hogy a HPV 11 ill. 59 típusok megváltoztatják néhány CE protein (LOR, SPRR) expresszióját, mRNS és fehérje szinten is (Lehr & Brown, 2003; Lehr *et al.*, 2004).

Széleskörű génexpressziós vizsgálatok kimutatták, hogy méhnyakrákos mintákban néhány differenciálódásban résztvevő gén (IVL, SPRR-ek, S100A proteinek, KRT-ok) expressziója csökken a normál cervikális hámsejtekhez képest (Santin *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2006). Mások rekombináns retrovírus vektorokkal transzdukált humán keratinocitákban mutatták ki, hogy a HPV 16 E6 és/vagy E7 a differenciálódáshoz köthető gének expresszióját gátolja (Duffy *et al.*, 2003; Karstensen *et al.*, 2006; Kravchenko-Balasha *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2008). Ismert, hogy ezek a gének a transzkripció szintjén szabályozódnak (Eckert *et al.*, 1997), ezért feltételezhetjük, hogy a HPV onkoproteinek hatnak ezen gének promóter aktivitására.

CÉLKITŰZÉSEK

A munkám során a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatását tanulmányoztam a keratinociták differenciálódásában résztvevő gének expressziójára és transzkripció szabályozására. Ehhez az alábbi célokat tűztem ki:

- Primer humán keratinocitákban ellenőrizzük, hogy az involucrin mRNS és fehérje szintje hogyan változik a HPV 16 E6, E7 ill. E6/E7 onkogének ill. a differenciáltatás hatására.
- A HPV 16 onkogének hatásának vizsgálata az involucrin promóter aktivitására és ennek a hatásnak a lokalizációja a szabályozó régió belül.
- HPV 16 E6, E7 ill. E6/E7 onkogéneket expresszáló keratinocitákban microarray analízissel vizsgáljuk a celluláris gének expressziós változásait, fókuszálva a keratinocita differenciálódásban résztvevő génekre.
- Valós idejű RT-PCR segítségével a microarray eredmények és az irodalomból már ismert egyéb, a keratinociták differenciálódásában fontos gének expressziós változásainak megerősítése.
- Néhány differenciálódásban fontos gén promóter aktivitásának vizsgálata HPV onkogének jelenlétében tranziens transzfekciós kísérletekben.
- Vizsgálni a keratinocita differenciálódási folyamatot szabályozó transzkripció faktorok aktivitását HPV 16 E6 ill. E7 onkogének hatására.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejttenyésztés

A primer humán keratinocita sejtvonalat (HFK-human foreskin keratinocytes) szérummentes, alacsony kalciumtartalmú (<0,1 mM) DK-SFM (Defined Keratinocyte-Serum Free Medium; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) tápfolyadékban tenyésztettük. A PA317-LXSN, -16E6, -16E7, -16E6E7 rekombináns retrovírus termelő sejtvonalatokat az ATCC-től (American Type Culture Collection) szereztük be és 10 % borjúsérumot (FBS), 2 mM glutamint, 100 U/ml penicillint és 100 U/ml streptomycint tartalmazó DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, Saint Louis, MO, USA) tápfolyadékban tartottuk fenn. A primer keratinocitákat a PA317 sejtvonalak felülűszojával fertőztük és geneticinnel (100 µg/ml G418, Invitrogen) szelektáltuk. Az így nyert sejtvonalak a HPV 16 onkogénjeit expresszálják: HFK-LXSN (kontroll retrovírus vektorral transzdukált sejtvonala), HFK-16E6, HFK-16E7, HFK-16E6E7. A fertőzött sejtek egy részét 10 % FBS-t tartalmazó DMEM (1,8 mM kalcium) tápfolyadékban 24 óráig differenciáltattuk. Minden sejtvonalat 37 °C-on, 5 % CO₂ jelenlétében tenyésztettünk.

Microarray

A HPV onkogénekkel transzdukált keratinocitákból RNeasy Mini Kit (Qiagen; Hilden, Germany) segítségével izoláltunk RNS-t három biológiai párhuzamosban. Az RNS integritását Agilent Bioanalizátor 2100-zel (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA) ellenőriztük, és a kísérleteinkben 9.0-nél nagyobb RIN (RNS integritási szám) érték feletti RNS mintákat használtuk. Az RNS koncentrációját NanoDrop ND-100-zal határoztuk meg. Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST Array-vel (Affymetrix; Santa Clara, CA, USA) végeztük a globális génexpressziós vizsgálatot. 200 µg RNS-t használtunk az amplifikációs (Ambion WT Expression Kit; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) és jelölési reakcióhoz (Genechip WT Terminal Labeling és Control Kit, Affymetrix). A mintákat 45 °C-on 16 óráig keresztül hibridizáltattuk és standard mosási protokollt végeztünk az Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450-en. Az array-eket a GeneChip Scanner 7G-vel (Affymetrix) szkenneltük.

Az RNS jelölési és hibridizációs lépéseket Dr. Póliska Szilárd (UD-GenoMed Kft., Debrecen) végezte.

Microarray adatelemzés

Az adatelemzéseket a Genespring 12 GX szoftverével (Agilent Technologies) végeztük. Az Affymetrix CEL fájlokat RMA analízisnek (robust multichip analysis) és median normalizációnak vetettük alá. Az expresszálódó gének csoportját úgy határoztuk meg, hogy a legalacsonyabb intenzitású gének 20 %-át és azokat a géneket, amik a mediánhoz képest nem mutattak legalább 2-szeres eltérést kiszűrtük, így maradt 3293 gén, amiket változó géneknek neveztünk. A statisztikai analízist ezeken a géneken végeztük el. Az általunk használt elemzés az egytényezős varianciaanalízis (ANOVA), amit Tukey-féle post hoc teszttel egészítettünk ki. Az elfogadott szignifikancia szintje $p < 0,05$, a fold change értéke 1,5 volt. A fold change értékeket a normalizált expressziós értékek log2-es értékéből számoltuk, a HPV onkogénekkal transzdukált sejtek értékeit a vektor kontrollal (LXSN) transzdukált sejtekéhez viszonyítottuk. A további elemzéseket az Ingenuity Pathway Analysis (IPA) szoftverrel végeztük (Ingenuity Systems). A microarray adatok elérhetőek az NCBI Gene Expression Omnibus-ban (Edgar *et al.*, 2002) a GSE58841 GEO számon (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=gse58841>).

Reverz transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR)

A differenciáltatott és nem differenciáltatott transzdukált keratinocita sejtekből Tri Reagens-sel (Sigma) RNS-t izoláltunk a gyártó cég utasításai szerint. A High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével végeztük el a reverz transzkripció lépést 0,5-1 µg RNS-ből. A PCR reakcióhoz GoTaq polimerázt (Promega, Madison, WI, USA) használtunk a következő hőmérsékleti profillal: 95 °C 2 min, majd 40-cikluson keresztül 95 °C 30 másodperc denaturáció, 55 °C 30 másodperc anelláció és extenzió 72 °C 1 perc, majd 72 °C 5 perc. A primerpárokat, amiket a GAPDH (glicerinaldehid 3-foszfát dehidrogenáz), a HPV16 E6 és E7 amplifikálásához használtunk, korábban munkacsoportunk tagjai már leírták (Borbely *et al.*, 2006).

Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (real-time RT-PCR)

Az RNS izolálást és a cDNS előállítását az előző bekezdésben leírtak szerint Tri Reagens-sel ill. RNeasy Mini Kit-tel (Qiagen), valamint High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) segítségével végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. A valós idejű PCR-t a 7500 Real Time PCR System-en végeztük TaqMan Gene Expression Master Mix-szel, 20 µl végtérfogatban a gyártó előírásai szerint (Applied Biosystems). A közleményekben használt TaqMan Gene Expression Assay-k listáját a 1. táblázat mutatja. A relatív kvantifikációhoz a GAPDH-t (0711024, Applied Biosystems) használtuk endogén kontrollként és a kontroll retrovírus vektort tartalmazó sejtvonalból (HFK-LXSN) nyert értékekhez viszonyítottuk a többi sejtvonalból nyert eredményeket a komparatív Ct módszerrel. Az RQ (relatív quantity) eredményeket standard deviációval és konfidencia intervallumokkal a 7500 System SDS szoftver 1.4 verziójával nyertük. Minden PCR reakciót legalább 3 párhuzamosban és 3 ismétlésben végeztünk.

1. táblázat: A közleményekben használt TaqMan Gene Expression Assay-k listája

Gének jele	Gének neve	Assay azonosítója
CDC25A	cell division cycle 25A	Hs00947994_m1
CNFN	kornifelin	Hs00261196_m1
DSC1	dezmokollin 1	Hs00245189_m1
DSG1	dezmoglein 1	Hs00170047_m1
IVL	involukrin	Hs00846307_s1
KRT1	keratin 1	Hs00196158_m1
KRT4	keratin 4	Hs00361611_m1
KRT5	keratin 5	Hs00361185_m1
KRT10	keratin 10	Hs00166289_m1
LOR	lorikrin	Hs01894962_s1
NOTCH1	notch 1	Hs01062014_m1
SERPINE2	plazminogén aktivátor inhibitor-2	Hs00234032_m1
S100A8	S100 kalciumkötő fehérje A8	Hs00374264_g1
S100A9	S100 kalciumkötő fehérje A9	Hs00610058_m1
S100A10	S100 kalciumkötő fehérje A10	Hs00741221_m1
S100A12	S100 kalciumkötő fehérje A12	Hs00942835_g1
SPRR1A	small prolin-rich protein 1A	Hs00954595_s1
SPRR1B	small prolin-rich protein 1B	Hs00234164_m1
TGM1	transzglutamináz 1	Hs00165929_m1
TERT	telomeráz reverz transzkriptáz	Hs00162669_m1

Fehérje izolálás és western blot

A differenciáltatott és nem differenciáltatott transzdukált keratinocitákból proteáz (Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail; Roche, Basel, Switzerland) és foszfatáz gátló (1mM Na₃VO₄, 1 mM NaF) szereket tartalmazó RIPA lízis pufferrel (150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5% Na-dezoxikolát, 0.1% SDS, 0.01% Na-azid, 1 mM EDTA, pH 7.4) izoláltunk fehérjét. A lízis pufferben a tenyésztőflaskáról leválasztott sejteket 15 percig jégen inkubáltuk, majd 13000 rpm-en, 4 °C-on 15 percig tartó centrifugálást követően a felülúszó összfehérjetartalmát Bradford teszt segítségével határoztuk meg. A fehérjeextraktumokból 10 µg mennyiséget 10 %-os SDS poliakrilamid gélben választottuk szét, majd blottoltuk át nitrocellulóz membránra a Bio-Rad (Herkules, CA, USA) készülékének (Mini Protean II) segítségével. 5 % tejport tartalmazó TBST-vel (Tris-sel pufferelt sóoldat 0,05 % Tween 20-szal kiegészítve) blokkoltuk a membránok aspecifikus kötőhelyeit. A blottokat éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk az elsődleges ellenanyagokkal (egér monoklonális anti-involukrin, sc-56555 és anti-p53, sc-126, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA; és nyúl poliklonális anti-aktin, A2066, Sigma) 1:2000-es hígításban 5 % tejporral kiegészített TBST-ben. TBST-s mosást követően 1 órán keresztül kecske anti-egér (sc-2005) és kecske anti-nyúl (sc-2004) tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk a megfelelő membránokat. Újabb mosást követően a SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce; Rockford, IL, USA) segítségével detektáltuk az antitest komplexeket röntgenfilmen. A Gel Doc 2000 géldokumentációs rendszerét (Bio-Rad) és a Quantity One szoftvert (4.0.3. verzió) használtuk a fehérjemennyiségek denzitometriás meghatározásához. Az involukrin és a p53 fehérjeszintjét az aktin mennyiségére normalizáltuk és a kontroll retrovírust tartalmazó (HFK-LXSN) sejtvonalhoz viszonyítottuk. A kísérleteket ebben az esetben is legalább 3-szor ismételtük.

Plazmidok

A pGL3-IVL luciferáz riporter plazmidot, ami a humán involukrin (IVL) gén 3,7 kb hosszúságú promóter régióját tartalmazza a luciferáz gén elé kódolva, Dr. Daniel D. Bikle-től kaptuk (Ng *et al.*, 2000). Az IVL promóter rövidebb szakaszait tartalmazó konstruktokhoz a pGL3-IVL plazmidot használtuk templátként. A 2418 bp, a 1809 bp, a 744 bp és 272 bp hosszúságú szakaszokat a 2. táblázatban feltüntetett primerek segítségével amplifikáltuk

GeneAmp High Fidelity System-mel (Applied Biosystems) a gyártó utasításainak megfelelően. A PCR termékeket preparatív agaróz gélben elektroforetizáltuk, majd abból kivágva Qiaquick Gel Extraction Kittel (Qiagen) tisztítottuk ki a gyártó előírásai szerint. A PCR termékeket és a pGL3-Basic vektort *Xho*I és *Hind*III restrikciós enzimekkel emésztettük, és Qiaquick PCR Extraction Kittel (Qiagen) tisztítottuk ki. Végül az emésztett PCR termékeket T4 DNS ligázzal (New England Biolabs; Ipswich, MA, USA) a pGL3-Basic vektorba klónoztuk. A plazmidokat TransformAid Bacterial Transformation Kit-tel (Thermo Scientific; Waltham, MA, USA) XL-1 *Escherichia coli* baktériumtörzsbe transzformáltuk, és a plazmid ampicillin rezisztenciáját kihasználva 100 µg/ml ampicillin tartalmú LB (Luria-Bertani) táptalajban felszaporítottuk. A vektor konstruktokat Qiafilter Plasmid Midi Kit-tel (Qiagen) preparáltuk a gyártó utasításainak megfelelően. A plazmidok helyes nukleotid sorrendjét szekvenálással ellenőriztük az UD-GenoMed Kft. (Debrecen) segítségével. A következő IVL promóter konstruktokat nyertük: pGL3-IVL-2418, pGL3-IVL-1809, pGL3-IVL-744, pGL3-IVL-272.

