

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**HUMÁN PAPILLOMAVÍRUS FERTŐZÉS HATÁSA AZ
EPIGENETIKAI ÉS JELÁTVITELI SZABÁLYOZÓ FOLYAMATOKRA
KERATINOCITÁKBAN**

Szalmás Anita

Témavezető: Dr. Kónya József



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2013

HUMÁN PAPILOMAVÍRUS FERTŐZÉS HATÁSA AZ EPIGENETIKAI ÉS JELÁTVITELI SZABÁLYOZÓ FOLYAMATOKRA KERATINOCITÁKBAN

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta:

Szalmás Anita

okleveles biológus (mikrobiológus, ökológus)

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
Mikrobiológia programja keretében

Témavezető: Dr. Kónya József

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Maródi László, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Bíró Sándor, az MTA doktora

Dr. Bányai Krisztián, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja:

2013. június 4. 11 óra, DE OEC Infektológiai és Gyermekeimmunológiai Tanszék

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Deák Judit, Ph.D.

Dr. Lontay Beáta, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Maródi László, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Bíró Sándor, az MTA doktora

Prof. Dr. Deák Judit, Ph.D.

Dr. Bányai Krisztián, Ph.D.

Dr. Lontay Beáta, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja:

2013. június 4. 13 óra, DE OEC Belgyógyászati Intézet A épület tanterme

BEVEZETÉS

A genitális traktus humán papillomavírus (HPV) fertőzése az egyik leggyakoribb szexuális úton terjedő betegség, és az utóbbi évtizedek kutatásai egyértelműen igazolták, hogy a magas onkogén kockázatú HPV típusok által okozott perzisztens fertőzés tekinthető a legfontosabb etiológiai faktornak a méhnyakrák és a rákmegelőző állapotok kialakulásában. Az anogenitális régió HPV fertőzései során tumoros progresszió ritkán következik be, ugyanis az esetek döntő többségében - még tartósan fennálló HPV fertőzés esetében is - a kialakuló hámléziók spontán visszafejlődnek vagy progressziójuk megáll. A HPV fertőzések magas prevalenciája miatt azonban a HPV fertőzéshez köthető tumorok a leggyakoribb malignus folyamatok közé tartoznak, így a *cervix carcinoma* világviszonylatban a nők második leggyakoribb tumoros betegsége, amelyből mintegy 450000 új esetet diagnosztizálnak évente.

A méhnyakrák kialakulásában és progressziójában a vírus jelenlétén kívül számos más tényező is szerepet játszhat. A fertőzött egyén szexuális szokásai, genetikai háttere és immunológiai jellemzői elősegíthetik a vírusfertőzés perzisztálását, valamint a gazdasajtben lejátszódó epigenetikai és jelátviteli regulációs folyamatok a HPV onkoproteinekkal kölcsönhatva elindíthatják vagy felgyorsíthatják a tumoros folyamatot.

Munkacsoportunk egy korábbi tanulmányában a gyulladáshoz vezető folyamatok és a kórokozók elleni immunválasz szabályozásában központi szerepet játszó citokin, az interleukin-10 (IL-10) promotor polimorfizmusának kofaktor szerepét vizsgálta a magas onkogén kockázatú HPV fertőzések iránti fogékonyság illetve a *cervicalis intraepiteliális neoplasiák* kialakulásának kockázata kapcsán. Ismert ugyanis, hogy fiziológiás körülmények között a méhnyak transzformációs zónájában, amely a *cervicalis neoplasiák* kialakulásának leggyakoribb helye, emelkedett IL-10 szint figyelhető meg, amely tovább fokozódik a HPV indukálta hámléváltozásokban. Feltételezések szerint az IL-10 lokálisan képes csökkenteni a sejtes immunválasz hatékonyságát, így elősegítheti a kórokozók túlélését és a perzisztens vírusfertőzés kialakulását. Ezt támasztja alá, hogy a HPV indukálta *cervix carcinomában* az IL-10 fokozott expressziója korrelál az onkológiai progresszióval. Az utóbbi években megjelent közlemények arra utalnak, hogy sem a humán keratinociták és epiteliális sejtek, sem a belőlük származó immortalizálódott sejtvonalak nem képesek IL-10 termelésére, így a méhnyakrákos szövetekben megfigyelt magas IL-10 expresszió valószínűleg a tumoros szövetbe infiltrálódó leukocitákból származik. Ismert, hogy az IL-10 gén aktivitását

