

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Torque teno vírus epidemiológiája és filogenetikája Kelet- Magyarországon

Fehér Enikő

Témavezető: Dr. Szarka Krisztina



DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2012

TORQUE TENO VÍRUS EPIDEMIOLÓGIÁJA ÉS FILOGENETIKÁJA KELET- MAGYARORSZÁGON

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az orvostudományok tudományágban

Írta:

Fehér Enikő

okleveles biológus (mikrobiológus)

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája
Mikrobiológia programja keretében

Témavezető: Dr. Szarka Krisztina, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Bíró Sándor, az MTA doktora
Dr. Minárovits János, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja:

2012. május 18., 11 óra, DE OEC Gyógyszerhatástani Tanszék

Az értekezés bírálói:

Dr. Bácsi Attila, Ph.D.
Dr. Bányai Krisztián, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Bácsi Attila, Ph.D.
Dr. Bányai Krisztián, Ph.D.
Dr. Bíró Sándor, az MTA doktora
Dr. Minárovits János, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja:

2012. május 18., 13 óra, DE OEC I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

BEVEZETÉS

A torque teno vírus (TTV) az *Anelloviridae* családba tartozó egyszálú DNS vírus, amelyet japán kutatók azonosítottak 1997-ben poszttranszfúziós hepatitiszes beteg szérumából. Ezt követően számos szövetben kimutatták a vírus jelenlétét, de patológiai szerepére eddig nem derült fény.

Munkacsoportunk egy korábbi tanulmányában gégetumoros és légúti papillomatosisos betegekben vizsgálta a TTV, az egyes genocsoportú TTV (ggr1TTV), a humán papillomavírus (HPV) és a ggr1TTV-HPV koinfekció előfordulási gyakoriságát. Abban a betegcsoportban, ahol tumor progresszió lépett fel, nagyobb ggr1TTV és ggr1TTV-HPV prevalenciát, és ehhez kapcsolatosan jelentősen rosszabb tünetmentes túlélést tapasztaltunk, mint azoknál a betegeknél, akiknél tumor progresszió nem fordult elő. Ebben a tanulmányban más, HPV-asszociált szájüregi (oralis leukoplakia, oralis lichen planus, oralis laphámsejtes carcinoma) és méhnyaki (atípiás méhnyaki lézió, méhnyaki carcinoma) beteg- és kontroll csoportokban kívántuk megállapítani a TTV, ggr1TTV, HPV, és ggr1TTV-HPV koinfekció előfordulási gyakoriságát, és a fertőzések jelentőségét.

A TTV esetében a jelenlegi taxonómiai besorolás szerint 29 faj, míg a korábbi besorolás szerint több mint 30 genotípus különíthető el. A vírus genomja igen változatos, ami eltérő fehérje expressziót, ezáltal patogenitásbeli különbségeket eredményezhet, így a vírusfaj vagy genotípus megállapítása fontos tényező lehet a vírus patogenitásának megismerése szempontjából. Mivel a szakirodalomban a mai napig a genocsoport/genotípus/szubsztípus felosztást alkalmazzák, szekvenálást követően saját mintáink és az adatbázisban fellelhető magyarországi szekvenciák esetében is elvégeztük vírustörzsfa elemzéssel a szekvenciák faji, illetve szubsztípus szintű besorolását.

Célunk tehát a TTV esetleges patogén szerepének megerősítése, megállapítása, a TTV fajok, geno- és szubsztípusok előfordulásának és eloszlásának meghatározása volt az általunk vizsgált betegcsoportokban.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A TTV felépítése

A TTV-k 30-33 nm átmérőjű, ikozahedrális szimmetriájú, burok nélküli, körülbelül 3,8 kilobázis (kb) hosszúságú, negatív polaritású, cirkuláris, egyszálú DNS genommal rendelkező vírusok. A vírusokat jelenleg az *Anelloviridae* család *Alphatorquevirus* nemzetségébe sorolják, a családon belül pedig 29 fajt különítenek el. A fajok között legalább 35%, a nemzetségek között legalább 56% a különbség nukleotid szinten.

Bár a Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság (ICTV) fajokba (species), a szakirodalom viszont a mai napig genocsoportokba, genotípusokba és szubtípusokba sorolja a TTV-ket. A GenBank adatbázisban jelenleg fellelhető szekvenciák nagy része ORF1 (nyitott olvasási keret 1) részleges szekvencia, az N22 régió vagy azzal átfedő szakasz. Az N22 annak a körülbelül 500 bázis hosszú szakasznak a neve, amelyet először azonosítottak. Bár ez a szakasz csak kisebb hányadát teszi ki a teljes vírusgenomnak, a szekvenciák filogenetikai vizsgálatára ez a régió is alkalmas, legalábbis az egyes genocsoporton belül.

A szakirodalomban a korábbi taxonómiai besorolás szerint öt genocsoportot, több mint 30 genotípust, ezen belül néhány esetben szubtípusokat (1a, 1b, 2a, 2b, 2c) különböztetnek meg. A különböző genocsoportok között legalább 50%, a genotípusok között legalább 30%, a szubtípusok között legalább 15% a különbség az N22 régióban nukleotid szinten.

A TA278 prototípus vírus genomja 3852 nukleotidból (nt) áll, amely tartalmazza a körülbelül 1,2 kb hosszúságú nem kódoló régiót (untranslated region, UTR) és a körülbelül 2,6 kb hosszú kódoló régiót, amelyek hossza vírus típustól függően változó. Az UTR szerepet játszik a transzkripció és transzláció kontrolljában, így magában foglalja a promoter és enhancer elemeket, transzkripciós faktor kötőhelyeket, valamint egy, a különböző genotípusok között eltérő hosszúságú GC gazdag régiót és egy konzervatív szakaszt. A két utóbbi szakasz szekvenciája alapján hurok formálására lehet képes.

A TTV kódoló régiója több ORF-et foglal magában, amelyek száma TTV típusonként változó; a két fő ORF, az ORF1 és ORF2 azonban mindegyikben megtalálható. Az ORF1 körülbelül 770 aminosavat kódol, köztük a kapszid fehérjét. N-terminálisán magában foglal a csirke anaemia vírushoz hasonlóan egy argininben gazdag régiót, valamint a csirke anaemia vírus Rep fehérje motívumaihoz hasonló szakaszokat. Az argininben gazdag régió DNS-kötő aktivitása révén a vírus becsomagolódását, a Rep fehérjék pedig a vírus replikációját segítik. Jellemző az ORF1 szekvenciára három hipervariabilis régió, amelyek az N22 régióon kívül esnek; ezekben a nukleotid különbség az egyes szekvenciák között a 90%-ot meghaladhatja,

ami segítheti az immunválasz kikerülését. A másik, minden izolátumban megtalálható régió az ORF2, amely körülbelül 202 aminosavat kódol; szerepe pontosan még nem ismert. A két fő ORF mellett több kisebb meglétét is feltételezik.

A különböző TTV típusokban az eltérő fehérje expresszió egyszerű nukleotid polimorfizmusoknak és rekombinációs eseményeknek köszönhető. Ennek az immunválasz kikerülésében és a vírusfertőzés patogenezisében lehet szerepe.

A TTV kimutatása

A vírus kimutatására szolgáló módszerek közül a legelterjedtebb a polimeráz láncreakció (PCR). A legtöbb kutatócsoport az N22 régióra illeszkedő primereket használt (ORF1 primerek), ezek azonban csak az egyes genocsoportba tartozó genotípusok kimutatására alkalmasak. A jól konzervált UTR-re illeszkedő primerekkel a TTV általános előfordulása detektálható. A vírus detektálására a sejtekben *in situ* hibridizációs technikát is alkalmaznak. A geno- és szubtypusok meghatározása szekvenálással, vagy restrikciós hasítási mintázat (restrikciós fragment hossz polimorfizmus, RFLP) alapján történik.