2. táblázat: A humán involukrin promóter különböző hosszúságú szakaszait tartalmazó plazmidok készítéséhez használt PCR primerek szekvenciái

Plazmidok	Primer szekvenciák (5'- 3' irányban)	Restrikciós enzim
pGL3-IVL-2418	GCGCCTCGAGCAGTGAAAGAACCTCTCCCA	<i>Xho</i> I
	GCGCAAGCTTCCATCCGACACTTACCAGAC	<i>Hind</i> III
pGL3-IVL-1809	GCGCCTCGAGATGATCCAGGAACATGACAA	<i>Xho</i> I
	GCGCAAGCTTCCATCCGACACTTACCAGAC	<i>Hind</i> III
pGL3-IVL-744	GCGCCTCGAGTTCTTATGAGCATGGCATTTC	<i>Xho</i> I
	GCGCAAGCTTCCATCCGACACTTACCAGAC	<i>Hind</i> III
pGL3-IVL-272	GCGCCTCGAGAGTTGAGCTACCAGAATCCT	<i>Xho</i> I
	GCGCAAGCTTCCATCCGACACTTACCAGAC	<i>Hind</i> III

A p53-Luc, pAP-1-Luc és pC/EBP-Luc riporter plazmidokat, amik a p53, AP-1 és C/EBP kötőhelyek több kópiáját, valamint a luciferáz gént tartalmaznak, az Agilent Technologies-től szereztük be. A pAdE2Luc riporter konstruktot (adenovírus E2 és luciferáz gént tartalmaz) Dr. Ann Roman-tól kaptuk (Armstrong & Roman, 1997). A HPV 16 onkogénjeit tartalmazó pcDNA-16E6, és -16E7 expressziós vektorokat korábban munkacsoportunk tagjai írták le (Murvai *et al.*, 2004).

A keratin 4 (KRT4), a keratin 5 (KRT5), a small prolin-rich protein 1A (SPRR1A), a S100 kalcium kötő fehérje A8 (S100A8) és a dezmozokollin 1 (DSC1) gének promóter régióit

tartalmazó *Renilla* luciferáz riporter plazmidokat (*Renilla reniformis* luciferáz génjét tartalmazza) a SwitchGear Genomics-tól (Menlo Park, CA, USA) szereztük be.

Tranziens transzfekció

A 3-6. passzázsú primer humán keratinocitákat 6 lyukú sejtenyésztő plate-eken tenyésztettünk, úgy, hogy a transzfektáláskor 70-80 %-os konfluenciát érjünk el. A sejteket 0,5 µg riporter plazmiddal (pGL3-IVL, pGL3-IVL-2418, pGL3-IVL-1809, pGL3-IVL-744, pGL3-IVL-272, p53-Luc, pAP-1-Luc, pC/EBP-Luc, pAdE2Luc, KRT4, KRT5, SPRR1A, S100A8 vagy DSC1) és 0,25 µg expressziós vektorral (pcDNA-kontrol, pcDNA-16E6 ill. pcDNA-16E7) kotranszfektáltuk Effectene transzfekciós reagenssel (Qiagen) a gyártó előírásainak megfelelően. Az expressziós vektorok összmenyiségét minden transzfekciós kísérletben egyformán 0,25 µg-on tartottuk. A transzfekciós mixet OptiMEM (Invitrogen) tápfolyadékban adtuk a sejtekhez, 5 óra 37 °C-os inkubáció után a tápfolyadékot lecseréltük DK-SFM-re. A transzfekciót követően 24 órával a sejtek egy részét további 24 óráig 10 % FBS-t tartalmazó DMEM (1,8 mM kalcium) tápfolyadékban differenciáltattuk. 48 órával a transzfekció után a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, és a riporter plazmidoknak megfelelő lízis pufferrel (*Renilla* Luciferase Assay Lysis Buffer a *Renilla* riporter plazmidoknál, a többi riporter plazmid esetében pedig Reporter Lysis Buffer és Cell Culture Lysis Reagent, Promega) tártuk fel egy fagyasztás-olvasztás ciklust, valamint centrifugálást követően (13000 rpm, 15 perc, 4 °C). Luciferase Assay System és *Renilla* Luciferase Assay System (Promega) segítségével mértük le az egyes riporter konstruktok luciferáz aktivitását Berthold luminométeren. A reakció során a fény a luciferin oxidációjának kémiai energiájából származik és a fotonok felszabadulását a luminométerrel tudjuk detektálni. Az általunk használt riporter plazmidok tartalmazzák a luciferáz gént az adott promóterek vagy transzkripció faktor kötőhelyek után kódolva. Aktivitásukból következtethetünk a promóterek ill. a faktorok transzkripció aktivitására és arra, hogy a HPV 16 onkogének ill. a differenciáltatás hogyan hatnak az adott szabályozó régiókra. Kezdeti kísérleteinkben használtunk egy *Renilla* luciferáz riporter vektort endogén kontrollként a transzfekció hatékonyságának ellenőrzésére. Azonban azt tapasztaltuk, hogy a HPV E6-nak hatása volt a belső kontroll aktivitására is. Emellett, a *Renilla* luciferázt tartalmazó riporter plazmidok gyártója (SwitchGear Genomics) nem javasolja a kotranszfektált riporter plazmidok használatát a transzfekciós hatékonyság ellenőrzésére. Ezért a továbbiakban Bradford protein

tesztel a sejtek teljes fehérjetartalmára normalizáltuk a luciferáz aktivitásokat. A kísérleteket legalább három ismétlésben végeztük, a kapott eredményeket átlagoltuk és SEM (standard error of mean) értékekkel együtt ábrázoltuk. A luciferáz aktivitás értékeket azoknak a sejteknek az aktivitásához viszonyítottuk, amelyek a megfelelő riporter plazmid mellett az üres (pcDNA) expressziós vektorokkal voltak transzfektálva. Az átlagok közötti statisztikai különbségeket t-próba (kétmintás és párosított t-teszt logaritmikus transzformáció után) segítségével elemeztük ki. Szignifikánsnak a $p < 0,05$ értékeket tekintettük.

EREDMÉNYEK

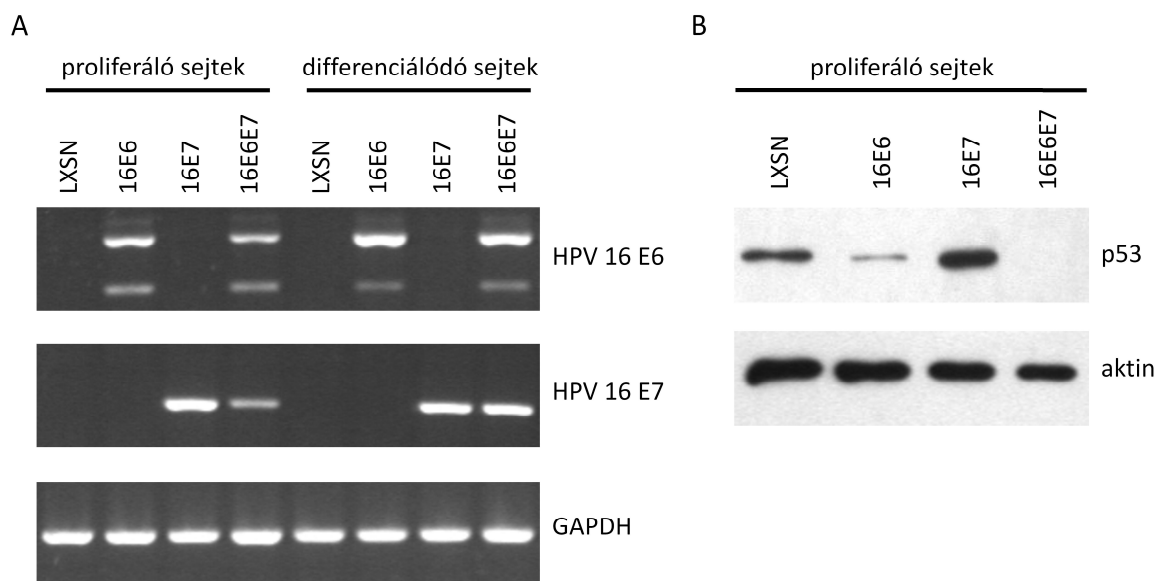
Humán papillomavírus 16 onkoproteinek hatása az involukrin expressziójára humán keratinocitákban

HPV 16 onkogéneket expresszáló humán keratinociták jellemzése

Ahhoz, hogy tanulmányozni tudjuk a HPV onkogének hatását a celluláris gének expressziójára, primer humán keratinocitákat transzdukáltunk rekombináns retrovírus vektorokkal, amelyek kontrol vektort (LXSN), a HPV 16 E6 vagy E7 ill. mindkét onkogént expresszálják. A HPV E6 és E7 mRNS-ek jelenlétét RT-PCR segítségével igazoltuk a transzdukált sejtekben (5A. ábra), a munkacsoportunk által korábban már leírt primerek segítségével (Borbely *et al.*, 2006). Az ábrán látható két sáv közül a felső a teljes hosszúságú E6 mRNS-t, az alsó pedig az E6*I, az E6 rövidebb splice variánsát mutatja, ahogy azt Rose és munkatársai korábban leírták (Rose *et al.*, 1995).

A funkcionálisan aktív HPV onkoproteinek jelenlétét a celluláris p53 tumorszuppresszorra kifejtett hatásukkal igazoltuk (5B. ábra). A HPV 16 E6-tal transzdukált sejtekben a p53 protein szintje kb. tizedére csökkent annak, amit a kontroll sejtekben tapasztaltunk, míg az E7 inkább stabilizálta, kb. 1,6-szorosára növelte a p53 protein szintjét (denzitometriás adatok alapján) (Mantovani & Banks, 2001; Munger *et al.*, 2001).

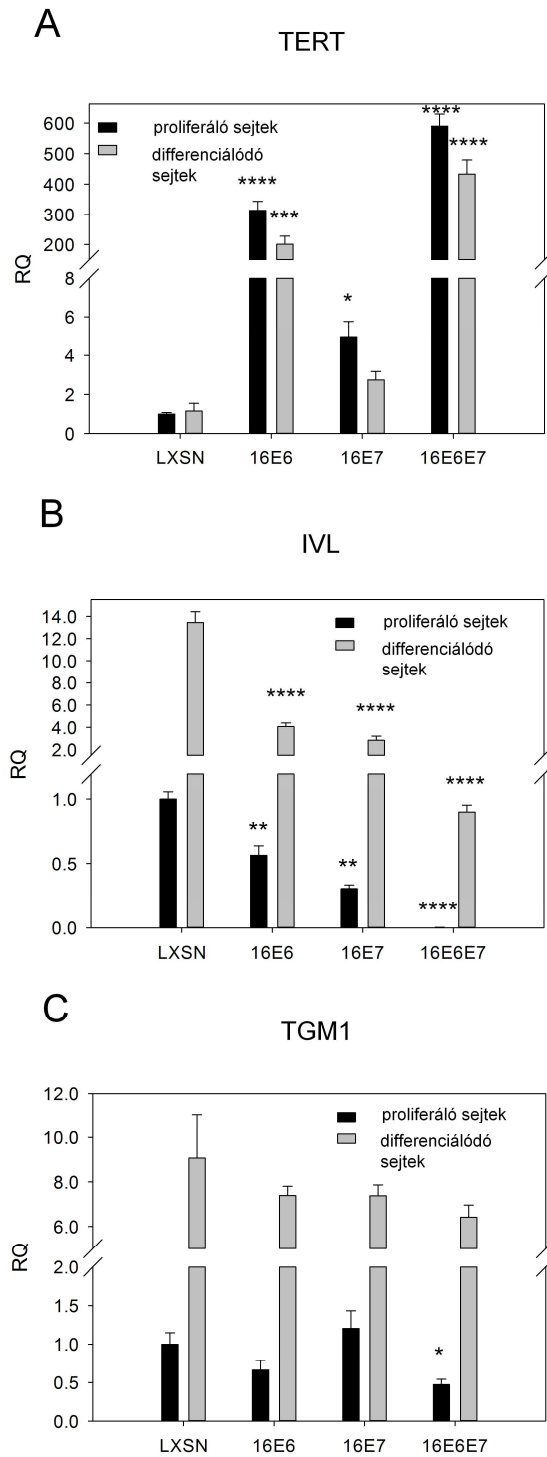
Valós idejű PCR segítségével mutattuk ki a HPV onkogének hatását a különböző celluláris gének mRNS szintjére. Ezekben a kísérletekben 5-6. passzázsú sejteket használtunk, azért, hogy az onkoproteinek akut hatását tudjuk tanulmányozni. A transzdukciót követően a sejtek a szérumentes tápfolyadékban megtartották a proliferáló, nem differenciálódó fenotípusukat. A sejtek egy részét DMEM (10 % szérum és magas kalciumtartalmú) tápfolyadékban differenciáltattuk 24 órán keresztül, ahogy azt már korábban leírták (Jones *et al.*, 1997; Sherman & Schlegel, 1996). A HPV 16 E6 onkogénről már kimutatták, hogy a humán telomeráz reverz transzkriptáz (TERT) promóterét transzaktiválja (Howie *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2008). Ennek megfelelően az E6 jelenléte nagymértékben (kb. 300-szorosára) növelte a TERT mRNS szintjét ($p < 0,001$), míg az E7 kisebb mértékben, de még mindig szignifikánsan ($p < 0,05$) növelte az expressziót (6A. ábra). A differenciáltatásnak nem volt szignifikáns hatása a TERT mRNS szintjére egyik transzdukált sejtben sem.



5. ábra: A HPV onkogének expressziója a transzdukált humán keratinocitákban. (A) Az egyes HPV 16 onkogének expressziójának megerősítése RT-PCR segítségével a különböző sejtvonalakban (GAPDH-endogén kontroll). (B) A HPV 16 E6 és E7 hatása a p53 fehérjére (aktin-kontroll). Az ábra egy reprezentatív röntgenfilmet mutat.