befolyásoló transzkripciós faktorok konstitutívan jelen vannak a keratinocitákban illetve epiteliális eredetű sejtekben is, ezért munkánk során először arra kerestük a választ, hogy ezekben a sejtekben az IL-10 expresszió konzervatív hiánya epigenetikai inaktivációs mechanizmusok által valósul-e meg. Vizsgáltuk továbbá azt is, hogy az epiteliális sejtekben befolyásolja-e a magas onkogén kockázatú HPV genom jelenléte ezeket a folyamatokat.

A méhnyakrák és a méhnyak rákmegelőző állapotaink kialakulását elősegítő celluláris tényezők lehetnek azok a jelátviteli molekulák, amelyek a sejtek túlélésében, proliferációjában és migrációjában résztvevő folyamatokat szabályozzák. Jól ismert, hogy a papillomavírusok E6 és E7 onkoproteinjei nem transzkripciós faktorként hatva és a sejtciklusban résztvevő fehérjék génexpresszióját befolyásolva készítetik osztódásra – ezáltal a virális genom replikálására - a gazdasejtet, hanem magukkal a sejtciklust, sejtproliferációt és adhéziót befolyásoló celluláris fehérjékkel képesek kölcsönhatni, így azok aktivitását közvetlenül befolyásolni. A malignus folyamat kialakulásához hozzájárulhat vagy felgyorsíthatja, ha a HPV fertőzés hatására ezeknek a regulátor fehérjéknek a működése abnormálissá válik. A virális onkoproteinek által befolyásolt jelátadó fehérjéknek az azonosítása azért jelentős, mert egyre több ilyen protein aktivitása befolyásolható farmakológiai úton, így a tumoros folyamatok mérsékelhetőek vagy megállíthatóak.

Szolid tumorokban megfigyelték a nem receptor protein tirozin kinázok családjába tartozó Src kinázok emelkedett expresszióját és aktivitását, amely korrelációban állt a tumor előrehaladott állapotával és áttétképző hajlamával. Néhány közelmúltban publikált közlemény emelkedett Src kináz aktivitást írt le méhnyakrák eredetű szövetmintákban is. Megfigyelték továbbá, hogy méhnyakrák eredetű sejtvonalak kezelése az Src kinázok kismolekulájú gátlószereivel csökkentette a sejtek motilitását és invazivitását. Nem ismert azonban az, hogy *cervix carcinoma* eredetű szövetmintákban és sejtvonalakban az Src kinázok a papillomavírus onkoproteinek hatására aktiválódnak-e. Kísérleteink során ezért arra kerestük a választ, hogy a magas onkogén kockázatú HPV-k E6 és E7 fő virális onkoproteinjei hatással vannak-e az epiteliális sejtekben expresszálódó Src kinázok aktivitására.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során a méhnyakrák kialakulásához szükséges perzisztens HPV fertőzést elősegítő kofaktorok közül az immunmodulátor IL-10 termelésének mechanizmusát kívántam tanulmányozni. Céлом volt továbbá az Src családba tartozó citoplazmatikus protein tirozin kinázok aktivációjának vizsgálata, amely hozzájárulhat a HPV fertőzött sejtek malignus fenotípusának kialakításához.

Az epigenetikai regulációs folyamatok szerepének tanulmányozása az IL-10 expresszió gátlásában keratinocitákban és epiteliális sejtekben:

- Az IL-10 promoter metilációs mintázatának és az IL-10 promoterhez asszociálódó hisztonok acetilációs állapotának vizsgálata IL-10 termelésére nem képes keratinocitákban és epiteliális eredetű sejtvonalakban, illetve IL-10 termelő fehérvérsejtekben.
- Magas kockázatú HPV genomi szekvenciák hatásának tanulmányozása az IL-10 promoter CpG metiláció mintázatára illetve a hiszton acetilációra méhnyakrák eredetű epiteliális sejtvonalakban.
- Az IL-10 promoter CpG metiláció és az expressziós aktivitás összefüggésének igazolása *in vitro* modell rendszerben.