A TTV szöveti előfordulása

A vírus előfordulási gyakorisága az egészséges populációban igen magas, az infekciót életreszóló fertőzésként jellemzik. A májban kimutatták a vírust és replikatív formáit; a máj érintettsége miatt a TTV az epében és székletben is megjelenhet, amely fecalis-oralis átvitelt tesz lehetővé. A vírus és replikatív intermedier formái a máj mellett a csontvelőben, a perifériás vér mononukleáris sejtjeiben (PBMC) és hemopoietikus őssejtekben is megjelenhetnek, ami a vérben lévő vírusok forrásaként szolgálhat. Kimutatták többek között tüdőben, lépben, hasnyálmirigyben, vesében, pajzsmirigyben, izmokban, méhnyaki mintákban, nyálban, vizeletben, könnyben, ondóban, illetve anyatejben, köldökzsinórvérben és amnion folyadékban.

A TTV előfordulása különböző betegségekben

Többen feltételezték a TTV szerepét ismeretlen eredetű hepatitisben és hepatitis C vírus okozta májbetegségekben. Összefüggést találtak a hepatocellularis carcinoma kimenetele, a TTV jelenléte és a magas TTV terhelés között, valamint a TTV prognosztikai szerepét feltételezik hepatocellularis carcinoma esetében. Mivel a TTV a csontvelőben is szaporodik, összefüggésbe hozták hepatitis-asszociált aplasticus anaemiával.

Idiopathiás tüdőfibrosis esetében rosszabb túlélési arányt figyeltek meg TTV-vel fertőzött, mint nem fertőzött betegcsoportban, valamint összefüggést találtak a TTV jelenléte, a vírusterhelés és a tüdőrák kialakulása között. Kimutatták bronchopneumoniában és asthmában; bronchopneumoniás gyermekekben a négyes genocsoportú TTV dominanciája volt jellemző. Felvetődött, hogy a vírus felborítja a lymphocytá egyensúlyt, így immunszuppresszív hatású, valamint hogy a légúti csillós hámsejtek fertőzése révén képes azok működését gátolni.

A vírus a nyálban 100-1000-szer magasabb arányban volt jelen, mint a szérumban, így valószínűsítették szaporodását a szájüregi régióban. A vírus jelenléte az epithelialis sejtekben bebizonyosodott *in situ* hibridizációval, lichen planusban és leukoplakiában szenvedő betegek szájnyálkahártya sejtjeiben. Lehetséges kapcsolatot találtak a periodontitis, a vírus előfordulása és a vírusterhelés között, amiben több tényező szerepét feltételezték: a TTV a gyulladáshoz vezető folyamatokban játszhat szerepet, illetve a gyulladás miatt infiltráló lymphocytákban szaporodó TTV is okozhatja a magasabb vírus pozitivitást.

Méhnyaki nyálkahártya elváltozásában szenvedő és egészséges egyének exfoliált sejtjeiben is vizsgálták a TTV előfordulását UTR PCR-rel. A TTV pozitívitas szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest, illetve a HPV pozitív mintákban szignifikánsan magasabb volt a TTV prevalenciája, mint a HPV negatívokban. Az exfoliált sejtekben 10-1000-szer magasabb volt a vírusterhelés, mint a szérumban, ami vírus replikációra utalhat. A genocsoportok közül a ggr1TTV volt a leggyakoribb.

Vizsgálták a TTV jelenlétét gastritisben, autoimmun betegségben, valamint különböző daganatokban szenvedő betegekben.

TTV vizsgálatok Magyarországon

Két tanulmányban vizsgálták az egyes genocsoportba tartozó TTV genotípusok előfordulását az általunk is használt ORF1 PCR módszerrel Magyarországon rajtunk kívül. A hepatitiszes betegek 50,4%-a (115/228), illetve 50,9%-a (56/110), valamint az egészséges egyének 18,5%-a (20/108) bizonyult pozitívnak. A megszekvenált minták többsége a kettes genotípushoz tartozott.

Munkacsoportunk korábban két tanulmányt készített TTV-vel kapcsolatban. Az egyikben vesetranszplantált és egészséges személyek PBMC sejtjeit vizsgáltuk. UTR PCR alapján a vesetranszplantáltak 100%-a (92/92), a kontroll személyek 95,5%-a (63/66), ORF1 PCR alapján a vesetranszplantáltak 57,6%-a (53/92), az egészséges személyek 19,7%-a (13/66) bizonyult TTV fertőzöttnek. A 12 megszekvenált TTV fele kettes genotípusba

tartozott. A másik tanulmányban 40 légúti papillomatosisos és laphámsejtes carcinomás beteg mintáit vizsgáltuk. UTR PCR alapján a légúti papillomatosisos betegek (RRP) 80,0%-a, a malignusan transzformált papillomatosisos (MP) betegek 100%-a, a laryngealis laphámsejtes carcinomás (LSCC) betegek 88,0%-a volt TTV pozitív. N22 PCR alapján az RRP betegek 20,0%-a, a MP betegek 100%-a, az LSCC betegek 44,0%-a hordozott ggr1TTV-t. A TTV mellett a HPV és a ggr1TTV-HPV koinfekció prevalenciáját is vizsgáltuk. A vírusfertőzések előfordulása jelentősen magasabb volt azokban az LSCC betegekben, akikben tumor progresszió következett be, mint azokban, akikben tumor progresszió nem jelentkezett. A vírusfertőzések előfordulásának megfelelően a tumor progresszióban szenvedők tünetmentes túlélése szignifikánsan rövidebb volt.

Humán papillomavírusok

A humán papillomavírusok a *Papillomaviridae* család Alpha-, Beta-, Gamma-, Mu- és Nupapillomavirus nemzetségbe tartozó, körülbelül 55 nm átmérőjű, ikozahedrális szimmetriájú, burok nélküli vírusok. A vírusgenom megközelítőleg 8 kbp hosszúságú, kettősszálú, cirkuláris DNS molekula, amely korai (early, E) és késői (late, L) átíródo szakaszokat (ORF-eket), valamint egy nem kódoló régiót (long control region, LCR) tartalmaz.

Bár az ICTV faji besorolásig tagolja a papillomavírusokat, az ezekkel a vírusokkal foglalkozó kutatók a HPV-eket genotípusokra bontják. Jelenleg legalább 120 HPV genotípus ismert, amelyeket daganatkeltő képességük alapján alacsony és magas onkogén kockázatú csoportokba osztanak.

A HPV átvitele bőrfelületek érintkezésével, nemi úton, vertikálisan az újszülött szülőcsatornán való áthaladásakor történhet, a bőr és nyálkahártya mikrosérülésein keresztül. A vírus szaporodási ciklusa a hámsejtek differenciálódásával függ össze. A bőr bazális rétegébe jutott vírusok a sejt életciklusának előrehaladtával először a korai géneket írják át és megindul a vírus replikáció, majd átíródnak a struktúrfehérjék és az összeszerelődött virionok a felső bőrrétegben lévő sejtekkel a külvilágba jutnak.

A korai ORF-ek által kódolt vírusfehérjék a vírus életciklusának korai szakaszában jelennek meg. Ezeknek a vírus replikációban, transzkripcióban (E1, E2; E4; E5), a virionok összeépülésében és sejtből történő kiszabadulásában (E4), valamint a sejtek transzformálásában (E5, E6, E7) van szerepe. Az E5 transzmembrán fehérje a fertőzött sejtek membránjában elhelyezkedő növekedési faktor receptorokat aktiválja. Az E6 fehérje a p53 fehérjéket köti és fokozza az ubiquitin-mediált degradációjukat, így gátolja a DNS javítási

folyamatait, illetve irreverzibilis DNS károsodás esetében az apoptózist. Az E7 fehérje a pRb (retinoblastoma) fehérjével komplexet képez, így az E2F faktor szabadon transzaktiválja a sejtproliferációjában résztvevő egyéb faktorokat. Az E7 protein emellett más sejtproliferációs faktorokkal is kapcsolatba lép. Az L1 ORF a fő kapszid fehérjét, az L2 ORF a kisebb struktúrfehérjét kódolja, ami a vírus nukleinsav kapszidba csomagolódást segíti. Az LCR a papillomavírus genom virális replikációt és transzkripciót szabályozó szakasza.