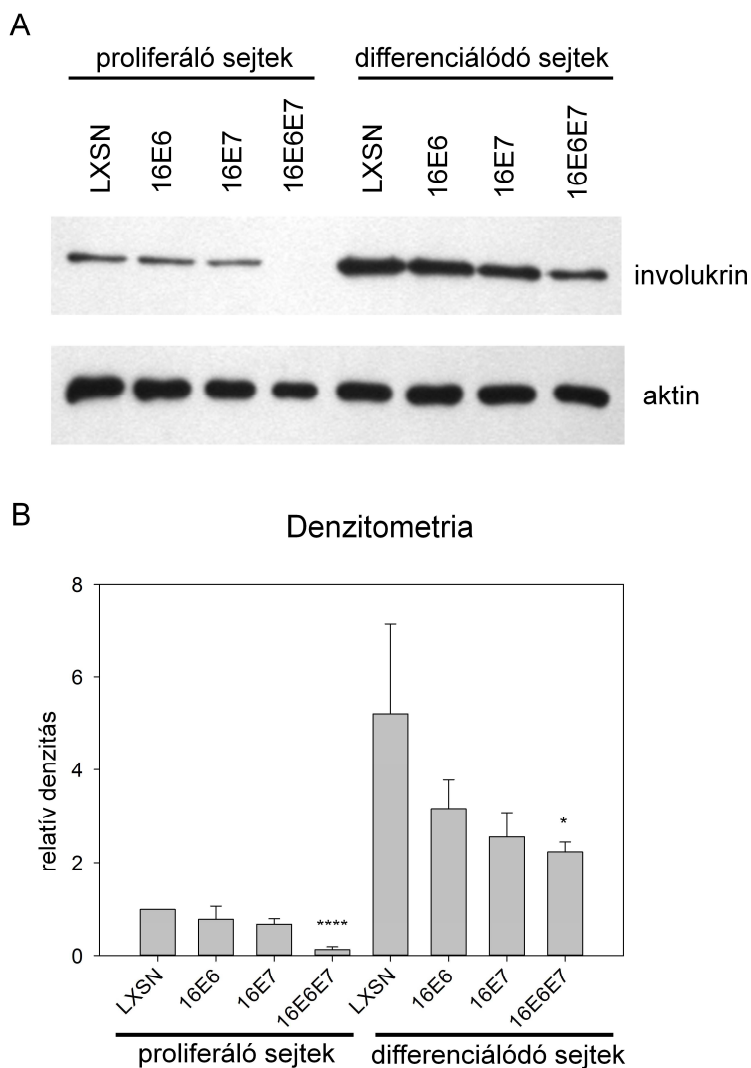
HPV 16 onkoproteinek hatása a keratinociták differenciálódásában résztvevő gének expressziójára

Valós idejű PCR-rel vizsgáltuk a HPV 16 onkoproteinek hatását egyes differenciálódási markerek, így a transzglutamináz 1 (TGM1) és fő szubsztrátja, az involukrin (IVL) expressziójára a HPV onkogénekkal transzdukált sejtvonalakban. A keratinociták differenciálódásának indukálása szérummal és kalciummal megnövelte mind a TGM1, mind az IVL mRNS szintjét ($p < 0,005$) (6B és 6C. ábra). A proliferáló sejtekben mind az E6, mind az E7 szignifikánsan ($p < 0,01$) csökkentette az IVL expresszióját (6B. ábra). A mindkét onkogént expresszáló (HFK-16E6E7) sejtekben ez a hatás még szignifikánsabb volt ($p < 0,001$) a vektor kontrollal (LXSN) transzdukált sejtekhez viszonyítva. Mind az E6, mind az E7 szignifikánsan csökkentette az IVL expresszióját a differenciáltatott sejtekben is ($p < 0,001$). A legerősebb hatást itt is a két onkogént együtt expresszáló sejtekben tapasztaltuk ($p < 0,001$).



6. ábra: A HPV E6 és E7 onkoproteinek hatása a celluláris TERT (A), IVL (B) és TGM1 (C) expressziójára a HFK sejtekben. Az RQ értékeket a valós idejű PCR elemzése során nyertük. A kontroll vektorral transzdukált (LXS) proliferáló sejtek RQ értékét tekintettük 1-nek, és a többi értéket ehhez viszonyítottuk. Az ábrán reprezentatív grafikonok láthatók a standard deviációs hibásávokkal (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$, az LXS kontrollhoz viszonyítva mind a proliferáló, mind a differenciálódó sejtekben).

A nem differenciáltatott sejtekben a HPV 16 E6 és E7 onkogéneknek együtt csak mérsékelt gátló hatása volt az endogén TGM1 mRNS szintjére ($p < 0,05$), míg a differenciáltatott sejtekben a HPV onkogéneknek nem volt szignifikáns hatásuk (6C. ábra). Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a HPV onkogéneknek az IVL expresszióra gyakorolt hatásuk direkter ill. specifikusabb, mint a TGM1-re gyakorolt hatásuk.



7. ábra: A HPV E6 és E7 onkoproteinek hatása az IVL fehérjeszintjére HFK sejtekben. **(A)** Az ábra reprezentatív röntgenfilmeket mutat. **(B)** Az IVL fehérje mennyiségét kvantitatívan denzitometriával elemeztük és az aktin fehérje szintjére normalizáltuk. Az LXSN-nel transzdukált sejtek normalizált értékét tekintettük 1-nek és ehhez viszonyítottuk a többi. Az értékek 4 független kísérletből származnak, a hibásávok a SEM (standard error of mean) értékeket mutatják (* $p < 0,05$; **** $p < 0,001$, az LXSN kontrollhoz viszonyítva mind a proliferáló, mind a differenciálódó sejtekben).

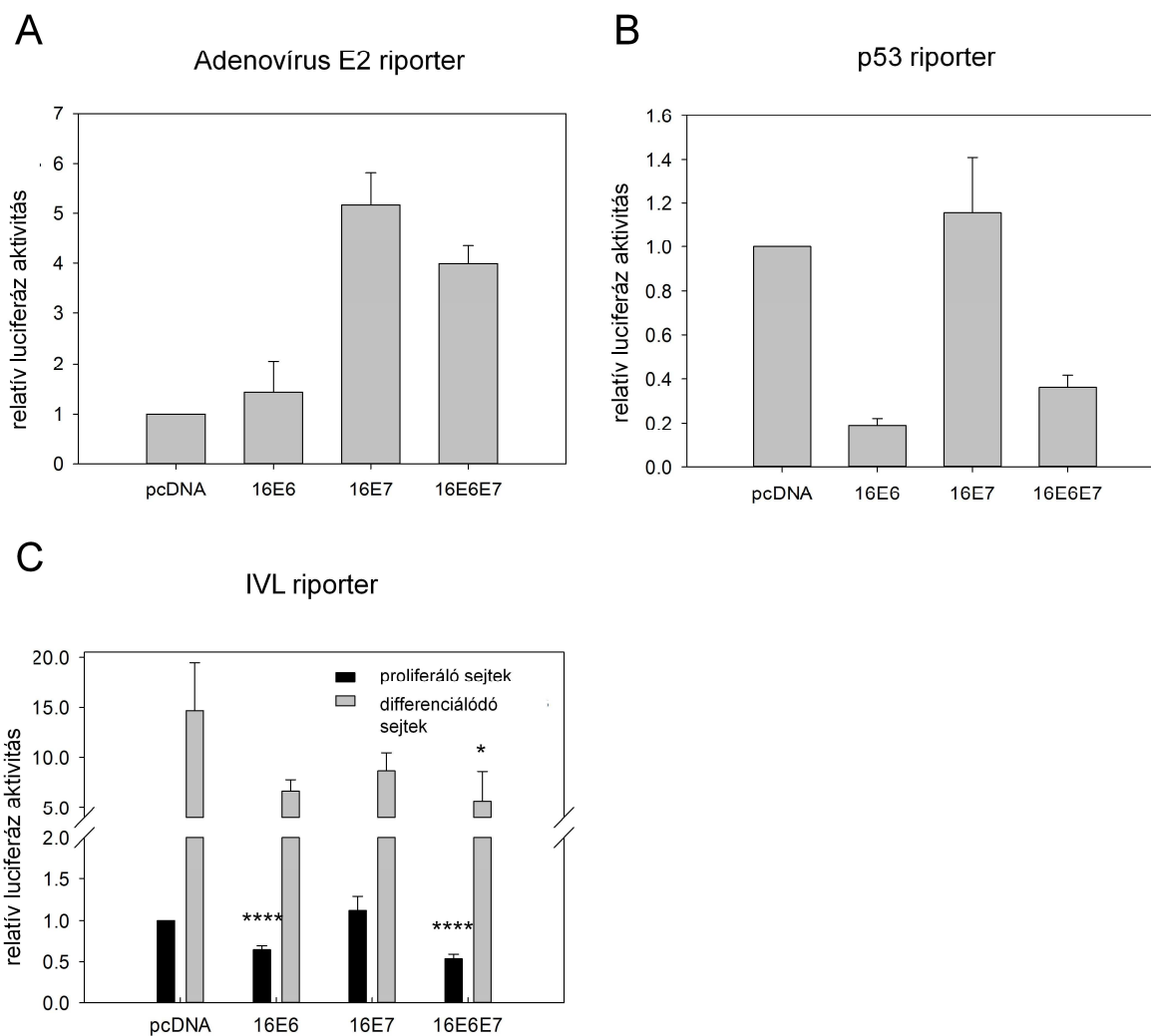
Azért, hogy tanulmányozzuk a HPV onkogének hatását az IVL proteinre, Western blot analízist végeztünk a transzdukált sejtvonalakon (7. ábra). A szérummal és kalciummal indukált differenciáltatás megnövelte az IVL protein szintjét, a nem differenciáltatott sejtekhez képest. A proliferáló sejtekben a HPV E6-nak és E7-nek külön-külön csak mérsékelt hatása volt az endogén IVL protein szintjére, míg a két onkogén együtt erősen csökkentette az IVL protein szintjét a vektorral transzdukált (LXSN) sejtekhez képest ($p < 0,001$). Ez a hatása a HPV 16 E6-nak és E7-nek az IVL protein szintjére kisebb, de még mindig szignifikáns volt a differenciáltatott sejtekben is ($p = 0,032$).

A HPV 16 onkoproteinek hatása a humán involukrin promóter transzkripció aktivitására

A következőkben szeretnénk volna meghatározni, hogy a HPV onkogének IVL expressziójára kifejtett hatása az IVL promóter transzkripció gátlásán keresztül történik-e. Ezért alacsony passzázsú humán keratinocitákat tranziensen transzfektáltunk olyan luciferáz riporter vektorral, amely az IVL szabályozó régióját tartalmazza, valamint pcDNA-alapú vektorokkal, amik a HPV 16 E6 és/vagy E7 onkogéneket expresszálják. A funkcionálisan aktív HPV 16 onkogének expresszióját a transzfektált HFK sejtekben olyan kotranszfekciós kísérletekben erősítettük meg, ahol a riporter vektorok a p53 protein kötőhelyeit (p53-Luc), illetve az adenovírus E2 promóterét (pAdE2-Luc) tartalmazzák, utóbbi az E2F transzkripció faktor kötőhelyeit hordozza. A HPV 16 E6 csökkentette a p53 riporter plazmid aktivitását (8B. ábra), míg az E7 az adenovírus E2 promóter aktivitását növelte (8A. ábra). Ez azt igazolja, hogy kísérleti rendszerünkben a megfelelő vektorok valóban expresszálják a HPV 16 onkogéneket és ezek funkcionálisan aktívak (Cheng *et al.*, 1995; Mantovani & Banks, 2001).

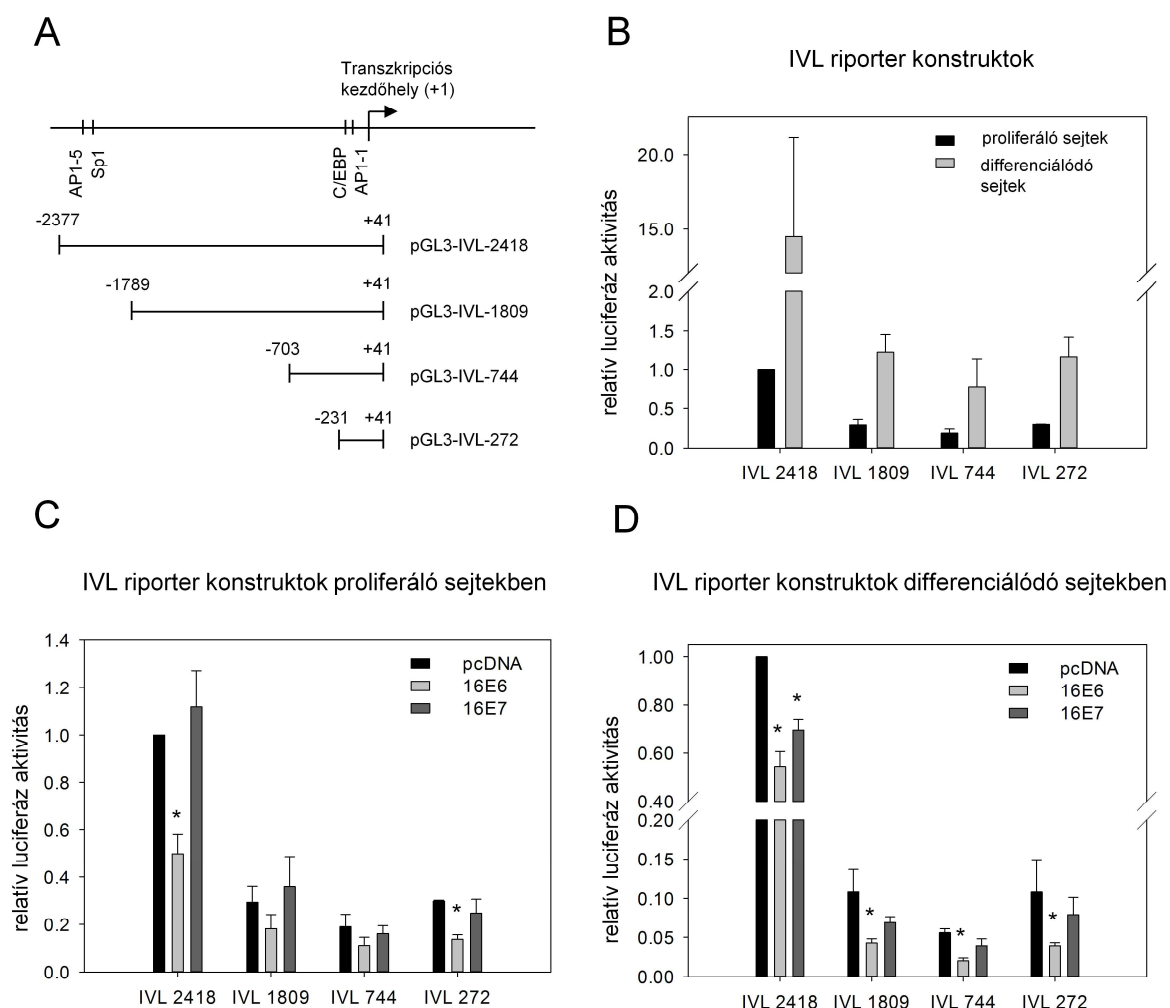
Proliferáló HFK sejtekben a HPV 16 E6 szignifikánsan csökkentette az IVL promóter teljes hosszúságú szakaszát tartalmazó plazmid (pGL3-IVL) aktivitását ($p < 0,001$). Ezzel szemben az E7-nek nem volt szignifikáns hatása ($p = 0,485$) az IVL riporter vektorra proliferáló sejtekben (8C. ábra). A sejtek egy részét 24 órán keresztül szérum- és magas kalciumtartalmú DMEM tápfolyadékban differenciáltattuk, ami a pGL3-IVL plazmid aktivitását az üres vektor jelenlétében megnövelte. A differenciáltatott keratinocitákban az E6 ($p = 0,124$) és az E7 ($p = 0,253$) is csak kisebb, nem szignifikáns mértékben csökkentette az IVL promóter aktivitását, míg a két onkogén együtt szignifikáns aktivitás-csökkenést okozott az IVL promóteren ($p = 0,014$). Ebből arra következtethetünk, hogy a HPV 16 E6 onkoprotein az

endogén IVL expresszió csökkenését részben az IVL promóter aktivitásának gátlásán keresztül fejtí ki.