A magas kockázatú HPV onkoproteinek hatásának vizsgálata a keratinocitákban expresszálódó citoplazmatikus Src kinázok expressziójára és aktivitására:

- HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatásának vizsgálata az ubiquiter Src kinázok (Src, Yes, Fyn) mRNS és fehérje expressziójára keratinocitákban.
- HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek jelenlétében az Src kinázok aktivitásának (tirozin foszforilált állapotának) vizsgálata keratinocitákban.
- A keratinocita differenciáció hatása az Src kinázok expressziójára és aktivitására.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

mRNS expresszió vizsgálata

Az RNS-t trizol (Tri-Reagent, Sigma-Aldrich) alkalmazásával izoláltuk a sejtekből.

Az IL-10 mRNS expresszió kvalitatív vizsgálatát végeztük egészséges donorok perifériás vénájából vett vérből illetve köldökzsinórból nyert vérből izolált perifériás mononukleáris sejtekben (PBMC), *cervix carcinoma* eredetű sejtvonalakban (HeLa, SiHa, CaSki, HT-3 és C-33A), az *in vitro* transzformált, szövettanilag egészséges bőrből származó keratinocita HaCaT sejtvonalban és primer humán keratinocitákban.

A kontroll LXSNS retrovírus vektorral illetve a HPV 16 E6 vagy E7 illetve mindkét virális onkogénnel transzdukált humán keratinocitákban az Src, Yes és Fyn kinázok mRNS expressziójának mennyiségi vizsgálatát TaqMan valós idejű PCR-rel végeztük az ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Life Technologies) alkalmazásával.

IL-10 promoter CpG metiláció vizsgálata

A PBMC sejtekből, *cervix carcinoma* eredetű sejtvonalakból (HeLa, SiHa, CaSki, HT-3 és C-33A), a keratinocita HaCaT sejtvonalból és primer humán keratinocitákból fenol-kloroformos extrakcióval izoláltuk a genomi DNS-t. A *cervix carcinoma* eredetű szövetmintákból és az exfoliált cervikális epiteliális sejtekből izolált archivált DNS minták munkacsoportunk korábbi vizsgálataiból származtak.

Nátrium-biszulfitos kezelést követően a modifikált DNS szekvenálásához a Frommer és mtsai. által kifejlesztett eljárást alkalmaztuk, amelyet Myöhänen és mtsai. adaptált automata szekvenátorhoz. A nátrium-biszulfittal módosított DNS-ből a proximális IL-10 promoter átfedő szakaszait amplifikáltuk nested PCR alkalmazásával. A nested reakcióhoz használt antiszenz primer biotinnal volt jelölve az 5' végén, a szenz primerek 5' végéhez pedig az M13 univerzális primer 15 nukleotidból álló szakasza volt kapcsolva. A belső („nested”) PCR reakció termékeit streptavidinnel fedett mágneses gyöngyök segítségével tisztítottuk., majd az amplimereket Alfexpress Autoread Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech) segítségével szekvenáltuk a gyártó által megadott protokoll szerint. A szekvenálásnál alkalmazott primerek az M13 univerzális oligonukleotiddal voltak komplementerek.

Az IL-10 promoterhez társuló hisztonok acetilációs állapotának vizsgálata kromatin immunprecipitációval

A kromatin immunprecipitációt a Kuo és Allis (1999) által kidolgozott eljárás alapján végeztük, kisebb módosításokkal.