A magas kockázatú vírusok genomja az E1/E2 ORF területén felnyúlva a gazdasejt genomjába épülhet, ami az E6 és E7 fehérjék megnövekedett termeléséhez vezet; a virális onkoproteinek kontrollálatlan expressziója malignus transzformációt eredményezhet.

A méhnyakrák világszerte az egyik leggyakoribb malignus elváltozás a nők körében, amelyben a magas onkogén kockázatú HPV-ket közvetlen etiológiai tényezőként tartják számon; az esetek legalább 90%-ában a HPV kimutatható. A HPV pozitív méhnyaki atípiás és méhnyakrákos esetek körülbelül 70%-ában a magas kockázatú HPV16 és 18 detektálható. A méhnyaki rákmegelőző elváltozások 50-90%-a, az egészséges személyek körülbelül 30%-a HPV pozitív. Az alacsony kockázatú HPV típusok méhnyaki malignus daganatokban ritkán fordulnak elő, ezek elsősorban anogenitalis szemölcsöket és enyhe fokú intraepithelialis elváltozásokat okoznak.

A fej-nyaki régió laphámsejtes daganatainak, valamint a premalignus elváltozásként is jellemzett szájüregi lichen planus és leukoplakia kialakulásában az ismert tényezők mellett (alkoholfogyasztás, dohányzás, rossz higiénés, táplálkozási, életmódbeli viszonyok, orális lichen planus esetében az autoimmunitás) felmerült a HPV-k szerepe. A daganatok 20-100%-ában, a rákmegelőző elváltozások 20-30%-ában, míg egészséges kontroll személyek 0-10%-ában mutatták ki a vírust (a vizsgált régiótól, mintatípustól, detektáló módszertől függően). A HPV pozitív esetek 85-95%-ban a HPV16, kisebb arányban pedig alacsony kockázatú HPV-k (HPV6 és HPV11) is detektálhatóak. Alacsony kockázatú HPV-ket, főként HPV6-ot és HPV11-et nagy arányban mutattak ki benignus szájüregi és gége papillomatosisos, valamint gégetumoros betegekből. Juvenilis, recurrens légúti, orális és genitális papillomatosishoz vezethet az újszülöttek fertőzése.

Céltűzések

Bár több betegségben feltételezik a TTV szerepét, döntő bizonyítékot egy esetben sem találtak a vírus direkt kóroki szerepére. Felmerült, hogy a HPV-hez hasonlóan bizonyos TTV genocsoportok, genotípusok, vagy szubtípusok patogén szereppel bírhatnak egyes betegségekben, vagy legalábbis szorosabban asszociáltak egy-egy szövettípushoz.

Munkacsoportunk hasonló következtetésre jutott ggr1TTV kapcsán gégetumorok vizsgálatakor.

A fent említett adatok alapján a Ph.D. értekezés alapjául szolgáló tanulmányainkban az alábbi célokat tűztük ki:

- A gégetumor mellett más, HPV fertőzéssel feltételezhetően összefüggő daganat típusban, az adott régió rákmegelőző elváltozásaiban és kontroll csoportokban a TTV, illetve a ggr1TTV előfordulási gyakoriságának felmérése.
- A vizsgált mintacsoportokban a ggr1TTV-HPV koinfekció előfordulási gyakoriságának megállapítása és összehasonlítása.
- Daganatos betegekben a vírusok és vírus koinfekció túlélésre gyakorolt hatásának vizsgálata.
- A mintáinkban detektált ggr1TTV-k geno- és szubtípus meghatározása, azok előfordulásának összevetése a betegcsoportokban.
- A TTV geno- és szubtípusok földrajzi eloszlásának vizsgálata összevetve a szakirodalmi adatokkal.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Betegcsoportok

Tanulmányunkban 608 személy 904 mintáját vizsgáltuk. A szájüregi minták a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Fogorvostudományi Karának Arc-, Állcsont és Szájsebészeti, valamint Parodontológiai Tanszékeiről, a nőgyógyászati minták az Általános Orvostudományi Karának Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájáról származtak.

A szájüregi mintacsoport vizsgálatában 65 orális laphámsejtes carcinomában (OSCC) (51 férfi, 14 nő, átlagéletkor 54,4 év; 25-80 év), 44 orális leukoplakiában (OL) (14 férfi, 30 nő, átlagéletkor 56,3 év; 29-91 év) és 119 orális lichen planusban (OLP) (31 férfi, 88 nő, átlagéletkor 55,0 év; 23-79 év) szenvedő beteg anyagát vizsgáltuk. A szájüregi kontrollt 72 egészséges személy (19 férfi, 53 nő, átlagéletkor 52,0 év; 22-77 év) szájüregi exfoliált sejt mintája szolgáltatta. Az OSCC betegek esetében három minta állt rendelkezésre személyenként, egy kimetszett szöveti minta a tumorból, illetve exfoliált sejt minták az egészséges buccalis hámról és a nyelvről. Az OL és OLP betegeknél a lézióból és az egészséges nyálkahártya felszínéről vett exfoliált sejteket használtuk.

A méhnyaki mintacsoportot 87 méhnyaki daganatos beteg (CC) (átlagéletkor 42,8 év; 27-62 év) kimetszett tumoros szövetdarabja, 84 méhnyaki atípiában szenvedő beteg (ACM) (átlagéletkor 36,6 év; 20-78 év) és 97 egészséges, tünetmentes személy (NCM) (átlagéletkor 38,6 év; 18-62 év) exfoliált méhnyaki mintája alkotta.

A laryngealis mintacsoport laphámsejtes gégetumorban (LSCC) (n=25 férfi, átlagéletkor 56,6 év; 43-71 év), recurrens légúti papillomatosisban (RRP) (n=10, 8 férfi, 2 nő, átlagéletkor 27,7 év; 3-71 év) és malignizált gége papillomatosisban (MP) szenvedő betegek (n=5, 4 férfi, 1 nő, átlagéletkor 55,0 év; 43-66 év) kimetszett mintáiból állt. A laryngealis betegcsoportban a TTV és HPV kimutatására egy korábbi tanulmányban került sor. Jelen értekezésben a klinikai adatokat frissítettük és elvégeztük a TTV-k szekvencia analízisét. Az LSCC és MP betegek mintáit a TTV szekvencia vizsgálatok során összevonva, egy csoportban említjük laryngealis laphámsejtes carcinomaként (LSCC).

A tumoros betegcsoportok követési adatait a mintát szolgáltató egységek klinikai adatai alapján gyűjtöttük össze. Ezek az adatok mind a 65 OSCC és 25 LSCC beteg esetében elérhetőek voltak, míg a 87 CC beteg közül 63 esetben álltak rendelkezésre.

PCR és RFLP

A minták DNS tartalmának kivonása után a virális DNS kimutatásához PCR-t használtunk. A mintákból kinyert DNS minőségét minden esetben a humán β -globin gén amplifikálásával ellenőriztük a PCO3 és PCO4 primerekkel. A humán papillomavírusok detektálása nested PCR-rel zajlott az MY09/MY11 és GP5+/ GP6+ primerpárokkal. A HPV jelenlétét HPV6, 11, 16, 18, 31, 33 típusai esetében E7 ORF specifikus PCR-rel is ellenőriztük.

A TTV kimutatása két különböző nested PCR amplifikációval történt. Az UTR PCR (NG133/NG147 és NG132/NG134 primerekkel) a TTV nem kódoló régiójára illeszkedő primerpárokkal az összes TTV genotípus, míg a seminested ORF1 PCR (NG059/NG063 és NG061/NG063 primerekkel) az ORF1 régióra illeszkedő primerekkel a ggr1TTV, azaz a TTV1 és TTV3 fajba tartozó vírusok kimutatására alkalmas.