8. ábra: A HPV onkoproteinek hatása az adenovírus E2 (A), a p53 (B) és az IVL (C) riporter plazmidok transzkripciós aktivitására. A luciferáz aktivitás értékeit azoknak a sejteknek az aktivitásához viszonyítottuk, amelyek a megfelelő riporter plazmid mellett az üres (pcDNA) expressziós vektorokkal voltak transzfektálva. Az adatok legalább 3 független kísérletből származnak, a hibasávok a SEM értékeket mutatják (* $p < 0,05$; **** $p < 0,001$, a pcDNA kontrollhoz viszonyítva, mind a proliferáló, mind a differentiálódó sejtekben).

A HPV 16 onkoproteinek hatásának lokalizálása a humán involukrin promóteren



9. ábra: A HPV 16 onkogének hatásának lokalizálása az IVL promóteren. (A) A humán IVL promóter különböző hosszúságú szakaszait tartalmazó konstruktok sematikus ábrázolása. A nukleotid pozíciókat a transzkripció kezdőhelyéhez viszonyítva ábrázoltuk. Néhány kiválasztott transzkripció faktor kötőhely felismerő helyet tüntettünk fel a képen (C/EBP-CCAAT enhancer binding protein, AP-1-aktivator protein, Sp1-specificity protein). (B) A differenciáltatás hatása az IVL promóter különböző szakaszait tartalmazó plazmidok transzkripció aktivitására. A HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatása az IVL konstruktok transzkripció aktivitására proliferáló (C) és differenciálódó (D) HFK sejtekben. A luciferáz aktivitásokat az IVL-2418 plazmiddal és az üres (pcDNA) expressziós vektorral transzfektált sejtek aktivitásához viszonyítottuk. Az adatok 3 független kísérletből származnak, és a hibasávok a SEM értékeket mutatják (* $p < 0,05$, minden IVL riporter konstruktt esetén, a pcDNA kontrollhoz viszonyítva).

Ahhoz, hogy lokalizálni tudjuk a HPV onkoproteinek hatását az involukrin promóteren, a szabályozó régió különböző hosszúságú szakaszait klónoztuk luciferáz riporter plazmidokba. Az IVL promóter eltérő hosszúságú fragmentjei a transzkripció starthelyétől számított +41 nukleotidig tartanak (9A. ábra). Először ellenőriztük, hogy a konstruktok tranziens transzfekciós kísérletekben válaszolnak-e a differenciációs stimulusra. Ahogy a 9B. ábra mutatja, mindegyik riporter konstruktt aktivitása megnőtt a differenciáltatás hatására. A differenciálódás hatása a leghosszabb konstruktra (IVL-2418) volt a legnagyobb hatással (15-szörös), és a rövidebb konstruktoknál is kb. 4-szeres volt.

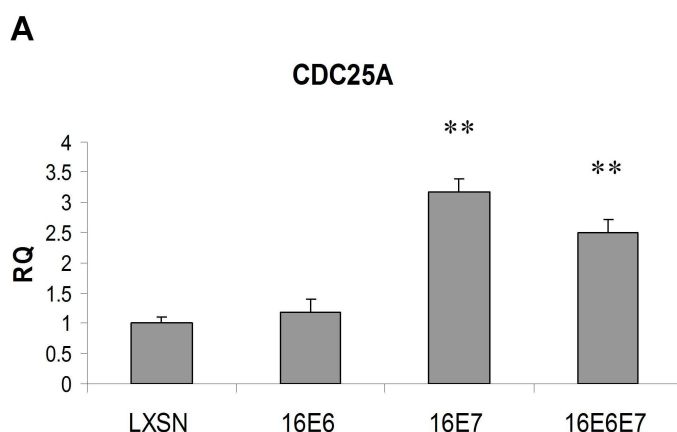
Ezután kotranszfekciós kísérletekben vizsgáltuk a HPV 16 E6 és E7 onkogének hatását az IVL konstruktok transzkripció aktivitására. Proliferáló HFK sejtekben a HPV 16 E6 az összes konstruktt aktivitását csökkentette. A vektor kontrollal összehasonlítva, az E6 a leghosszabb (IVL-2418, $p=0,026$), valamint a legrövidebb (IVL-272, $p=0,011$) konstruktt aktivitását is csökkentette (9C. ábra). A különböző hosszúságú IVL plazmidok a differenciáltatott sejtekben is szignifikáns aktivitás-csökkenést mutattak az E6 onkogén jelenlétében. (9D. ábra). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a HPV 16 E6 a humán IVL promóter a proximális régióján fejt ki hatását (a transzkripció kezdőhelyétől számított -231-től a +41-es nukleotidig).

A HPV 16 E7-nek nem volt szignifikáns hatása az IVL promóterre proliferáló sejtekben (9C. ábra). A differenciáltatott sejtekben csak a leghosszabb konstruktra (IVL-2418) volt mérsékelt, de szignifikáns ($p=0,020$) gátló hatással, míg a rövidebb IVL riporter konstruktokra nem.

Humán papillomavírus 16 onkoproteinek hatása a keratinociták differenciálódásában résztvevő egyéb gének expressziójára

A HPV 16 onkogénnel transzdukált HFK sejtek teljes génexpressziós analízise

Azért, hogy vizsgálni tudjuk a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatását a primer keratinociták teljes génexpressziós mintázatára, microarray elemzést végeztünk a HPV 16 onkogénnel expresszáló retrovírus vektorokkal transzdukált HFK sejteken (HFK-LXSN, HFK-16E6, HFK-16E7, HFK-16E6E7). Munkám első felében a funkcionálisan aktív E6 és E7 jelenlétét már bizonyítottuk a transzdukált sejtvonalakban, a p53 fehérjére, ill. a TERT mRNS szintjére gyakorolt hatásukkal (6. és 7. ábra). A kutatás második részében az E7 egy másik ismert celluláris célpontjának, a CDC25A-nak az expresszióját is vizsgáltuk valós idejű PCR segítségével. Másokhoz hasonlóan a mi rendszerünkben is az E7 növelte a CDC25A expressziós szintjét (10. ábra) (Katich *et al.*, 2001).



10. ábra: A HPV 16 E6 és E7 onkogének hatása a CDC25A expressziójára humán keratinocitákban. Az RQ értékeket a valós idejű PCR elemzése során nyertük. A kontroll vektorral transzdukált (LXSN) proliferáló sejtek RQ értékét tekintettük 1-nek, és a többi értéket ehhez viszonyítottuk. Az ábrán reprezentatív grafikonok láthatók a standard deviációs hibasávokkal (** $p < 0.01$).

Microarray elemzéssel határoztuk meg a HPV 16 E6, E7 ill. E6/E7 vektorokkal transzdukált sejtek teljes expressziós mintázatát a vektor kontrollal (LXSN) transzdukált sejtekhez képest. A kísérlet során alacsony passzázsú sejteket használtunk, 3 biológiai

párhuzamosban. A 4 sejtvonal expressziós profilja közötti különbséget egytényezős varianciaanalízissel (ANOVA) és hierarchikus klaszter analízissel elemeztük. A microarray-t és az adatok elemzését Dr. Pólska Szilárd (UD-GenoMed Kft., Debrecen) végezte, az eredmények értékelését és értelmezését pedig a mi munkacsoportunk. Az ANOVA elemzés által kapott eredményeket a második közlemény (Gyongyosi *et al.*, 2014) elektronikus változatának kiegészítő anyagában, a http://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1007%2Fs00705-014-2305-y/MediaObjects/705_2014_2305_MOESM2_ESM.pdf oldalon található meg. Azoknak a géneknek a listáját, amik az elemzés során legalább 1,5-szörös FC (fold change) változást mutattak szintén a második közlemény elektronikus változatában, a http://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1007%2Fs00705-014-2305-y/MediaObjects/705_2014_2305_MOESM1_ESM.pdf oldalon érhető el. Az IPA (Ingenuity Pathway Analysis) elemzés megmutatta, hogy ezeknek a géneknek a nagy része a sejtciklusban, a sejthalálban és a proliferációban vesz részt (3. táblázat). Összhangban más, hasonló módszerekkel dolgozó kutatócsoportokkal (Duffy *et al.*, 2003; Karstensen *et al.*, 2006; Kravchenko-Balasha *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2008), találtunk számos olyan, a keratinocita differenciálódáshoz köthető gént (többek között IVL, SPRR-ek, S100A proteinek, KRT-ok) amelynek az expressziója szignifikánsan csökkent a HPV onkoproteinek hatására (3. és 4. táblázat).

3. táblázat: A HPV 16 onkoproteinnel transzdukált sejtekben különbözőképpen expresszálódó gének funkcionális analízise

Funkció	Az adott funkcióhoz kapcsolódó gének száma	A keratinocita differenciációhoz kapcsolódó gének száma	p érték
Sejtciklus	142	2	2.22E-26 - 2.30E-03
Sejt összeszerelődés és szerveződés	104	2	3.92E-22 - 2.07E-03
DNS replikáció, rekombináció és javítás	130	0	3.92E-22 - 2.33E-03
Proliferáció	174	7	1.49E-13 - 2.31E-03
Sejthalál és túlélés	176	5	1.18E-12 - 2.02E-03

A különbözőképpen expresszálódó gének funkcionális jellemzését IPA (Ingenuity Pathway Analysis) szoftverrel végeztük. A legnagyobb mértékben változó 5 funkció látható a táblázatban.

4. táblázat: A microarray elemzés során szignifikáns expresszióváltozást mutató, a keratinocita differenciálódásban résztvevő gének FC (fold change) értékei

Gén jele	Gén neve	16E6 ^a	16E7 ^a	16E6E7 ^a	p érték
DSC1	dezmokollin 1	-1.19	-4.08	-2.64	0.014
DSG1	dezmoglein 1	1.32	-2.44	1.21	0.021
FLG	filaggrin	1.19	-2.39	-1.56	0.040
IVL	involukrin	-1.60	-1.70	-2.53	0.004
KRT1	keratin 1	1.04	-2.93	-1.50	0.035
KRT10	keratin 10	1.26	-3.87	1.01	0.009
KRT13	keratin 13	-1.25	-2.29	-1.70	0.031
KRT16	keratin 16	-1.05	-1.74	1.06	0.044
KRT19	keratin 19	-1.56	1.26	-1.90	0.012
LCE2B	late cornified envelope 2B	-1.01	-1.75	-1.21	0.011
S100A8	S100 kalciumkötő fehérje A8	-1.17	-1.26	-2.11	0.030
S100A9	S100 kalciumkötő fehérje A9	-1.37	-1.43	-3.31	0.005
SPRR1A	small prolin-rich protein 1A	-1.15	-1.55	-1.97	0.021
SPRR1B	small prolin-rich protein 1B	-1.11	-1.25	-1.51	0.039
SPRR2A	small prolin-rich protein 2A	-1.87	-1.39	-2.81	0.031
SPRR2B	small prolin-rich protein 2B				
SPRR3	small prolin-rich protein 3	-1.97	-4.06	-3.79	0.014

^a FC értékeket a vektor kontrollal (LXSN) transzdukált sejtekhez viszonyítottuk.

HPV 16 onkoproteinek hatása a keratinociták differenciálódásában résztvevő gének mRNS szintjére

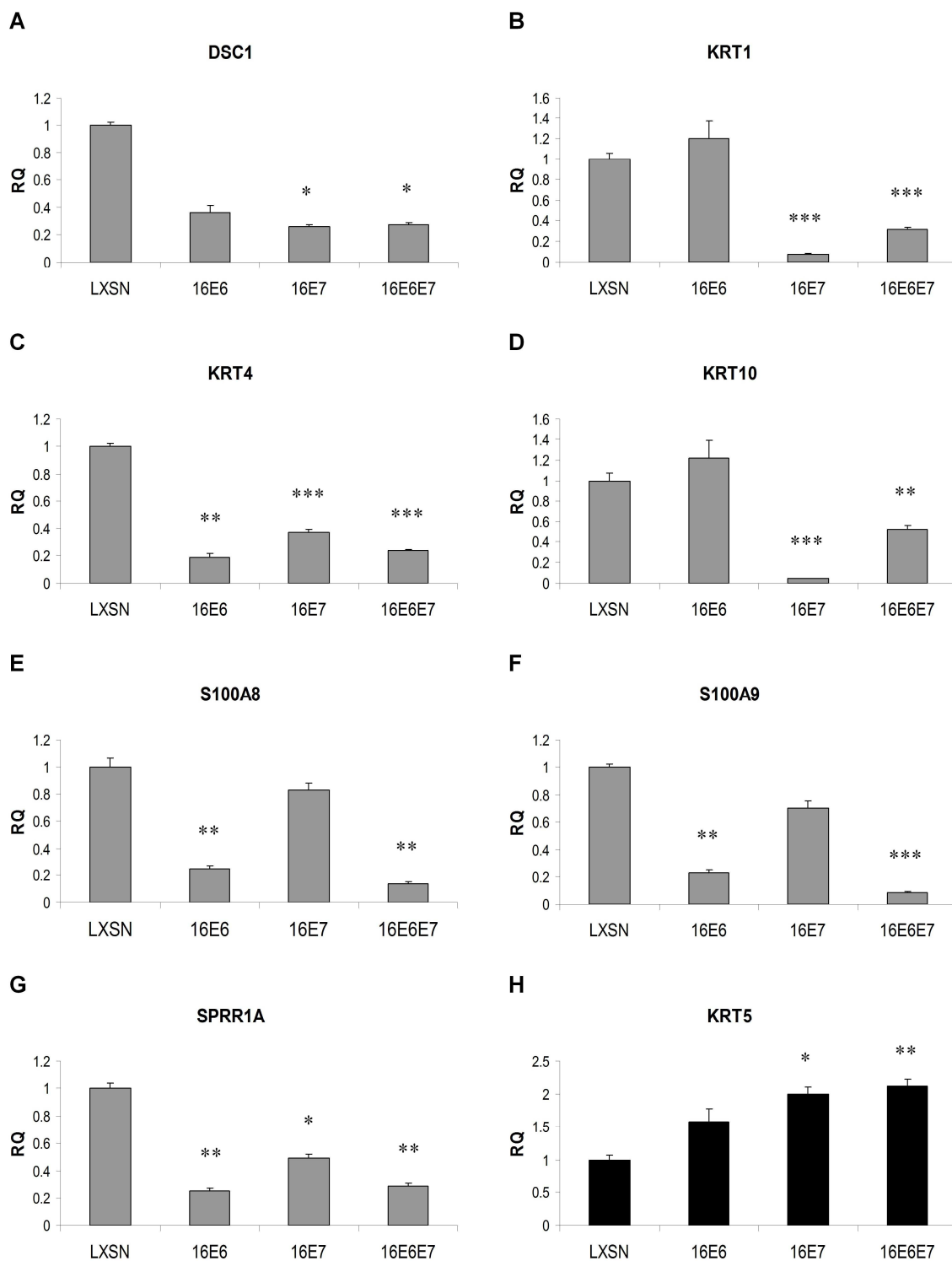
A microarray elemzésből nyert eredményeinket valós idejű RT-PCR-rel erősítettük meg a differenciálódáshoz köthető gének egy részén. Ismerve azt, hogy a valós idejű PCR-nek nagyobb az érzékenysége és jobb a reprodukálhatósága, a valós idejű PCR analízishez kiválasztottunk néhány olyan gént is, amely a microarray elemzés során nem mutatott szignifikáns különbséget a HPV onkoproteinek hatására, de ismert, hogy szerepet játszik a keratinociták differenciálódásában (CNFN, KRT4, LOR, S100A10 és S100A12). Ahogy azt az 5. táblázat mutatja, a legtöbb vizsgált gén expressziója szignifikánsan csökkent a HPV 16 E6 és E7 onkogének jelenlétében. Találtunk néhány olyan gént, amelynek az mRNS szintje szignifikáns csökkenést mutatott a valós idejű PCR során, míg a microarray elemzésben nem (CNFN, LOR, S100A10, S100A12).

5. táblázat: A keratinocita differenciálódásban résztvevő gének RQ (relatív quantification) értékei

Gén jele	Gén neve	LXSN	16E6E7 ^a
CNFN	kornifelin	1 ± 0.18	0.46 ± 0.03
DSC1	dezmokollin 1	1 ± 0.15	0.17 ± 0.01
DSG1	dezmoglein 1	1 ± 0.18	0.63 ± 0.03
IVL	involukrin	1 ± 0.21	0.13 ± 0.02
KRT1	keratin 1	1 ± 0.15	0.23 ± 0.01
KRT4	keratin 4	1 ± 0.15	0.09 ± 0.01
KRT5	keratin 5	1 ± 0.17	1.85 ± 0.18
KRT10	keratin 10	1 ± 0.10	0.72 ± 0.04
LOR	lorikrin	1 ± 0.10	0.80 ± 0.03
NOTCH1	notch homolog 1	1 ± 0.13	0.50 ± 0.03
SERPINB2	plazminogén aktivátor inhibitor-2	1 ± 0.18	0.49 ± 0.02
S100A8	S100 kalciumkötő fehérje A8	1 ± 0.12	0.13 ± 0.01
S100A9	S100 kalciumkötő fehérje A9	1 ± 0.13	0.11 ± 0.01
S100A10	S100 kalciumkötő fehérje A10	1 ± 0.12	0.79 ± 0.07
S100A12	S100 kalciumkötő fehérje A12	1 ± 0.12	0.10 ± 0.01
SPRR1A	small prolin-rich protein 1A	1 ± 0.13	0.28 ± 0.01
SPRR1B	small prolin-rich protein 1B	1 ± 0.10	0.37 ± 0.03

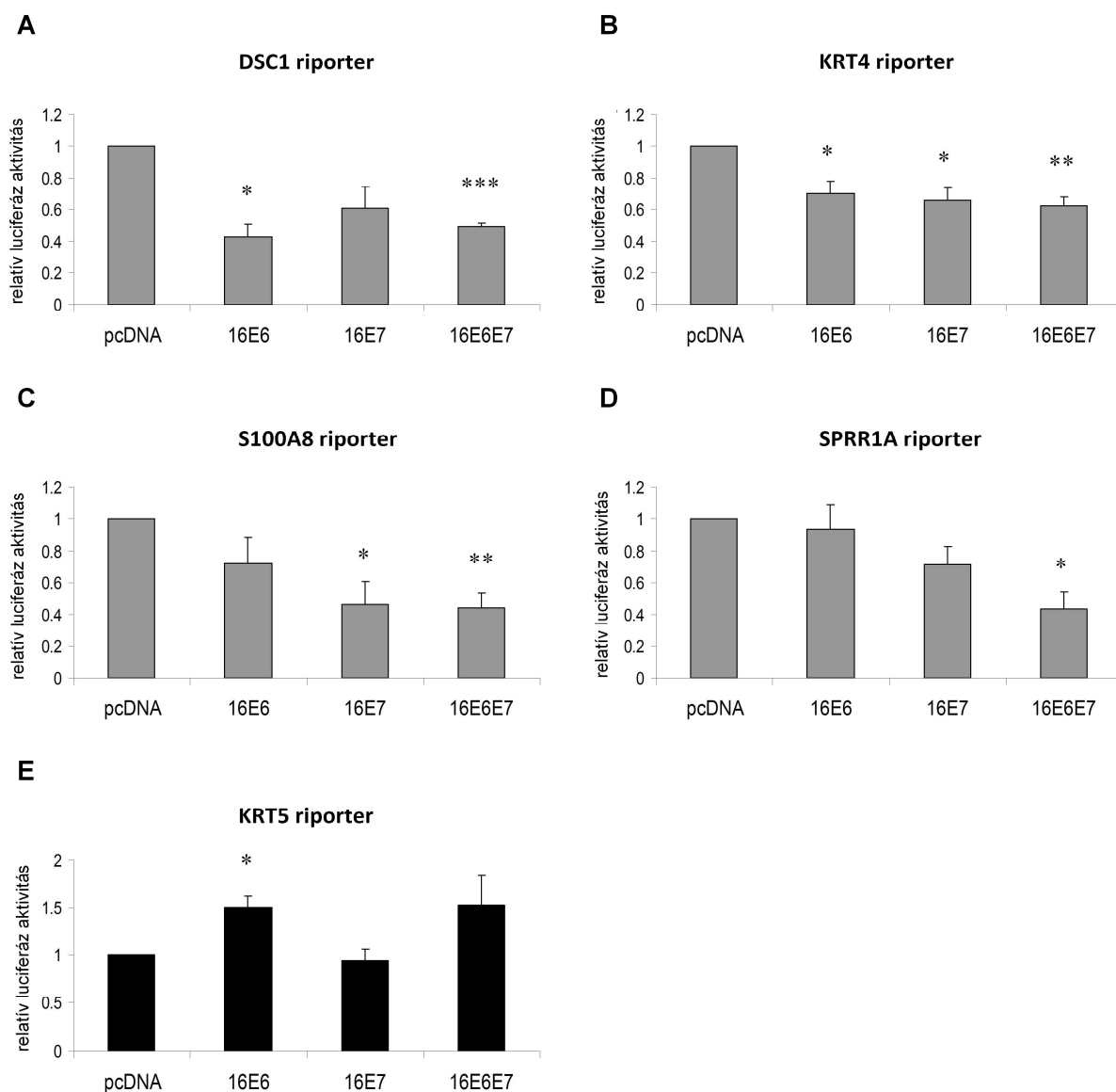
^a RQ értékeket (standard deviációval) kvantitatív valós idejű PCR-rel nyertük és a vektor kontrollal (LXSN) transzdukált sejtekhez viszonyítottuk

Azok közül a gének közül, amelyek eltérést mutattak a HPV 16 onkoproteinek jelenlétében a microarray és/vagy a valós idejű PCR során, kiválasztottunk 7-et, és ezeket részletesebben is elemeztük valós idejű PCR kísérletekben, külön-külön is vizsgálva az E6 és E7 onkogének hatásait. Összehasonlításként választottunk egy bazális keratint is, a keratin 5-öt (KRT5), amelyről tudjuk, hogy expressziója nem változik a differenciálódás során. Ebben az esetben azt tapasztaltuk, hogy a KRT5 mRNS szintje valóban nem csökkent az E6 ill. az E7 hatására. Ezzel szemben, a keratinocita differenciálódásban résztvevő gének (DSC1, KRT1, KRT4, KRT10, S100A8, S100A9 és SPRR1A) szignifikánsan csökkent expressziót mutattak azokban a sejtekben, ahol mindkét HPV onkoprotein együtt volt jelen (11. ábra). Munkám első felében a humán involukrin gén esetében is ezt tapasztaltuk génexpressziós kísérleteinkben (Gyongyosi *et al.*, 2012). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a HPV E6 és E7 onkoproteineknek valamilyen általános hatása van a többretegű hám sejtejének differenciálódásában szerepet játszó gének szabályozásában.



11. ábra: A HPV 16 E6 és E7 onkogének hatása a DSC1 (A), a KRT1 (B), a KRT4 (C), a KRT10 (D), a S100A8 (E), a S100A9 (F), a SPRR1A (G) és a KRT5 (H) expressziójára humán keratinocitákban. Az RQ értékeket a valós idejű PCR elemzése során nyertük. A kontroll vektorral transzdukált (LXSN) proliferáló sejtek RQ értékét tekintettük 1-nek, és a többi értéket ehhez viszonyítottuk. Az ábrán reprezentatív grafikonok láthatók a standard deviációs hibasávokkal (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

HPV 16 onkoproteinek hatása a keratinociták differenciálódásában résztvevő gének promóter aktivitására

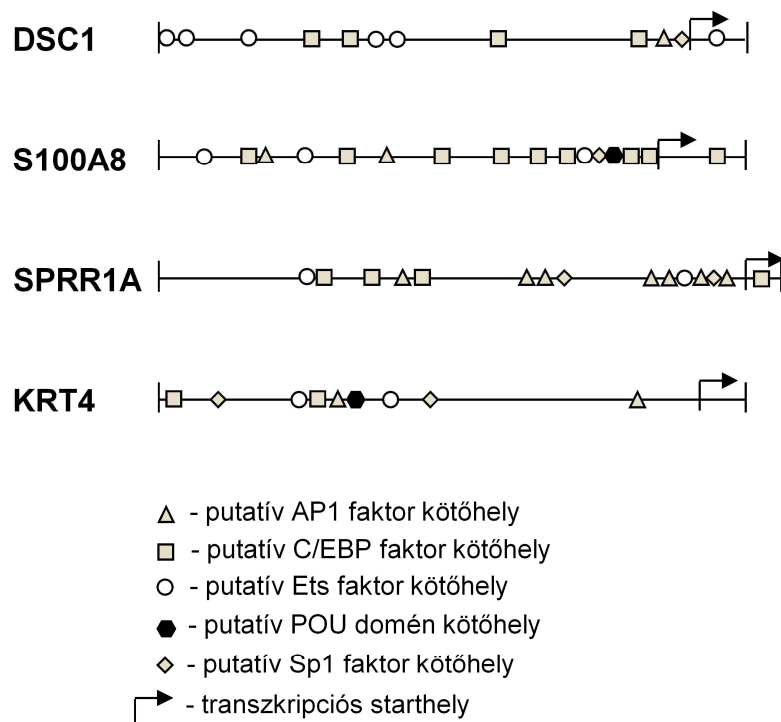


12. ábra: A HPV onkoproteinek hatása a DSC1 (A), a KRT4 (B), a S100A8 (C), a SPRR1A (D) és a KRT5 (E) riporter konstruktok transzkripció aktivitására. A luciferáz aktivitás értékeit azoknak a sejteknek az aktivitásához viszonyítottuk, amelyek a megfelelő riporter plazmid mellett az üres (pcDNA) expressziós vektorokkal voltak transzfektálva. Az adatok legalább 3 független kísérletből származnak, a hibásávok a SEM értékeket mutatják (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

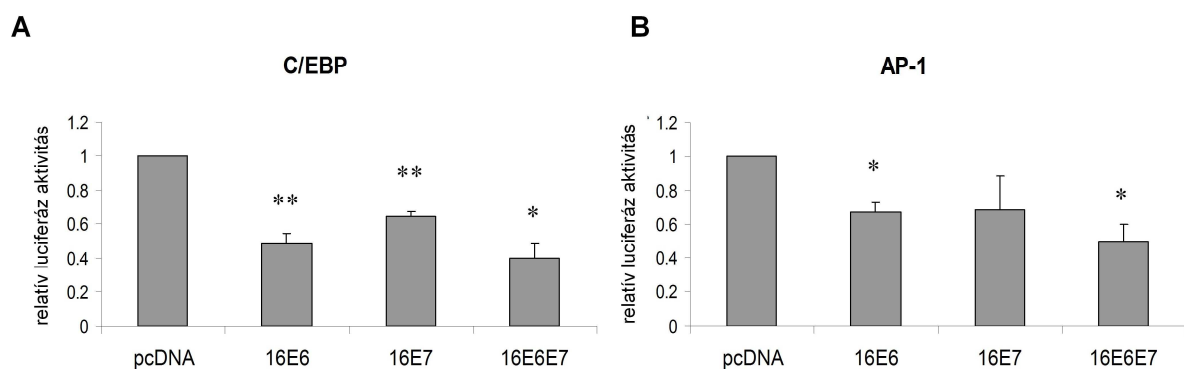
Luciferáz riporter rendszer segítségével vizsgáltuk a HPV onkoproteinek hatását olyan, a differenciálódásban résztvevő gének transzkripciók aktivitására, amelyek expressziós változásait valós idejű PCR-rel is vizsgáltuk. A kísérletek során primer humán keratinocitákat transzfektáltunk a különböző, differenciálódásban fontos gének (DSC1, KRT4, S100A8 és SPRR1A) promótereit tartalmazó riporter vektorokkal és a HPV 16 E6 és/vagy E7 onkogéneket expresszáló vektorokkal (12. ábra). Mind a 4 vizsgált gén promóterének aktivitása csökkent a vektor kontrollhoz (pcDNA) képest azokban a sejtekben, amelyekben a két onkoprotein együtt (16E6E7) volt jelen. Ahogy azt vártuk az expressziós kísérleteink és az irodalom alapján, a bazális keratin 5 promóterének aktivitását nem csökkentették a HPV onkogének (12E. ábra). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a HPV 16 onkoproteinek a hatásukat legalább részben a keratinocita differenciálódásban szerepet játszó gének transzkripciók gátlásán keresztül fejtik ki.

HPV 16 onkoproteinek hatása az AP-1 és C/EBP transzkripciók faktorok aktivitására

Feltételeztük, hogy a HPV 16 onkoproteinek a gátló hatásukat a keratinocita differenciálódásban résztvevő génekre esetleg néhány transzkripciók faktor aktivitásának módosításán keresztül fejtik ki. Ennek érdekében két adatbázis (TFSEARCH-www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html és The JASPAR-jaspar.genereg.net; threshold: 80.0.) segítségével elemeztük a vizsgált promóterek szekvenciáit. Ahogy az a 13. ábrán látható, a promóterek mindegyike tartalmaz lehetséges kötőhelyeket az AP-1 és a C/EBP transzkripciók faktor család tagjainak. Ezért tranziens transzfekciós kísérletekben vizsgáltuk, hogy a HPV onkoproteineknek van-e valamilyen hatása ezeknek a faktoroknak az aktivitására. Ehhez a HPV 16 onkogéneket expresszáló vektorok mellett, olyan luciferáz riporter plazmidokkal transzfektáltunk HFK sejteket, amelyek az AP-1, ill. a C/EBP faktorok kötőhelyeinek több kópiáját tartalmazták. Azt tapasztaltuk, hogy a két onkoprotein együtt csökkentette mind az AP-1, mind a C/EBP faktorok aktivitását (14. ábra). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek a keratinocita differenciálódásban résztvevő gének promóterét néhány olyan transzkripciók faktor aktivitásának gátlásával szabályozzák, amik fontos szabályozói ezeknek a promótereknek, mint például az AP-1 és a C/EBP faktor családok tagjai.