A HPV genotipizálását a nested PCR első körének MY PCR termékeiből végeztük RFLP analízissel, hat különböző restriktív enzimmel. Amennyiben az MY PCR az alacsony HPV DNS kópiaszám miatt nem eredményezett elegendő amplimert (gyengén pozitív minták), a nested PCR második körének (GP PCR) termékeit kezeltük restriktív enzimekkel a HPV tipizálására.

Az eredmények statisztikai értékelése

A PCR eredmények alapján kapott prevalencia adatok statisztikai összevetéséhez khinégyszet próbát és Fisher-egzakt tesztet, a ggr1TTV, valamint a ggr1TTV-HPV koinfekció betegek túlélésére gyakorolt hatásának felméréséhez Kaplan-Meier tesztet használtuk. Az elemzéseket az SPSS 15.0 for Windows statisztikai programmal végeztük. A konfidencia intervallum minden esetben 95% volt.

Szekvenálás és TTV törzsfa elemzés

Az ORF1 PCR pozitív minták amplimereinek szekvenciáját az ORF1 PCR nested kör primereinek segítségével határoztuk meg. A szekvencia vizsgálatokat CLC DNA Workbench 4.0 szoftver segítségével hajtottuk végre. A törzsfák elkészítése „neighbour joining” módszerrel történt, a törzsfák validitását 1000 ismétlés alapján teszteltük. Minden sikeresen szekvenált szakasz egy közös, 187 bázis hosszú fragmentjét vetettük alá törzsfa analízisnek. Minden egyszeresen TTV fertőzött mintából származó szekvenciát összehasonlítottunk a GenBank szekvenciáival. A korábban elfogadott genocsoport/genotípus/szubtípus besorolás elvégzéséhez olyan ggr1TTV szekvenciákat töltöttük le az adatbankból, amelyek közel állnak saját szekvenciáinkhoz, amelyek besorolása ismert (egyes és kettes genotípus esetében a szubtípus is), valamint szekvenciája átfed az általunk vizsgált 187 bázis hosszú szakasszal. A GenBank-ban fellelhető 44 magyar ggr1TTV részleges szekvenciát is letöltöttük a szubtípusok megállapítása és eredményeinkkel történő összevetés céljából.

A jelenleg érvényben lévő Alphatorquevirus genus 29 fajának típussekvenciáját is összevetettük a genotípus/szubtípus referenciákkal, saját szekvenciáinkkal, illetve a többi magyar szekvenciával. A 29 faj típus sekvenciáján kívül az adatbázisban más, az új taxonómia szerint besorolt sekvenciát nem találtunk.

EREDMÉNYEK

A TTV, ggr1TTV, ggr1TTV-HPV koinfekció előfordulási gyakorisága szájüregi mintákban

A TTV előfordulása UTR PCR alapján 54,2% 54,5% 53,8% és 78,5% a kontroll, valamint az OL, OLP, és OSCC lézió mintákban. A különbség szignifikánsan magasabb OSCC betegekben, mint a többi szájüregi csoportban ($p=0,002$, $p=0,001$ és $p=0,011$ a kontroll, OL és OLP csoporthoz képest). A betegcsoportok egészséges nyálkahártya felszínről vett mintáiban a TTV előfordulása a kontroll csoporttól nem tért el jelentősen. A lézióból és az

egészséges nyálkahártyákról vett mintákat betegcsoportonként összehasonlítva szignifikáns különbséget csak az OSCC betegek esetében találtunk (49,2% és 78,5%; $p=0,003$).

ORF1 PCR alapján a ggr1TTV előfordulása 1,4%, 4,5%, 10,1%, 24,6% a kontroll, valamint az OL, OLP, OSCC lézió mintacsoportban. Az OSCC és OLP betegek léziójában szignifikánsan magasabb volt a ggr1TTV előfordulási gyakorisága a kontroll csoporthoz képest ($p<0,001$ és $p=0,034$). Az OL és OLP léziók között a ggr1TTV prevalencia nem különbözött jelentősen, de mindkét esetben szignifikánsan alacsonyabb, mint OSCC-ben ($p=0,007$ és $p=0,01$). A ggr1TTV pozitívítási aránya az egészséges nyálkahártya felszínéről vett mintákban nem különbözött kiugróan a kontrollhoz és egymáshoz képest. A betegcsoportokon belül a lézióból és az egészséges nyálkahártyákról vett mintákat összehasonlítva szignifikáns különbséget csak az OSCC betegek esetében találunk (7,7% és 24,6%; $p=0,036$).

A HPV prevalenciáját és genotipizálás eredményét szájüregi mintákban munkacsoportunk korábban, egy másik tanulmányban megállapította. A HPV prevalencia minden betegcsoport lézióból származó mintáiban magasabb volt a kontroll csoporthoz képest ($p<0,001$ minden esetben), míg a lézióból származó mintákat egymással összevetve szignifikáns különbséget csak az OLP és OSCC csoportok között találtunk ($p=0,047$). Az ép nyálkahártyáról vett minták HPV prevalenciája egymáshoz képest a lézióhoz hasonló mintázatot mutatott. A lézióból és egészséges nyálkahártyáról vett mintákat betegcsoportonként összevetve a léziókban minden esetben szignifikánsan magasabb volt a HPV előfordulása ($p<0,05$ minden összehasonlításban). A mintákban a magas kockázatú HPV genotípusok domináltak, elsősorban a HPV16.

A ggr1TTV-HPV koinfekció prevalenciája 0,0%, 4,5%, 6,7%, 12,3% a kontroll, valamint OL, OLP, OSCC lézió mintacsoportokban. A kontroll csoportban ggr1TTV-HPV koinfekció nem fordult elő. A három szájüregi betegcsoport lézió mintái közül a koinfekció aránya csak OSCC esetében volt magasabb szignifikánsan a kontroll csoporthoz képest ($p<0,001$). A betegcsoportok egészséges nyálkahártyáról vett mintái és a kontroll csoport között nem volt különbség. Az OSCC betegek szöveti mintáiban szignifikánsan magasabb koinfekció arányt találtunk a betegcsoport egészséges nyálkahártya mintáihoz képest (1,5 % és 12,3%; $p<0,001$).

A TTV, ggr1TTV, HPV és ggr1TTV-HPV koinfekció előfordulási gyakorisága méhnyaki mintákban

UTR PCR alapján a TTV általános előfordulása 78,4%, 83,3%, 90,8% a kontroll, ACM és CC mintákban. A különbség a kontroll és CC csoportok között szignifikáns

($p=0,018$). A ggr1TTV előfordulási gyakorisága 20,6%, 29,8%, 29,9% a kontroll, ACM és CC csoportokban; a kontroll csoportban alacsonyabb az atípiás és daganatos mintákhoz képest, a különbség azonban nem szignifikáns.

A HPV prevalenciája mind a daganatos, mind az atípiás mintákban szignifikánsan magasabb volt a kontrollhoz képest, illetve a daganatos csoportban szignifikánsan magasabb az atípiás csoporthoz képest is (27,8%, 66,7%, 95,4% a kontroll, ACM és CC csoportokban; $p<0,001$ minden esetben). A ggr1TTV-HPV koinfekció prevalenciája szignifikánsan magasabb a daganatos és atípiás betegekben a kontrollhoz képest (3,1%, 20,2%, 29,9% a kontroll, ACM és CC csoportokban; $p<0,001$ minden esetben). Mindegyik mintacsoportban a magas onkogén kockázatú típusok domináltak. A leggyakrabban detektált típus a kontroll csoportban a HPV33, a másik két csoportban a HPV16.