13. ábra: A DSC1, S100A8, SPRR1A and KRT4 *Renilla* luciferáz riporter plazmidok (SwitchGear) sematikus ábrázolása. Néhány kiválasztott transzkripció faktor kötőhely felismerő helyet tüntettünk fel az ábrán (TFSEARCH-www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html és The JASPAR-jaspar.genereg.net adatbázisok; threshold: 80.0.).



14. ábra: A HPV onkoproteinek hatása a C/EBP (A) és az AP-1 (B) transzkripció faktorok aktivitására. A luciferáz aktivitás értékeit azoknak a sejteknek az aktivitásához viszonyítottuk, amelyek a megfelelő riporter plazmid mellett az üres (pcDNA) expressziós vektorokkal voltak transzfektálva. Az adatok legalább 3 független kísérletből származnak, a hibasávok a SEM értékeket mutatják (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

MEGBESZÉLÉS

Munkám során a HPV természetes gazdasejtjeiben, a humán keratinocitákban vizsgáltam a differenciálódási folyamatban szerepet játszó gének expressziós változását a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinjeinek hatására. Kutatásunk első felében (Gyongyosi *et al.*, 2012) az IVL és a TGM1 gének, mint fontos keratinocita differenciálódási markerek expressziós változásait vizsgáltuk a HPV onkoproteinek jelenlétében. Azt tapasztaltuk, hogy a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek szignifikánsan csökkentették az endogén IVL mRNS és fehérje szintjét humán keratinocitákban. Ezek az eredmények összhangban vannak korábbi tanulmányokkal, amik cervix carcinomából származó mintákon végeztek microarray analízist. Az IVL és néhány más, differenciálódás által szabályozott gén (keratinok és small prolin rich proteinek) expressziója a méhnyakrákos mintákban csökkent a normál cervikális mintákkal összehasonlítva (Santin *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2006). Ennek megfelelően azokban a közleményekben, ahol retrovírus vektorokkal transzdukált humán keratinocitákat használtak a cervikális karcinogenezis *in vitro* modellezésére, szintén azt találták, hogy a HPV onkogének jelenlétében az IVL és más differenciálódásban résztvevő gének expressziója lecsökkent (Duffy *et al.*, 2003; Kravchenko-Balasha *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2008). Azonban a microarray analízis nem nyújt információt a génexpresszió mechanizmusáról. Ezért elsődleges célunk az volt, hogy a génexpressziós eredményeket a sokkal megbízhatóbb valós idejű RT-PCR-rel nyerjük néhány keratinocita differenciálódásban fontos gén esetén és vizsgáljuk a génexpressziós eltéréseket okozó molekuláris mechanizmusokat luciferáz riporter rendszer segítségével. Fontosnak tartottuk a HPV onkogének hatását a differenciálódáshoz köthető gének expressziójára proliferáló és differenciálódó keratinocitákban is vizsgálni, ugyanis a differenciálódó sejtek talán még jobban modellezzik azt a celluláris környezetet, amit a HPV-k a produktív életciklusuk során igényelnek.

Ahogy azt vártuk, a HFK sejtek differenciálódásának indukálása szérummal és a megemelt kalcium szinttel jelentősen megnövelte az endogén IVL és a TGM1 mRNS szintjét (6. ábra). A HPV 16 E6 és E7 onkogének együtt szignifikánsan csökkentették az IVL mRNS szintjét, de érdekes módon csak mérsékelt hatásuk volt a TGM1 mRNS szintjére. Ez arra utal, hogy a HPV onkoproteineknek különböző hatása van a differenciálódásban fontos különböző gének expressziójára. Úgy tűnik, hogy proliferáló sejtekben az E6 és az E7 onkogéneknek szinergista szabályozó hatása van az IVL mRNS szintjére. Differenciálódó sejtekben, ahol az

IVL expressziója megemelkedett, a HPV onkogének okozta IVL mRNS csökkenés kisebb volt, de még mindig szignifikáns. A Western blot analízis is azt mutatta, hogy a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek együtt csökkentik az IVL fehérje szintjét is, mind a proliferáló, mind a differenciálódó sejtekben (7. ábra). Egy korábbi tanulmányban már megállapították, hogy a HPV 6, ill. HPV 16 E7 expressziója csökkenti az IVL protein szintjét humán keratinocitákban (Zhang *et al.*, 2006). Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek az IVL alap és differenciáció-indukálta expresszióját is csökkentik HFK sejtekben.

A keratinociták differenciálódásában résztvevő gének (többek között az IVL) expressziója a transzkripció szintjén szabályozódik (Eckert *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 1998). Ezért vizsgáltuk tovább a HPV 16 onkoproteinek hatását az IVL promóterének transzkripciós aktivitására. Ehhez HFK sejteket transzfektáltunk HPV 16 E6 és/vagy E7 onkogéneket expresszáló vektorokkal és olyan luciferáz riporter plazmiddal, ami a humán IVL gén teljes szabályozó régióját (URR-upstream reguláló régió) tartalmazza. A transzfektált sejtek egy részét ezt követően 24 óráig differenciáltattuk. Korábbi eredményekhez hasonlóan (Eckert *et al.*, 2004), a differenciáltatás szignifikánsan megnövelte az IVL promóter aktivitását. Proliferáló sejtekben csak a HPV 16 E6 csökkentette az IVL promóter transzkripciós aktivitását, az E7 nem. Differenciálódó HFK sejtekben pedig a két HPV onkoprotein együtt csökkentette az IVL szabályozó régiójának aktivitását (8. ábra). Összefoglalva ezek az eredmények azt mutatják, hogy az endogén IVL mRNS és protein szintjének csökkentése a HPV 16 E6 által az IVL promóter gátlásán keresztül történik. Azonban nem lehet kizárni azt sem, hogy a HPV 16 E6 az IVL vagy más differenciálódáshoz köthető gének expresszióját más mechanizmusokkal is szabályozza. Sherman és munkatársai leírták, hogy a szérum és kalcium indukálta keratinocita differenciálódást a HPV 16 E6 gátolja, ami nem hozható egyértelmű összefüggésbe a p53 inaktiválásával (Sherman *et al.*, 2002). Ugyanakkor a HPV 16 E6 a Notch1 expresszióját is csökkenti valószínűleg a p53 degradációjával. A Notch1-nek a keratinocita differenciáció regulációjában tulajdonítanak fontos szerepet (Yugawa *et al.*, 2007), expressziójának változását a két HPV 16 onkogén jelenlétében valós idejű PCR kísérleteinkben mi is igazoltuk (5. táblázat).

Azért, hogy lokalizálni tudjuk a HPV onkogének hatását az IVL promóteren, olyan luciferáz riporter konstruktokat használtunk, amelyek a szabályozó régió különböző hosszúságú szakaszait tartalmazzák. Az IVL gén URR-je tartalmaz egy disztális (DRR, a transzkripciós starthelytől számított -2473/-1953 nukleotidok között) és egy proximális (PRR,

a transzkripció starthelytől számított -2473/-1953 nukleotidok között) részt (Eckert *et al.*, 2004). Az IVL szabályozó régiója 5 AP-1 kötőhelyet tartalmaz. A DRR (AP-1-5) és a PRR (AP-1-1) részekben elhelyezkedő két elem esszenciális a promóter aktivitásához (Banks *et al.*, 1998; Crish *et al.*, 2006; Welter *et al.*, 1995). Az AP-1 faktorok (c-fos, fosB, Fra-1, Fra-2, c-jun, junB és junD) a többretegű hám különböző rétegeiben expresszálódnak, expressziós mintázatuk a differenciálódásban résztvevő gének kifejeződését szabályozza (Eckert *et al.*, 1997; Mehic *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 1998). A domináns negatív c-jun (TAM67) az IVL promóteren képes az AP-1 kötőhely gátlásával akadályozni az IVL expresszióját keratinocitákban (Han *et al.*, 2012). Az egyes AP-1 faktorok funkciójának megváltozása pedig fontos szerepet játszik a keratinocita differenciálódásban és rákos folyamatok kialakulásában (Eckert *et al.*, 2013). Emellett, az IVL promóter funkciójában az AP-1 faktorokon kívül a C/EBP és Sp1 faktorok is lényeges funkciót töltenek be (Crish *et al.*, 2006; Eckert *et al.*, 2004). A mi eredményeink azt mutatják, hogy a HPV 16 E6 legnagyobb mértékben a leghosszabb IVL promóter konstrukt aktivitását csökkentette, ami a teljes URR-t tartalmazta. De csökkent annak az IVL konstrukt az aktivitása is a HPV 16 E6 onkoprotein hatására, amely csak a PRR-t foglalja magába. Ez a hatás mind a proliferáló, mind a differenciálódó keratinocitákban észlelhető volt (9. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy az IVL gén szabályozó régiójának proximális része tartalmaz olyan transzkripció faktor kötőhelyeket, amelyeket a HPV 16 E6 képes szabályozni.

A HPV E7 onkogénnek csak a leghosszabb IVL promóter fragmentet tartalmazó (IVL-2418) konstruktra volt szignifikáns gátló hatása, és ezt a hatást csak a differenciálódó sejtekben tapasztaltuk (9. ábra). Ez arra utalhat, hogy az E7 hatása az IVL promóterre kevésbé direkt vagy specifikus, mint az E6 hatása. Elképzelhetőnek tartjuk, hogy az E7 hatása az IVL expressziójára (szinergista gátló hatás az E6-tal) és az IVL promóter aktivitására (mérsékelt gátló hatás differenciálódó sejtekben) nem direkt vagy specifikus kapcsolat, hanem inkább olyan mechanizmusoknak köszönhető, amiket nemrégiben írtak le. Ilyen például az, hogy a DEK proteint transzkripciósan aktiválja a HPV 16 E7, és kimutatták, hogy ez fontos szerepet játszik a sejtprolifерáció indukálásában és a differenciálódási folyamat gátlásában (Wise-Draper *et al.*, 2005; Wise-Draper *et al.*, 2009). Továbbá a HPV 16 E7-ről megállapították, hogy aktiválja a nucleophosmint (NPM) poszttranszkripció szinten, és ennek is lényeges szerepet tulajdonítanak a keratinocita differenciálódás akadályozásában (McCloskey *et al.*, 2010).

Kutatásunk folytatásaként, terveink között szerepelt, hogy egyéb differenciálódáshoz köthető gének expresszióját is vizsgáljuk a HPV 16 onkoproteinek jelenlétében (Gyongyosi *et al.*, 2014). Munkánk következő részében lehetőségünk nyílt elvégezni a teljes genom expressziós mintázatának elemzését microarray segítségével a HPV 16 E6 és/vagy E7 onkogénnel transzdukált humán keratinocitákon. A differenciálódásban fontos gének esetén az eredményeinket valós idejű PCR-rel erősítettük meg. A microarray elemzésről tudjuk, hogy nagyon jól használható teljes génexpressziós elemzésre, ugyanis egyszerre több ezer gén expressziós változását tudjuk vele vizsgálni. Azonban az is ismert, hogy az alacsony szinten expresszálandó gének esetén a microarray kevésbé pontos, ilyen szempontból gyengébb teljesítményt mutat (Beckman *et al.*, 2004). Vizsgálataink során mi is azt tapasztaltuk, hogy néhány gén esetén (CNFN, KRT4, LOR, S100A10 és S100A12) csak a valós idejű PCR vizsgálatokban tudtuk kimutatni, hogy a HPV onkoproteinek hatására megváltozik az expressziójuk, ez a különbség a microarray analízisben nem volt észlelhető.

A legtöbb keratinocita differenciálódáshoz köthető génről, amiket vizsgálataink során találtunk, már méhnyakrákos mintákon kimutatták, hogy csökken az expressziójuk a HPV 16 onkogének hatására a normál cervikális sejtekhez képest (Santin *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2006). Ennek megfelelően *in vitro* sejtenyészési modellekben is a magas onkogén kockázatú HPV-k onkoproteinjei is csökkentették ezen gének expresszióját (Duffy *et al.*, 2003; Karstensen *et al.*, 2006; Kravchenko-Balasha *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2008). Ebből úgy tűnik, hogy a magas kockázatú HPV típusok a keratinocita differenciálódásban résztvevő gének expresszióját valamilyen általános hatással csökkentik. A HPV onkoproteinek ezen hatásának fontos szerepe lehet a vírus produktív életciklusában (Kajitani *et al.*, 2012). A gazdasejt differenciálódásának késleltetése kiemelkedő fontosságú a HPV-hez társítható premalignus cervikális léziókban (CIN), és ez látható a HPV-k által immortalizált organotipikus (raft) kultúrákban tenyésztett keratinocitákban is (Blanton *et al.*, 1991; McCance *et al.*, 1988; Merrick *et al.*, 1992).

Azonban kevés adat van arról, hogy a keratinocita differenciálódásban fontos gének expresszióját a HPV onkogének milyen mechanizmussal befolyásolják. Ezért kutatásunk második részében tovább szeretnénk vizsgálni az IVL-on kívül más, differenciálódásban résztvevő gének (DSC1, KRT4, S100A8 és SPRR1A) transzkripció aktivitását. Ezek a gének csökkent expressziót mutattak a HPV 16 onkoproteinek jelenlétében a mi vizsgálatainkban és korábbi tanulmányokban is (Duffy *et al.*, 2003; Karstensen *et al.*, 2006; Kravchenko-Balasha *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2008). Kimutattuk, hogy mindegyik gén promóterének aktivitása

csökkent a HPV onkoproteinek hatására. Minden esetben a legerősebb hatást azokban a sejtekben tapasztaltuk, ahol mindkét HPV onkogén jelen volt (12. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy HPV E6 és E7 onkoproteineknek talán additív vagy szinergista hatása van a differenciálódáshoz köthető gének expressziójára.

Azt tapasztaltuk, hogy a valós idejű PCR-rel kapott génexpressziós és a luciferáz teszttel nyert promóter aktivitási eredmények jól korreláltak egymással (11. és 12. ábra összehasonlítása). Azonban néhány esetben a szabályozó régiók aktivitásai eltérést mutattak a génexpressziós eredményekhez képest. Például a HPV 16 E7-nek alig volt hatása az S100A8 mRNS szintjére (11E. ábra), de szignifikánsan csökkentette az S100A8 promóterének aktivitását (12C. ábra). Ezzel éppen ellenkezőleg a HPV 16 E6 erősen csökkentette a SPRR1A expresszióját (11G. ábra), míg a SPRR1A szabályozó régiójának aktivitására nem volt szignifikáns hatása (12D. ábra). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a transzkripció szabályozáson kívül más mechanizmusok (talán poszttranszkripció módosítások) is hozzájárulhatnak ezeknek a géneknek a HPV onkoproteinek általi expressziós gátlásához. A HPV 16 E6-ról kimutatták, hogy a humán TERT gén expresszióját a transzkripció szintjén indukálja (Howie *et al.*, 2009). Ehhez azonban még hozzájárul, hogy egy celluláris faktorról (NFX1-123) kimutatták, hogy a HPV 16 E6 jelenlétében a hTERT mRNS stabilitása megnő (Katzenellenbogen *et al.*, 2009). Ezért úgy tűnik, hogy a transzkripció és poszttranszkripció mechanizmusok együttműködnek a hTERT expressziójának HPV 16 E6 általi szabályozásában. Az is elképzelhető, hogy a transzkripció szabályozás mellett, poszttranszkripció mechanizmusok (mint az RNS érés, transzport és mRNS stabilitás) is hozzájárulnak a keratinocita differenciálódási gének HPV onkoproteinek általi szabályozásához.