A TTV, ggr1TTV és ggr1TTV-HPV előfordulási gyakoriságának összevetése LSCC, OSCC és CC betegekben

LSCC és OSCC betegekben a TTV és HPV prevalenciája jelentősen nem tért el, míg a ggr1TTV és a ggr1TTV-HPV koinfekció szignifikánsan magasabb arányú volt LSCC esetében. A gége- és méhnyaki tumoros minták összehasonlításakor statisztikai különbséget nem találtunk. Az OSCC és méhnyaki daganatos csoport összehasonlításakor a TTV általános előfordulási aránya szignifikánsan magasabb volt méhnyakrák esetében OSCC-hez képest, míg a ggr1TTV előfordulási gyakorisága jelentősen nem különbözött. A ggr1TTV-HPV koinfekció méhnyakrákban szignifikánsan gyakoribb volt OSCC-hez képest. Ez azonban a magas HPV pozitivitási arálynak köszönhető a méhnyaki daganatokban, mivel a ggr1TTV fertőzött betegek mindegyike HPV fertőzött is.

ggr1TTV és ggr1TTV-HPV koinfekció hatása a daganatos betegek túlélésére

Az LSCC betegcsoportban a korábban közölt adatokat frissítettük. A ggr1TTV-vel fertőzött és nem fertőzött LSCC betegek tünetmentes túlélési aránya és túlélési ideje szignifikánsan különbözött; a fertőzött betegek esetében mindkét tényező rosszabbul alakult [túlélési arány 9,1% (1/11 beteg) vs. 78,6% (11/14); átlagos túlélési idő 289,5 (190,9-388,2) nap vs. 1229,2 (659,6-1798,8) nap; $p=0,0052$]. A ggr1TTV-HPV koinfekció tovább csökkentette a túlélési arányt és túlélési időt azokhoz képest, akiknél a kettős fertőzés nem állt fenn [túlélési arány 0,0% (0/8) vs. 82,4% (14/17); átlagos túlélési idő 240,0 (148,4-331,6) vs. 1154,4 (638,8-1670,0) nap; $p=0,0017$].

Az OSCC betegcsoportban a ggr1TTV fertőzés sem önmagában [túlélési arány 75,0% (12/16) vs. 71,4% (35/49); átlagos túlélési idő 1436,9 (1133,9-1739,9) nap vs. 1276,0 (1093,8-1458,1) nap; $p=0,59$], sem HPV fertőzéssel társulva [túlélési arány 62,5% (5/8) vs 73,7% (42/57); átlagos túlélési idő 1262,2 (875,6-1648,9) nap vs. 1312,8 (1142,5-1483,1) nap; $p=0,88$] nem befolyásolta a betegek tünetmentes túlélését.

A méhnyaki daganatos betegcsoportban 63 beteg adatait sikerült elemezni. A ggr1TTV pozitív és negatív betegek tünetmentes túlélése között jelentős különbség nincs [tünetmentes túlélés 77,3% (17/22) vs. 75,6% (31/41); átlagos túlélési idő 2480,1 (1930,6-3029,6) vs. 2419,9 (2037,4-2802,5) nap; $p=0,91$]. A magas HPV fertőzöttségi arány miatt (95,4%) minden ggr1TTV hordozó beteg HPV pozitív volt, így a koinfekció tünetmentes túlélésre gyakorolt hatásának vizsgálatakor ugyancsak a fenti eredményeket kaptuk.

A TTV-specifikus amplimerek szekvenálásának eredménye

A TTV szekvenciáját 73 beteg 83 mintájában sikerült megállapítani, 17 beteg 18 mintája többszörösen ggr1TTV fertőzöttnek bizonyult. Az egy vírus típusal fertőzött mintából (57 beteg 65 mintája) származó szekvenciák egy közös, 187 bázis hosszú szakaszát a GenBank adatbázisban rögzítettük (FN689730-FN689794).

A 29 TTV faj típussekvenciáival való összevetés alapján minden meghatározott szekvenciánk az TTV1 fajba tartozik.

A korábbi taxonómia szerint kettes genotípusba tartozó szekvenciák, ezen belül a 2c (20 személy 21 mintája) és 2b (14 személy 16 mintája) szubtypusok voltak a leggyakoribbak, majd az egyes genotípusba tartozó szekvenciák (12 személy 12 szekvenciája 1b, 8 személy 10 szekvenciája 1a szubtypusú) következtek. Három személy három mintájának genetikai távolsága a 2b és 2c szubtypusoktól a genocsoport/genotípus/szubtypus besorolás szerint a genotípusokat elválasztó genetikai távolság (0,3) értékéhez közelített. Ezek a szekvenciák a GenBank olyan kettes genotípusú szekvenciájához álltak közel, amelyet korábban betűvel nem jelöltek, ezért tanulmányunkban ezeket a szekvenciákat 2' szubtypusként jelöltük a genotípus/szubtypus csoportok elkülöníthetősége érdekében. Három személy három mintája tartozott a hármas genotípusba, ezek genetikai távolsága a használt referenciától szintén nagy (0,21-0,23).

Nyolc beteg esetében volt lehetőségünk két különböző minta TTV szekvenciáját megállapítani. Öt betegnél, akiknek több ORF1 amplimerjét szekvenáltuk, ugyanazt a szubtypust, míg három betegnél két különböző szubtypusú TTV-t detektáltunk a két mintában.

A jelen tanulmány keretein belül szekvenált mintákon kívül az adatbázisban elérhető magyar ggr1TTV szekvenciák tipizálását is elvégeztük. A 44 szérumból származó szekvencia között a 2c szubtypusok erős dominanciája figyelhető meg, az összes minta 61,4%-a, a kettes genotípusú TTV-k 95%-a tartozik ebbe a szubtypusba. A hepatitiszes betegek szérumában a legmagasabb a 2c szubtypus aránya (79,2%), 2b szubtypus ebben csoportban nem fordult elő. A 2b szubtypus alacsony számban fordult elő egészséges véradókban és vesetranszplantáltakban is. A három hármas genotípusú TTV vesetranszplantáltak szérumából származik. Egy kettősen fertőzött hepatitiszes beteg mintájában a 2c szubtypus mellett hatos genotípusú TTV fordult elő, ami a TTV3 fajba tartozik. Az általunk vizsgált mintákban, beleértve az összes magyar szekvenciát, négyes és ötös genotípusú TTV nem fordult elő.

A TTV szekvenciák genetikai diverzitása

A genetikai távolság saját mintáink tekintetében egy szubtypus/genotípus kategórián belül 0,00 és 0,13 között alakult. Az egyes genotípus 1a és 1b szubtypus csoportjain belül a genetikai távolság 0,00-0,03, a hármas genotípuson belül 0,02-0,04. A kettes genotípus három szubtypus csoportja igen diverz képet mutatott, a genetikai távolság 0,00-0,13 közötti érték, amely a 2c szubtypusú szekvenciák között a legnagyobb.

Az összes magyar minta tekintetében a legváltozatosabb a 2c szubtypus volt, a legnagyobb genetikai távolság 0,15 a szubtypus két genetikai értelemben legtávolabbi mintája között. A 2c szubtypuson belül a 42 személy 48 TTV szekvenciája három csoportot alkotott (cluster A, B, C; egy csoporton belül a genetikai távolság $\leq 0,10$), csoportonként 34, 10 és 4 szekvenciával, melyek közül 17, 1 és 3 szekvencia a saját mintáinkból, a többi más magyar tanulmányokból származott. Mindhárom csoport különböző mintatípusokból származó szekvenciákból állt, azonban a B csoport kilenc szérum eredetű és csak egy méhnyaki atípiából származó szekvenciát tartalmazott, az A csoportban pedig a saját minták nagy része (15/17) daganatos minta volt. A 2' szubtypus és hármas genotípus esetében is nagy a genetikai diverzitás, ám ezeken belül clusterokról a kis mintaszám miatt nem beszélhetünk. A hármas genotípusban egy OSCC és két ACM mintából származó szekvencia állt közel egymáshoz, míg a szérumból származó minták genetikai értelemben ezektől távolabb estek.

MEGBESZÉLÉS

Munkacsoportunk egy korábbi tanulmánya szerint az egyes genocsoportú torque teno vírus és humán papillomavírus szignifikánsan magasabb arányban fordult elő progresszív

gégetumorban szenvedő betegek szövetszövetmintáiban a nem progresszív tumoros betegek mintáihoz képest, a két vírussal történő koinfekció pedig kedvezőtlen hatással volt progresszív tumorok esetében a betegek túlélésére, ami a vírusok lehetséges kokarcinogén szerepét sugallja. A megfigyelés felvetette azt a kérdést, hogy más, HPV-vel összefüggésbe hozható betegség esetében lehet-e szerepe a ggr1TTV-nek, illetve a két vírus koinfekciójának, így tanulmányunkat kiterjesztettük a szájüregi és méhnyaki régió elváltozásaira is (OSCC, OLP, OL, ACM, CC).

A TTV igen elterjedt az egészséges populációban, bár az irodalmi adatok összehasonlítása nehéz, mivel a detektáláshoz használt PCR primerek eltérő szakaszokat sokszoroznak fel, különböző az érzékenységük és specificitásuk. Az általunk is használt primerpárokat alkalmazó tanulmányokból összegyűjtött adatok alapján egészséges személyek szérumban a ggr1TTV gyakorisága Ázsiában 30%, Európában 16,3%, Magyarországon 19,3%. Az UTR primerekkel vizsgálva a TTV prevalenciáját Ázsiát tekintve Japánban 97%, de Indiában csak 45,3%, Európát tekintve Olaszországban 87,5%, Csehországban 51,3%, Magyarországon 95% a pozitív szérumok aránya.

A fej-nyaki és méhnyaki kontroll csoportjainkban a TTV prevalenciája igen változatos, a szájüregi kontroll csoportban a ggr1TTV gyakorisága 1,4%, méhnyaki normál mintákban 20,6%; a TTV általános előfordulása a szájüregi kontrollban 54,2%, a méhnyaki normál mintákban 78,4%. A fej-nyaki csoportokban alacsonyabb, a méhnyaki mintákban a szérumhoz hasonló a TTV előfordulási aránya, bár az adatok nehezen összehasonlíthatóak a minták, ezáltal az eltérő vírustermelő környezet és az alkalmazott módszerek különbségei miatt. A miénkkel ténylegesen összevethető fej-nyaki adatok a szakirodalomból hiányoznak. Egy munkacsoport az NG133/147 és NG132/134 nested primereket használta méhnyaki atípiás és egészséges kontroll minták TTV pozitívitásának detektálására. A normál minták 52,7%-a, az atípiás minták 74,7%-a volt TTV pozitív, ami az általunk kapott értékeknél (78,4% és 83,3%) alacsonyabb.

Méhnyaki mintáinkban a HPV előfordulási gyakorisága megfelel az irodalom alapján vártnak. A TTV általános előfordulása méhnyaki daganatos mintákban szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest, míg a ggr1TTV előfordulása mindhárom méhnyaki csoportban hasonlóan alakult. A fej-nyaki régióban, az LSCC és OSCC betegekben a ggr1TTV és a ggr1TTV-HPV aránya szignifikánsan magasabb volt a többi fej-nyaki betegség és kontroll csoporthoz képest. Ezek szerint a ggr1TTV jelenléte a fej-nyaki régió elváltozásaival összefüggésben állhat, ezzel szemben a méhnyaki léziókkal valószínűleg nem; az általános TTV pozitívításban mért különbségekből eredően a cervicalis régió és más TTV

genocsoportok/genotípusok között azonban lehetséges kapcsolat. A méhnyaki csoportokban a TTV és ggr1TTV előfordulása is magasabb volt a szájüregi csoportokhoz képest. A magas TTV pozitivitás ebben a régióban arra is utalhat, hogy a méhnyaki nyálkahártya kedvezőbb környezeti feltételeket biztosít a TTV szaporodásához, mint a szájüreg nyálkahártyája. A CC minták esetében fontos megjegyezni, hogy a magas HPV pozitivitás miatt minden ggr1TTV pozitív minta HPV pozitív is. A ggr1TTV-HPV koinfekció arányát elsősorban ez határozza meg, és mivel a ggr1TTV pozitivitás a három méhnyaki csoportban nem tér el jelentősen, a ggr1TTV-HPV koinfekció jelentősége ebben a régióban nem valószínű.

OSCC-ben szenvedő betegekben a TTV, ggr1TTV, HPV és ggr1TTV-HPV koinfekció előfordulási gyakorisága szignifikánsan magasabb volt a szájüregi kontrollhoz, illetve a betegek ép nyálkahártyájáról vett mintáiban tapasztaltnál képest. Ez a HPV mellett a TTV/ggr1TTV esetleges patogén szerepét is felveti ebben a csoportban. Összevetve a jelen értekezés, és az LSCC betegekkel foglalkozó korábbi tanulmányunk eredményeit, a HPV előfordulási gyakorisága OSCC és LSCC betegekben azonos (47,7% és 48%), a TTV, ggr1TTV és a ggr1TTV-HPV aránya azonban az OSCC betegcsoportban alacsonyabb az LSCC betegcsoportéhoz képest (OSCC esetében 78,5%, 24,6%, 12,3%, LSCC esetében 88%, 44%, 32%). Bár a HPV prevalenciája azonos a két csoportban, az alacsony kockázatú HPV fertőzések aránya LSCC betegek mintáiban meghaladja a magas kockázatú típusok arányát.

LSCC betegek esetében a progresszív tumorban szenvedő (metasztázisos vagy recidív) és a nem progresszív tumorban szenvedő betegek mintái külön csoportra bontva különbséget mutattak a vírusok előfordulási aránya és a túlélés tekintetében. Felvetődött, hogy ggr1TTV az LSCC progressziójában jut esetleg szerephez. Az OSCC és CC betegcsoportban a vírusfertőzések és a betegség progressziója között adataink alapján nem áll fenn összefüggés.

Az általunk vizsgált két, szájüregi premalignus lézióknak tekintett betegség közül a ggr1TTV aránya magasabb az autoimmunitáson alapuló OLP esetében a mechanikai irritáció miatt kialakuló OL-hez képest, míg a TTV és a ggr1TTV-HPV koinfekció aránya a két csoportban közel azonos. Lehetséges, hogy a szájüregi régióban a ggr1TTV jelenléte az immunológiai változásokkal és a daganatos szövetek jelenlétével, nem pedig a karcinogenezis folyamatával áll összefüggésben.

A szájüregi betegcsoportok egészséges nyálkahártyából izolált TTV és ggr1TTV aránya nem tért el számottevően a szájüregi kontroll csoportban detektálttól. A TTV jelenléte a HPV-hez hasonlóan a lézióra jellemző, ami szintén a ggr1TTV és a szájüregi elváltozások közötti összefüggésre utalhat.

A TTV jelenléte mononukleáris sejtekben ismert. Esetünkben a szájüregi léziós minták tekintetében a ggr1TTV aránya magasabb OLP-ben a kontroll és OL mintákhoz képest, valamint méhnyaki mintákban az exfoliált sejteket tartalmazó mintákban a TTV aránya hasonló a daganatos szövetben mérthez. Amennyiben a mononukleáris sejtektől függene csak a TTV jelenléte, akkor a tumoros szövetekben a lymphocytá infiltráció miatt magasabb TTV arány lenne várható más léziós és a kontroll csoporthoz képest. A TTV jelenléte a szájüreg epithelialis sejtjeiben és nyálban ismert, az epithelialis sejtek szolgálhatnak tehát a TTV forrásaként, legalábbis a fej-nyaki régióban.