A HPV onkoproteineknek nem volt gátló hatása a KRT5 promóterére. A KRT5 egy bazális keratin, melynek expresszióját nem a differenciálódás szabályozza. Ebből úgy tűnik, hogy a HPV 16 onkoproteinek azoknak a géneknek az expresszióját gátolják specifikusan, amiket a differenciálódás szabályoz. Összefoglalva, a luciferáz eredményeink azt mutatják, hogy a HPV 16 onkogének a keratinocita differenciálódásban résztvevő általunk vizsgált gének transzkripció aktivitását csökkentik. Ez a mechanizmus valószínűleg hozzájárul ezeknek a géneknek premalignus és malignus cervikális léziókban mutatott csökkent expressziójához (Santin *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2006).

Az általunk vizsgált promóterek mindegyike, melyeknek az aktivitása változott a HPV onkoproteinek hatására, tartalmaz lehetséges AP-1 és C/EBP transzkripció faktor

kötőhelyeket (13. ábra). Ezekről a transzkripció faktorokról tudjuk, hogy a keratinocita differenciálódáshoz köthető gének transzkripció szabályozásában lényeges funkciót töltenek be, és a differenciálódás szabályozza aktivitásukat ill. expressziójukat (Eckert *et al.*, 1997; Eckert *et al.*, 2004; Mehic *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 1998; Rozenberg *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 1999), ahogy azt már az IVL esetén is említettem. A HPV 16 E7 proteinről már megállapították, hogy köti az AP-1 transzkripció faktorokat, mint a c-jun, junB, junD és c-fos (Antinore *et al.*, 1996). Kísérleteinket olyan riporter konstrukciókkal folytattuk, amelyekben több kötőhelye található ezeknek a faktoroknak, és a HPV onkoproteineknek szignifikáns gátló hatása volt az aktivitásukra. Ezért elképzelhető, hogy a HPV 16 onkoproteinek a keratinociták differenciálódásában fontos gének promóterét az AP-1 és C/EBP transzkripció faktorok aktivitásának módosításával gátolják. Annak bizonyítására, hogy ez valóban így van, további kísérleteket tervezünk, úgy, mint promóter mutagenézis és kromatin immunprecipitáció (ChIP).

Eredményeink azt mutatják, hogy a keratinocita differenciálódás gátlásának egy lehetséges mechanizmusa az, hogy a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek a differenciálódásban fontos gének promóterét gátolják. A HPV replikáció a hámréteg differenciálódó sejtjeiben történik, melyekben a sejtciklus a vírusfertőzés hiányában már nem megy végbe. Az E7 onkoprotein képes indukálni a sejtciklus előrehaladását a differenciálódó keratinocitákban is, ami fontos lépés a virális DNS replikációban (Longworth & Laimins, 2004; Munger *et al.*, 2001). Másrészt az E6 onkogén képes az epiteliális differenciáció késleltetésére (Zehbe *et al.*, 2009), ezzel szintén megfelelő celluláris környezetet biztosítva a HPV replikációjához. Az IVL és a differenciálódás által szabályozott egyéb gének (DSC1, KRT4, S100A8 és SPRR1A) csökkent expressziójának a HPV onkoproteinek jelenlétében lényeges funkciója van a vírus produktív életciklusában és a vírus által indukált karcinogenezisben.

ÖSSZEFOGLALÁS

A keratinociták differenciálódása és a humán papillomavírusok (HPV) replikációs ciklusa szorosan kapcsolódnak egymáshoz. A magas kockázatú HPV 16 E6 és E7 onkogénjei megzavarják a normál differenciálódási folyamatot, de az ezért felelős mechanizmusok még nem tisztázottak. Munkám célja az volt, hogy megvizsgáljam a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinjeinek hatását a keratinociták differenciálódásában fontos gének expressziójára.

A primer humán keratinocita sejteket (HFK) HPV 16 E6 és E7 onkogéneket expresszáló LXSXN alapú vektorokkal transzdukáltuk. A sejtek differenciáltatása szignifikánsan megemelte az involukrin (IVL) mRNS és fehérje szintjét. Az HPV 16 E6 és E7 onkogének együtt csökkentették az az IVL mRNS és protein szintjét a differenciáltatott, ill. nem differenciáltatott HFK sejtekben is. Transziens transzfekcióban és luciferáz tesztben a HPV 16 E6 csökkentette az involukrin promóter aktivitását a proliferáló HFK sejtekben. A HPV 16 E6 gátló hatását a humán IVL promóterre a gén proximális szabályozó részén (PRR) lokalizáltuk. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a HPV 16 E6 onkogén IVL promóteren kifejtett szignifikáns gátló hatása hozzájárul az endogén IVL expresszió gátlásához a HPV onkoproteinek által. Ezzel ellentétben a HPV 16 E7 által okozott gátló hatást az endogén IVL expressziójára az E7-nek talán egy kevésbé direkt vagy specifikus hatása okozza.

Microarray analízis és kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakción alapuló génexpressziós elemzés megerősítette, hogy a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek gátolják a keratinocita differenciálódásban résztvevő gének expresszióját a HPV onkogénekkal transzdukált HFK sejtekben. Továbbá, a luciferáz riporter tesztek igazolták, hogy a HPV E6 és E7 képesek gátolni ezen gének promóterének aktivitását is. Az általunk vizsgált gének szabályozó régiója tartalmaz lehetséges AP-1 ill. C/EBP transzkripció faktor kötőhelyeket, melyek a keratinocita differenciálódás fontos regulátorai, és a HPV onkoproteinek ezeknek az aktivitását is csökkentették transziens transzfekciós kísérleteinkben. Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a HPV 16 E6 és/vagy E7 onkogének a keratinocita differenciálódáshoz köthető gének (dezmokollin 1, keratin 4, S100 kalciumkötő fehérje A8, small prolin-rich protein 1A) expresszióját legalább részben a promóterük aktivitásának gátlásán keresztül szabályozzák, talán az AP-1 ill. C/EBP faktorok aktivitásának módosításával. A HPV onkoproteineknek ez a hatása valószínűleg fontos szerepet játszik a vírus produktív életciklusában és a vírus által indukált karcinogenezis folyamatában is.

SUMMARY

The life cycle of the human papillomavirus (HPV) is closely linked to keratinocyte differentiation. The HPV 16 E6 and E7 oncoproteins have been shown to hamper the normal differentiation of keratinocytes; however, the underlying mechanisms responsible for this phenomenon are yet to be clarified. The purpose of this study was to investigate the effects of HPV16 oncoproteins on the expression of genes involved in keratinocyte differentiation.

Human foreskin keratinocytes were transduced by LXS^N-based retrovirus vectors expressing HPV 16 E6 and E7. The differentiation of HFK cells significantly increased both the mRNA and the protein levels of involucrin (IVL). The E6 and E7 oncoproteins of HPV 16 together caused strong down-regulation of IVL mRNA and protein both in proliferating and in differentiating HFK cells. In transient transfection assays and luciferase tests, we found that HPV 16 E6 repressed IVL promoter activity in proliferating HFK cells. The inhibitory effect of HPV 16 E6 on the human IVL promoter could be localized to the proximal regulatory region (PRR) of the gene. These results suggest that the down-regulation of IVL promoter activity by HPV 16 E6 significantly contribute to the inhibition of endogenous IVL expression by the HPV 16 oncoproteins. In contrast, the down-regulation of endogenous IVL expression by HPV16 E7 is probably caused by a less direct and specific effect of E7 on the IVL promoter.

Gene expression analysis performed with microarray analysis and quantitative real-time polymerase chain reaction confirmed that HPV 16 E6 and E7 oncogenes down-regulate the expression of several genes involved in keratinocyte differentiation in HPV oncogene transduced HFK cells. Furthermore, luciferase reporter assays revealed that the HPV 16 E6 and E7 oncoproteins were able to down-regulate the promoter activity of several of these genes. The regulatory region of each studied gene contains putative binding sites for AP-1 and C/EBP transcription factors, which are important regulators of keratinocyte differentiation, and the HPV oncoproteins also reduced their activity in our transient transfection experiments. Our results suggest that the HPV 16 E6 and/or E7 oncogenes may have the potential to down-regulate the expression of several keratinocyte differentiation genes (such as desmocollin 1, keratin 4, S100 calcium-binding protein A8 and small proline-rich protein 1A) at least partially by down-regulating their promoter activity, maybe through modifying the activities of AP-1 and C/EBP factors. This activity of the HPV oncoproteins may have a role in the productive virus life cycle, and also in virus induced carcinogenesis.

IRODALOMJEGYZÉK

- Antinore, M. J., Birrer, M. J., Patel, D., Nader, L. & McCance, D. J. (1996). The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *EMBO J* 15, 1950-1960.
- Armstrong, D. J. & Roman, A. (1997). The relative ability of human papillomavirus type 6 and human papillomavirus type 16 E7 proteins to transactivate E2F-responsive elements is promoter- and cell-dependent. *Virology* 239, 238-246.
- Banerjee, N. S., Genovese, N. J., Noya, F., Chien, W. M., Broker, T. R. & Chow, L. T. (2006). Conditionally activated E7 proteins of high-risk and low-risk human papillomaviruses induce S phase in postmitotic, differentiated human keratinocytes. *J Virol* 80, 6517-6524.
- Banks, E. B., Crish, J. F., Welter, J. F. & Eckert, R. L. (1998). Characterization of human involucrin promoter distal regulatory region transcriptional activator elements-a role for Sp1 and AP1 binding sites. *Biochem J* 331 (Pt 1), 61-68.
- Beckman, K. B., Lee, K. Y., Golden, T. & Melov, S. (2004). Gene expression profiling in mitochondrial disease: assessment of microarray accuracy by high-throughput Q-PCR. *Mitochondrion* 4, 453-470.
- Bellanger, S., Tan, C. L., Xue, Y. Z., Teissier, S. & Thierry, F. (2011). Tumor suppressor or oncogene? A critical role of the human papillomavirus (HPV) E2 protein in cervical cancer progression. *Am J Cancer Res* 1, 373-389.
- Bernard, H. U. (2013). Regulatory elements in the viral genome. *Virology* 445, 197-204.
- Blanton, R. A., Perez-Reyes, N., Merrick, D. T. & McDougall, J. K. (1991). Epithelial cells immortalized by human papillomaviruses have premalignant characteristics in organotypic culture. *Am J Pathol* 138, 673-685.
- Borbely, A. A., Murvai, M., Konya, J., Beck, Z., Gergely, L., Li, F. & Veress, G. (2006). Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. *J Gen Virol* 87, 287-294.
- Borowiec, A. S., Delcourt, P., Dewailly, E. & Bidaux, G. (2013). Optimal differentiation of in vitro keratinocytes requires multifactorial external control. *PLoS One* 8, e77507.
- Bosch, F. X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C. J. & Shah, K. V. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55, 244-265.
- Botchkarev, V. A., Gdula, M. R., Mardaryev, A. N., Sharov, A. A. & Fessing, M. Y. (2012). Epigenetic regulation of gene expression in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 132, 2505-2521.
- Candi, E., Schmidt, R. & Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 328-340.

- Cheng, S., Schmidt-Grimminger, D. C., Murant, T., Broker, T. R. & Chow, L. T. (1995). Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev* 9, 2335-2349.
- Crish, J. F., Gopalakrishnan, R., Bone, F., Gilliam, A. C. & Eckert, R. L. (2006). The distal and proximal regulatory regions of the involucrin gene promoter have distinct functions and are required for in vivo involucrin expression. *J Invest Dermatol* 126, 305-314.
- de Villiers, E. M. (2013). Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* 445, 2-10.
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U. & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17-27.
- Dochez, C., Bogers, J. J., Verhelst, R. & Rees, H. (2014). HPV vaccines to prevent cervical cancer and genital warts: an update. *Vaccine* 32, 1595-1601.
- Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32 Suppl 1, S7-15.
- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 110, 525-541.
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R. & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 30 Suppl 5, F55-70.
- Duffy, C. L., Phillips, S. L. & Klingelutz, A. J. (2003). Microarray analysis identifies differentiation-associated genes regulated by human papillomavirus type 16 E6. *Virology* 314, 196-205.
- Eckert, R. L., Adhikary, G., Young, C. A., Jans, R., Crish, J. F., Xu, W. & Rorke, E. A. (2013). AP1 transcription factors in epidermal differentiation and skin cancer. *J Skin Cancer* 2013, 537028.
- Eckert, R. L., Crish, J. F., Banks, E. B. & Welter, J. F. (1997). The epidermis: genes on - genes off. *J Invest Dermatol* 109, 501-509.
- Eckert, R. L., Crish, J. F., Efimova, T., Dashti, S. R., Deucher, A., Bone, F., Adhikary, G., Huang, G., Gopalakrishnan, R. & Balasubramanian, S. (2004). Regulation of involucrin gene expression. *J Invest Dermatol* 123, 13-22.
- Eckert, R. L. & Rorke, E. A. (1989). Molecular biology of keratinocyte differentiation. *Environ Health Perspect* 80, 109-116.
- Eckert, R. L., Sturniolo, M. T., Broome, A. M., Ruse, M. & Rorke, E. A. (2005). Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol* 124, 481-492.
- Eckert, R. L., Yaffe, M. B., Crish, J. F., Murthy, S., Rorke, E. A. & Welter, J. F. (1993). Involucrin--structure and role in envelope assembly. *J Invest Dermatol* 100, 613-617.
- Edgar, R., Domrachev, M. & Lash, A. E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30, 207-210.