Több tanulmány feltételezi a TTV geno- és szubtypusok esetleges szöveti preferenciáját. Elképzelhető, hogy a perzisztens TTV fertőzés (akár egyes genocsoportokra vagy genotípusokra vonatkozóan) és a vírus fokozott replikációja immunológiai változások és fennálló betegségek következménye, és bár önmagában nem okoz betegséget, azok progressziójában esetleg potencirozó hatást fejthet ki.

A különböző TT vírusok szöveti és betegség preferenciájának különbségeit a vírusgenom szerkezeti és génexpressziós különbségeivel lehet magyarázni, ami a vírus patogenitására és a szervezet immunitására is hatással lehet. Egyes tanulmányok szerint a TTV ORF2 proteinje az NF- κ B útvonal gátlása által gátolhatja a gyulladási választ, az interferon termelést és az interferonokhoz kapcsolódó génexpressziót. A csökkent interferon termelés és a gyulladási válasz gátlása segítheti például a HPV-t a nem produktív, perzisztens fertőzés létrehozásában, ami virális karcinogenezishez vezethet. Ilyen események magyarázhatják OSCC, LSCC és MP betegcsoportokban a ggr1TTV-HPV koinfekció magasabb arányát szemben a benignus gége papillomatosisban tapasztalttal, illetve LSCC esetében a koinfekcióban szenvedők rosszabb túlélését.

Mivel a vírus patogenitása a vírusok eltérő genomi szerkezetével összefüggésben állhat az eltérő génexpressziós mintázatnak köszönhetően, illetve különböző TTV genocsoportok, geno- és szubtypusok esetében felmerült a különböző kórképekkel való asszociáció lehetősége, megvizsgáltuk a TTV fajok, geno- és szubtypusok eloszlási mintázatát saját, és más magyarországi szekvenciák között a részleges ORF1 szekvenciák összehasonlításával. A korábbi genocsoport/genotípus/szubtypus besorolás alapján egyes genocsoportba tartozó TTV-k a jelenleg érvényben lévő taxonómia szerint a TTV1 (1-5 genotípus) és TTV3 (hatos genotípus) fajba tartoznak, amelyeket ezidáig alacsonyabb taxonómiai csoportokra nem bontottak. A szakirodalomban eddig az új faji besorolást nem használták, így az irodalmi adatokkal való összehasonlítás miatt a vírusok geno- és szubtypusok szerinti azonosítását is elvégeztük. Amennyiben tényleges összefüggés áll fenn a

TTV geno- és szubtypusai, valamint az okozott betegségek között, a TTV1 fajon belüli diverzitásának vizsgálata és a korábbi genocsoport/genotípus/szubtípus osztályozás illesztése az új taxonómiai rendszerbe előrelépést jelenthet a vírus megismerésében. Adataink alapján a genotípus-szubtípus faj alatti kategorizálás adaptációja a TTV1 fajon belül könnyen megoldható. Ez segítheti az összehasonlítást a korábban leírt adatok, valamint az új taxonómiai rendszer között. Tudomásunk szerint a jelen értekezés megírásához használt 2011-ben megjelent közleményünk az első, amelyik a korábbi és a jelenlegi taxonómiai kategóriákat összeveti.

Az összes, adatbázisban fellelhető magyar ggr1TTV szekvenciát szubtípus/genotípus rendszerbe sorolva, anatómiai régiók alapján csoportosítva a fej-nyaki és a szérumból származó mintákban a mintázat hasonló, míg a méhnyaki szekvenciáké ezektől különböző. Minden régióban a kettes genotípusú TTV volt a leggyakoribb. A 44 szérumból származó szekvencia közül 32-ben (72,7%) kettes genotípusú TTV volt kimutatható, amiből 27 (61,4%) a 2c szubtípusba tartozik. A különböző betegcsoportokban vizsgálva a geno- és szubtípusok eloszlását, a 2c szubtípus kiugró aránya hepatitiszesekben szembevetve bármilyen más összehasonlítás mellett; a hepatitiszes minták 79,2%-a hordozta ezt a szubtípust. Ez a magas arány felveti annak lehetőségét, hogy a szérumból TTV forrásaként szolgáló sejtek esetleg ezzel a szubtípussal mutatnak szorosabb kapcsolatot, illetve hogy ez a szubtípus befolyásolhatja a hepatitis kialakulását vagy lefolyását.

A legtöbb TTV-ről szóló tanulmány beteg- és kontroll csoportokban vizsgálta a vírus általános előfordulását, vagy kisebb mintaszámmal ORF1 PCR alapján a genotípus, ritkábban szubtípus eloszlást. Azok a tanulmányok, amelyek genocsoport szintű eloszlást vizsgáltak, a ggr1TTV dominanciáját tapasztalták. Saját tanulmányunkban 73 ggr1TTV-vel fertőzött betegből 17-ben detektáltunk többszörös infekciót. Ennek aránya azonban valószínűleg magasabb lenne, ha a vizsgálatot az összes ismert genocsoportra/genotípusra kiterjesztenénk; a magas UTR PCR pozitívítási adatok esetünkben is arra utalnak, hogy a nem egyes genocsoportba tartozó genotípusok is magas arányban fordulnak elő.

Számos kelet- és dél-ázsiai tanulmány közölte az egyes genotípus dominanciáját más TTV genotípusokkal szemben. A miénkhez hasonló szubtípus eloszlást közöltek szérumból származó mintákban, hasonló adatmennyiséggel egy cseh tanulmányban, ahol hozzánk hasonlóan az NG primereket használták. A 2c szubtípus dominanciáját detektálták kisebb szekvenciaszám mellett Németországban, Törökországban, Görögországban, Szaúd-Arábiában, Portugáliában. A kettes genotípusú TT vírusok dominanciáját írták le egy másik közleményben Csehországban, Olaszországban, Spanyolországban, az Amerikai Egyesült Államokban. Egy

tanulmány szerint Ázsiában a legnagyobb az egyes genotípusú TTV aránya, de ez a genotípus Európán kívül minden más kontinensen is domináns. A kettes mellett ritkább genotípusok is nagyobb számban fordultak elő néhány területen: a hármas genotípus Görögországban, a négyes genotípus Spanyolországban és Portugáliában. A hármas genotípus, ha nem is kiemelkedő számban, de a magyar minták között is előfordult, egy OSCC, két ACM, illetve (a tíz vesetranszplantált személyből) három szérumból kimutatható volt.

Bár a kutatók által feldolgozott minták túlnyomó többsége - beleértve a fent említett tanulmányokat - szérumból származik, saját eredményeink az irodalmi adatok közé illesztve arra utalnak, hogy más vírusokhoz hasonlóan geográfiai különbségek TTV esetében is fennállhatnak.

A genetikai távolságok a szekvenciák közti páros összehasonlításokban változatosan alakultak. A magyar szekvenciák tekintetében az egyes genotípus szubtípusain belül nem voltak elkülönült clusterek. A kettes és hármas genotípusban a mintázat azonban heterogén, a genetikai távolságok nagyok két szekvencia között. A 2c szubtípuson belül (ahová a legtöbb magyar szekvencia tartozik) elkülönítettünk három clusteret, amelyekben a genetikai távolság két minta között kisebb, mint 0,10. Az A clusterben saját mintáink tekintetében a daganatos mintákból származó szekvenciák voltak többségben (15/17), a B clusterben pedig jellemző a szérumból származó szekvenciák jelenléte. Törzsfá analízisben összevetve cseh és a hazai szekvenciákat a genotípus/szubtípus eloszlási mintázat hasonló, jelentős különbségek, eltérő clusterek a taxonómiai egységeken belül nem voltak.

Összefoglalva, az egyes genocsoportú (újabb besorolás szerint a TTV1 és 3 fajba tartozó) TTV-nek szerepe lehet a fej-nyaki régió tumorainak és/vagy premalignus elváltozásainak kialakulásában és/vagy progressziójában önmagában, vagy HPV-vel koinfekcióban. A TTV szerepének megítéléséhez szükséges lehet az egyes geno- és szubtípusok meghatározása, így szerepük külön-külön vizsgálendő. Adataink arra is felhívják a figyelmet, hogy az egyes szubtípusok eloszlása valóban eltérő lehet a különböző szervekben és szövetekben, illetve a földrajzi és/vagy rasszhoz kötődő különbségek alapvetően befolyásolhatják a genotípus-szubtípus eloszlást a populációban; így a patogén szerep megítéléséhez a különböző populációkban és szövetekben tapasztalható genetikai diverzitás felmérése elengedhetetlen.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkacsoportunk egy korábbi tanulmányban magasabb egyes genocsoportú TTV (ggr1TTV), humán papillomavírus (HPV) és ggr1TTV-HPV koinfekció arányt, és a vírusfertőzésekhez kapcsolatos rosszabb tünetmentes túlélést mutatott ki progresszív laryngealis laphámsejtes carcinómában szenvedő betegekben a nem progresszív tumorban szenvedőkhöz képest, ami arra utalhat, hogy a vírus, ha nem is oka a betegség kialakulásának, de súlyosbíthatja annak lefolyását. Jelen tanulmányunkban meghatároztuk a szájüregi és méhnyaki régiókból vett daganatos szöveti (oralis laphámsejtes carcinoma, méhnyaki carcinoma), exfoliált léziós (oralis leukoplakia, lichen planus, méhnyaki atípiá) és kontroll mintákban (szájüreg esetében a betegek ép nyálkahártya, illetve egészséges személyek mintái) a TTV általános, és a korábban egyes genocsoportba (ma TTV1 és 3 fajba) tartozó TTV-k előfordulási gyakoriságát, illetve a ggr1TTV szekvenciák genotípus/szubtípus eloszlását.

Eredményeink szerint az egyes genocsoportba tartozó vírusok számára a fej-nyaki régióban az immunológiai változások, a daganatos szövetek jelenléte, vagy a carcinogenezis folyamata segítheti a vírusok replikációját, és a vírusok hozzájárulhatnak a betegségek kialakulásához és/vagy progressziójához. A TTV általános előfordulása a méhnyakrákban szenvedő betegekben szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoportokhoz képest, míg a ggr1TTV gyakorisága a három csoportban hasonlóan alakult, ami az egyes genocsoporttól eltérő vírusok szerepére utalhat. A TTV és ggr1TTV előfordulási gyakorisága a méhnyaki csoportokban magasabb volt a szájüregi csoportokhoz képest, hasonlóan a HPV-hez, ami arra utal, hogy a méhnyaki régió kedvező környezetet biztosít a vírusok szaporodásához.

Mivel több csoport összefüggést feltételez bizonyos TTV genocsoportok, genotípusok, szubtípusok, és bizonyos betegségek között, valamint a különböző TTV genotípusok különböző expressziós mintázattal rendelkeznek, a saját és az adatbázisban fellelhető magyar ggr1TTV szekvenciákat is törzsfa analízisnek vetettük alá és összehasonlítottuk a szakirodalmi adatokkal. Magyarországon a többi európai országhoz hasonlóan a kettes genotípusú TTV a leggyakoribb, ezen belül is a 2c szubtípus, ami a szérumból származó mintákban jellemző leginkább. A jelenleg érvényben lévő TTV taxonómia szerint szekvenciáink a TTV1 fajba tartoznak. A fajkon belül további felosztás, alacsonyabb taxonómiai kategória jelenleg nincs definiálva; a további tagolás azonban szükséges lehet, mivel a különböző geno- és szubtípusok különböző patogenetikai potenciállal rendelkezhetnek. A korábbi genotípus/szubtípus felosztás a leggyakoribb genotípusokat illetően átültethető lehet a jelenlegi faji kategóriába TTV1 esetében.

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ ÉS EGYÉB KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /100/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Fehér Enikő

Neptun kód: GQ6MU6

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Fehér, E.**, Kardos, G., Gáll, T., Kis, A., Gergely, L., Szarka, K.: Comparison of diversity of torque teno virus 1 in different mucosal tissues and disorders.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 58 (4), 319-337, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/AMicr.58.2011.4.8>
IF:0.625 (2010)
2. **Fehér, E.**, Gáll, T., Murvai, M., Kis, A., Boda, R., Sápy, T., Tar, I., Gergely, L., Szarka, K.: Investigation of the occurrence of torque tenovirus in malignant and potentially malignant disorders associated with human papillomavirus.
J. Med. Virol. 81 (11), 1975-1981, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21627>
IF:2.47



További Közlemények

3. Gáll, T., Kis, A., **Fehér, E.**, Gergely, L., Szarka, K.: Virological failure of intralesional cidofovir therapy in recurrent respiratory papillomatosis is not associated with genetic or epigenetic changes of HPV11: Complete genome comparison of sequential isolates.
Antiviral Res. 92 (2), 356-358, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.09.007>
IF:4.439 (2010)
4. Kis, A., **Fehér, E.**, Gáll, T., Tar, I., Boda, R., D. Tóth, E., Méhes, G., Gergely, L., Szarka, K.: Epstein-Barr virus prevalence in oral squamous cell cancer and in potentially malignant oral disorders in an eastern Hungarian population.
Eur. J. Oral. Sci. 117 (5), 536-540, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0722.2009.00660.x>
IF:1.956
5. Szarka, K., Tar, I., **Fehér, E.**, Gáll, T., Kis, A., D. Tóth, E., Boda, R., Márton, I., Gergely, L.: Progressive increase of human papillomavirus carriage rates in potentially malignant and malignant oral disorders with increasing malignant potential.
Oral Microbiol. Immunol. 24 (4), 314-318, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-302X.2009.00516.x>
IF:2.336
6. Szalmás, A., Bánáti, F., Koroknai, A., László, B., **Fehér, E.**, Salamon, D., Gergely, L., Minárovits, J., Kónya, J.: Lineage-specific silencing of human IL-10 gene expression by promoter methylation in cervical cancer cells.
Eur. J. Cancer. 44 (7), 1030-1038, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2008.02.046>
IF:4.475
7. **Fehér, E.**, Szalmás, A.: Prevalence of Chlamydia trachomatis and Oncogenic Human Papillomavirus Types in Cytologic Atypia of the Uterine Cervix.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 53 (4), 479-487, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/AMicr.53.2006.4.5>



Összesített impakt faktor: 16.301

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 3.095

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

Debrecen, 2012.03.29



AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK JEGYZÉKE

Enikő Fehér, Judit Kiss, Ildikó Tar, Krisztina Szarka. Correlation of HPV prevalence, clinical and patient data in individuals with oral precancerous lesions. 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. 2007. Budapest, Hungary.

Krisztina Szarka, Annamária Szabó, **Enikő Fehér**, Györgyi Szládek, Etelka D. Tóth, Ildikó Márton, Ildikó Tar. Etiological role of HPV and TTV infection in oral carcinogenesis. 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. 2007. Budapest, Hungary.

Krisztina Szarka, **Enikő Fehér**, Melinda Murvai, Tamás Gáll, Etelka D. Tóth, Tamás Major, Tamás Sáy, Ildikó Tar, Lajos Gergely. Possible role of genogroup 1 torque-tenovirus infection in human papillomavirus associated carcinogenesis. Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology. 2008. Keszthely, Hungary.

Krisztina Szarka, **Enikő Fehér**, Tamás Gáll, Etelka D. Tóth, Róbert Boda, Ildikó Márton, Ildikó Tar. Investigations on the role of human papillomaviruses in oral carcinogenesis. Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology. 2008. Keszthely, Hungary.

Enikő Fehér, Gábor Kardos, Attila Nochta, Csilla Péter, Lajos Gergely, Krisztina Szarka. Investigation of the subtype distribution of genogroup 1 torque teno virus in mucosal samples collected from the uterine cervix and the head and neck region. Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology. 2010. Keszthely, Hungary