- Faridi, R., Zahra, A., Khan, K. & Idrees, M. (2011). Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virol J* 8, 269.
- Ganguly, N. & Parihar, S. P. (2009). Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci* 34, 113-123.
- Ghittoni, R., Accardi, R., Hasan, U., Gheit, T., Sylla, B. & Tommasino, M. (2010). The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes* 40, 1-13.
- Gyongyosi, E., Szalmas, A., Ferenczi, A., Konya, J., Gergely, L. & Veress, G. (2012). Effects of human papillomavirus (HPV) type 16 oncoproteins on the expression of involucrin in human keratinocytes. *Virol J* 9, 36.
- Gyongyosi, E., Szalmas, A., Ferenczi, A., Poliska, S., Konya, J. & Veress, G. (2014). Transcriptional regulation of genes involved in keratinocyte differentiation by human papillomavirus 16 oncoproteins. *Arch Virol*.
- Han, B., Rorke, E. A., Adhikary, G., Chew, Y. C., Xu, W. & Eckert, R. L. (2012). Suppression of AP1 transcription factor function in keratinocyte suppresses differentiation. *PLoS One* 7, e36941.
- Howie, H. L., Katzenellenbogen, R. A. & Galloway, D. A. (2009). Papillomavirus E6 proteins. *Virology* 384, 324-334.
- Huh, W. K. (2009). Human papillomavirus infection: a concise review of natural history. *Obstet Gynecol* 114, 139-143.
- Jones, D. L., Alani, R. M. & Munger, K. (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev* 11, 2101-2111.
- Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A. & Sakai, H. (2012). Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. *Front Microbiol* 3, 152.
- Karstensen, B., Poppelreuther, S., Bonin, M., Walter, M., Iftner, T. & Stubenrauch, F. (2006). Gene expression profiles reveal an upregulation of E2F and downregulation of interferon targets by HPV18 but no changes between keratinocytes with integrated or episomal viral genomes. *Virology* 353, 200-209.
- Katich, S. C., Zerfass-Thome, K. & Hoffmann, I. (2001). Regulation of the Cdc25A gene by the human papillomavirus Type 16 E7 oncogene. *Oncogene* 20, 543-550.
- Katzenellenbogen, R. A., Vliet-Gregg, P., Xu, M. & Galloway, D. A. (2009). NFX1-123 increases hTERT expression and telomerase activity posttranscriptionally in human papillomavirus type 16 E6 keratinocytes. *J Virol* 83, 6446-6456.
- Kravchenko-Balasha, N., Mizrachy-Schwartz, S., Klein, S. & Levitzki, A. (2009). Shift from apoptotic to necrotic cell death during human papillomavirus-induced transformation of keratinocytes. *J Biol Chem* 284, 11717-11727.

- Kypriotou, M., Huber, M. & Hohl, D. (2012). The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins and the 'fused genes' family. *Exp Dermatol* 21, 643-649.
- Lehr, E. & Brown, D. R. (2003). Infection with the oncogenic human papillomavirus type 59 alters protein components of the cornified cell envelope. *Virology* 309, 53-60.
- Lehr, E., Hohl, D., Huber, M. & Brown, D. (2004). Infection with Human Papillomavirus alters expression of the small proline rich proteins 2 and 3. *J Med Virol* 72, 478-483.
- Lippens, S., Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P. & Declercq, W. (2005). Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1497-1508.
- Liu, X., Roberts, J., Dakic, A., Zhang, Y. & Schlegel, R. (2008). HPV E7 contributes to the telomerase activity of immortalized and tumorigenic cells and augments E6-induced hTERT promoter function. *Virology* 375, 611-623.
- Longworth, M. S. & Laimins, L. A. (2004). Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 362-372.
- Mantovani, F. & Banks, L. (2001). The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 20, 7874-7887.
- McCance, D. J., Kopan, R., Fuchs, E. & Laimins, L. A. (1988). Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7169-7173.
- McCloskey, R., Menges, C., Friedman, A., Patel, D. & McCance, D. J. (2010). Human papillomavirus type 16 E6/E7 upregulation of nucleophosmin is important for proliferation and inhibition of differentiation. *J Virol* 84, 5131-5139.
- McLaughlin-Drubin, M. E. & Munger, K. (2009a). The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* 384, 335-344.
- McLaughlin-Drubin, M. E. & Munger, K. (2009b). Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res* 143, 195-208.
- Mehic, D., Bakiri, L., Ghannadan, M., Wagner, E. F. & Tschachler, E. (2005). Fos and jun proteins are specifically expressed during differentiation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 124, 212-220.
- Merrick, D. T., Blanton, R. A., Gown, A. M. & McDougall, J. K. (1992). Altered expression of proliferation and differentiation markers in human papillomavirus 16 and 18 immortalized epithelial cells grown in organotypic culture. *Am J Pathol* 140, 167-177.
- Munger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., Grace, M. & Huh, K. (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 78, 11451-11460.

- Munger, K., Basile, J. R., Duensing, S., Eichten, A., Gonzalez, S. L., Grace, M. & Zacny, V. L. (2001). Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20, 7888-7898.
- Munger, K. & Howley, P. M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 89, 213-228.
- Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., Snijders, P. J., Meijer, C. J. & International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study, G. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348, 518-527.
- Munoz, N., Castellsague, X., de Gonzalez, A. B. & Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24 Suppl 3, S3/1-10.
- Murvai, M., Borbely, A. A., Konya, J., Gergely, L. & Veress, G. (2004). Effect of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes on the activity of the transforming growth factor-beta2 (TGF-beta2) promoter. *Arch Virol* 149, 2379-2392.
- Nemes, Z. & Steinert, P. M. (1999). Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med* 31, 5-19.
- Ng, D. C., Shafaei, S., Lee, D. & Bikle, D. D. (2000). Requirement of an AP-1 site in the calcium response region of the involucrin promoter. *J Biol Chem* 275, 24080-24088.
- Pei, X. F., Sherman, L., Sun, Y. H. & Schlegel, R. (1998). HPV-16 E7 protein bypasses keratinocyte growth inhibition by serum and calcium. *Carcinogenesis* 19, 1481-1486.
- Pett, M. & Coleman, N. (2007). Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 212, 356-367.
- Porter, R. M. & Lane, E. B. (2003). Phenotypes, genotypes and their contribution to understanding keratin function. *Trends Genet* 19, 278-285.
- Robinson, N. A., Lopic, S., Welter, J. F. & Eckert, R. L. (1997). S100A11, S100A10, annexin I, desmosomal proteins, small proline-rich proteins, plasminogen activator inhibitor-2, and involucrin are components of the cornified envelope of cultured human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 272, 12035-12046.
- Rose, B. R., Thompson, C. H., Tattersall, M. H., Elliott, P. M., Dalrymple, C. & Cossart, Y. E. (1995). Identification of E6/E7 transcription patterns in HPV 16-positive cervical cancers using the reverse transcription/polymerase chain reaction. *Gynecol Oncol* 56, 239-244.
- Rossi, A., Jang, S. I., Ceci, R., Steinert, P. M. & Markova, N. G. (1998). Effect of AP1 transcription factors on the regulation of transcription in normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 110, 34-40.
- Rozenberg, J. M., Bhattacharya, P., Chatterjee, R., Glass, K. & Vinson, C. (2013). Combinatorial recruitment of CREB, C/EBPbeta and c-Jun determines activation of promoters upon keratinocyte differentiation. *PLoS One* 8, e78179.

Santin, A. D., Zhan, F., Bignotti, E., Siegel, E. R., Cane, S., Bellone, S., Palmieri, M., Anfossi, S., Thomas, M., Burnett, A., Kay, H. H., Roman, J. J., O'Brien, T. J., Tian, E., Cannon, M. J., Shaughnessy, J., Jr. & Pecorelli, S. (2005). Gene expression profiles of primary HPV16- and HPV18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. *Virology* 331, 269-291.

Sherman, L., Itzhaki, H., Jackman, A., Chen, J. J., Koval, D. & Schlegel, R. (2002). Inhibition of serum- and calcium-induced terminal differentiation of human keratinocytes by HPV 16 E6: study of the association with p53 degradation, inhibition of p53 transactivation, and binding to E6BP. *Virology* 292, 309-320.

Sherman, L. & Schlegel, R. (1996). Serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes is inhibited by the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16. *J Virol* 70, 3269-3279.

Snijders, P. J., Steenbergen, R. D., Heideman, D. A. & Meijer, C. J. (2006). HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol* 208, 152-164.

Stanley, M. (2006). Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 24 Suppl 1, S16-22.

Tungteakkhun, S. S. & Duerksen-Hughes, P. J. (2008). Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol* 153, 397-408.

Van Doorslaer, K. & Burk, R. D. (2010). Evolution of human papillomavirus carcinogenicity. *Adv Virus Res* 77, 41-62.

Veldman, T., Liu, X., Yuan, H. & Schlegel, R. (2003). Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8211-8216.

Venuti, A., Paolini, F., Nasir, L., Corteggio, A., Roperto, S., Campo, M. S. & Borzacchiello, G. (2011). Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer* 10, 140.

Wan, F., Miao, X., Quraishi, I., Kennedy, V., Creek, K. E. & Pirisi, L. (2008). Gene expression changes during HPV-mediated carcinogenesis: a comparison between an in vitro cell model and cervical cancer. *Int J Cancer* 123, 32-40.

Welter, J. F., Crish, J. F., Agarwal, C. & Eckert, R. L. (1995). Fos-related antigen (Fra-1), junB, and junD activate human involucrin promoter transcription by binding to proximal and distal AP1 sites to mediate phorbol ester effects on promoter activity. *J Biol Chem* 270, 12614-12622.

Wise-Draper, T. M., Allen, H. V., Thobe, M. N., Jones, E. E., Habash, K. B., Munger, K. & Wells, S. I. (2005). The human DEK proto-oncogene is a senescence inhibitor and an upregulated target of high-risk human papillomavirus E7. *J Virol* 79, 14309-14317.

Wise-Draper, T. M., Morreale, R. J., Morris, T. A., Mintz-Cole, R. A., Hoskins, E. E., Balsitis, S. J., Husseinadeh, N., Witte, D. P., Wikenheiser-Brokamp, K. A., Lambert, P. F. & Wells, S. I. (2009). DEK proto-oncogene expression interferes with the normal epithelial differentiation program. *Am J Pathol* 174, 71-81.

Wong, Y. F., Cheung, T. H., Tsao, G. S., Lo, K. W., Yim, S. F., Wang, V. W., Heung, M. M., Chan, S. C., Chan, L. K., Ho, T. W., Wong, K. W., Li, C., Guo, Y., Chung, T. K. & Smith, D. I. (2006). Genome-wide gene expression profiling of cervical cancer in Hong Kong women by oligonucleotide microarray. *Int J Cancer* 118, 2461-2469.

Woodman, C. B., Collins, S. I. & Young, L. S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7, 11-22.

Yugawa, T., Handa, K., Narisawa-Saito, M., Ohno, S., Fujita, M. & Kiyono, T. (2007). Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol Cell Biol* 27, 3732-3742.

Zehbe, I., Richard, C., DeCarlo, C. A., Shai, A., Lambert, P. F., Lichtig, H., Tommasino, M. & Sherman, L. (2009). Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology* 383, 69-77.

Zhang, B., Chen, W. & Roman, A. (2006). The E7 proteins of low- and high-risk human papillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 437-442.

Zhu, S., Oh, H. S., Shim, M., Sterneck, E., Johnson, P. F. & Smart, R. C. (1999). C/EBPbeta modulates the early events of keratinocyte differentiation involving growth arrest and keratin 1 and keratin 10 expression. *Mol Cell Biol* 19, 7181-7190.

TÁRGYSZAVAK

humán papillomavírus 16, E6 és E7 onkoproteinek, keratinocita differenciáció, involukrin, keratin, S100 kalciumkötő fehérje, dezmozokollin, small prolin-rich protein

KEYWORDS

human papillomavirus 16, E6 and E7 oncoproteins, keratinocyte differentiation, involucrin, keratin, S100 calcium binding protein, desmocollin, small prolin-rich protein

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Veress Györgynek, hogy munkám során értékes elméleti és gyakorlati tanácsokkal látott el, emberségével és szakmai tudásával mindvégig támogatott. Szeretném megköszönni korábbi témavezetőmnek és az Orvosi Mikrobiológiai Intézet vezetőjének, Dr. Kónya Józsefnek, hogy szakdolgozati munkámat és PhD tanulmányaimat segítette. Továbbá köszönöm Dr. Gergely Lajos professzor úrnak, hogy az intézet korábbi vezetőjeként lehetőséget adott a szakdolgozati munkámra, valamint azóta is hasznos tanácsokkal látott el.

Továbbá hálával tartozom barátaimnak, munkatársaimnak, Dr. Antalné Dr. László Brigittának, Dr. Csoma Eszternek, Dr. Mészáros Beátának, Dr. Szalmás Anitának, Ferenczi Annamáriának, akik munkám során folyamatosan támogattak. Szeretnék még köszönetet mondani az Orvosi Mikrobiológiai Intézet többi dolgozójának, kollegáimnak, akik segítségemre voltak PhD tanulmányaim során, valamint Dr. Póliska Szilárdnak (UD-GenoMed Kft., Debrecen), a szekvenálásokban és a microarray adatelemzésben nyújtott segítségéért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni férjemnek és családomnak a kitartó támogatásukat.

Munkámat a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

A kutatást az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA K81422) támogatta.

FÜGGELÉK



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/75/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gyöngyösi Eszter
Neptun kód: POG8UI
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10035491

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gyöngyösi, E.**, Szalmás, A., Ferenczi, A., Pólska, S., Kónya, J., Veress, G.: Transcriptional regulation of genes involved in keratinocyte differentiation by human papillomavirus 16 oncoproteins.
Arch. Virol. 160 (2), 389-398, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-014-2305-y>
IF:2.282 (2013)
2. **Gyöngyösi, E.**, Szalmás, A., Ferenczi, A., Kónya, J., Gergely, L., Veress, G.: Effects of human papillomavirus (HPV) type 16 oncoproteins on the expression of involucrin in human keratinocytes.
Virol. J. 9, 36, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-9-36>
IF:2.092



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. □ Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: www.lib.unideb.hu



További Közlemények

3. Hernádi, K., **Gyöngyösi, E.**, Mészáros, B., Szakács, L., Szalmás, A., Csoma, E., Mogyorósi, R., Czompa, L., Veress, G., Varga, I., Márton, I.J., Kónya, J.: Elevated Tumor Necrosis Factor-alpha Expression in Periapical Lesions Infected by Epstein-Barr Virus.
J. Endod. 39 (4), 456-460, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2012.12.028>.
IF:2.788
4. Ferenczi, A., **Gyöngyösi, E.**, Szalmás, A., Hernádi, Z., Tóth, Z., Kónya, J., Veress, G.: Sequence variation of human papillomavirus Type 31 long control region: Phylogenetic and functional implications.
J. Med. Virol. 85 (5), 852-859, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.23542>
IF:2.217
5. Szalmás, A., **Gyöngyösi, E.**, Ferenczi, A., László, B., Karosi, T., Csomor, P., Gergely, L., Veress, G., Kónya, J.: Activation of Src, Fyn and Yes non-receptor tyrosine kinases in keratinocytes expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 oncoprotein.
Virol. J. 10 (1), 79, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-10-79>
IF:2.089
6. Hernádi, K., Csoma, E., Ádám, B., Szalmás, A., **Gyöngyösi, E.**, Veress, G., Márton, I., Kónya, J.: Association of human herpesvirus 6 subtypes with symptomatic apical periodontitis.
Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 112 (3), 401-406, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.02.007>
IF:1.457

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,925

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 4,374

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

Debrecen, 2015.04.07.