PBMC, HaCat, HeLa és pHKC sejtekben formaldehides kezeléssel stabilizáltuk a DNS-fehérje keresztkötéseket, majd a sejtizátumok szonikálásával fragmentáltuk a kromatint. A kromatin mintákat anti-acetil-hiszton H3, illetve anti-acetil-hiszton H4 antitestekkel inkubáltuk, és ezt követően a DNS-protein-ellenanyag komplexeket Protein G agaróz gyöngyök alkalmazásával kötöttük ki. A tisztított DNS fragmentumokból az IL-10 promoterspecifikus DNS szakaszok meghatározását SYBR Green valós idejű PCR-rel végeztük. A PCR primereket úgy terveztük meg, hogy az IL-10 promoter olyan 150-250 bázispárnyi szakaszait amplifikálják, amelyek ismert transzkripciós faktor kötőhelyeket tartalmaznak.

Metilációs kazetta assay

A proximális IL-10 promoter 1089 bp és 618 bp hosszúságú szakaszait pGL2 reporter plazmidba (pGL2-Basic Luciferase Reporter Vector, Promega) ligáltuk. A ligálási elegyekkel XL-1 *E. coli* kompetens baktériumokat transzformáltunk, majd a sikeresen transzformált, IL-10 promotert tartalmazó plazmid-konstruktot tartalmazó klónokat a plazmid DNS izolálását követő restrikciós hasításokkal határoztuk meg. A sikeresen transzformált baktérium klónokból nagy mennyiségben izoláltuk a plazmid DNS-t Wizard Plus Midipreps DNA Purification System (Promega) alkalmazásával a gyártó utasításainak megfelelően.

Az IL-10 promoter szakaszokat a pGL2 expressziós vektorokból FastDigest™ *KpnI* és *Bg/III* restrikciós enzimek alkalmazásával kivágtuk, majd az emésztett pGL2 plazmid konstruktok fele mennyiségét *SssI* metiláz enzimmel kezeltük, a hasított minták másik felét enzimmentes elegyben inkubáltuk. Ezt követően preparatív agarózban végzett gélelektroforézissel választottuk el a plazmidból kihasított metilált ill. metilálatlan inzerteket a plazmid vektor DNS-től. Az inzert DNS-t QIAquick Gel Extraction Kit (Promega, USA) segítségével nyertük vissza a gélből a gyártó utasításai szerint. Az agarózból visszanyert, tisztított metilált illetve metilálatlan inzerteket a *KpnI* és *Bg/III* restrikciós endonukleázokkal emésztett, metilálatlan pGL2-Basic plazmidba ligáltuk vissza T4 ligáz enzim alkalmazásával, így az IL-10 promoter szakaszokat metilált illetve metilálatlan állapotban hordozó plazmid konstruktokat hoztunk létre anélkül, hogy a pGL2 vektor metiláltsági állapotát befolyásoltuk volna.

Tranziens transzfekció és luciferáz teszt

Cervix carcinoma eredetű HeLa sejteket transzfektáltunk a metilált, illetve metilálatlan IL-10 promoter szakaszokat tartalmazó pGL2 reporter plazmid konstrukttal Lipofectamine™ 2000 reagens (Invitrogen) alkalmazásával, majd 48 óra múlva vizsgáltuk a promoterek expressziós aktivitását luciferáz teszt alkalmazásával (Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer, Promega).

Western blot

HPV 16 E6, E7 vagy mindkét onkogénnel illetve a kontroll LXSXN vektorral transzdukált proliferáló vagy differenciálódó human keratinocita sejtvonalakból izolált fehérje mintákban vizsgáltuk az Src családba tartozó kinázok (Src, Fyn, Yes) fehérje expresszióját és aktív állapotukat jelző tirozin-foszforilációját.

A fehérjéket vertikális gélelektroforézissel választottuk el SDS-poliakrilamid gélben Bio-Rad Mini Protean II készülék alkalmazásával. Ezt követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk át Bio-Rad transzfer rendszer segítségével. A nitrocellulóz membrán apecifikus kötő helyeinek blokkolására az elsődleges antitestek alkalmazása előtt 3% BSA-t tartalmazó PBST oldatot alkalmaztunk, majd a membránokat inkubáltuk a 3% BSA-t tartalmazó PBST oldatban oldott elsődleges antitestekkel. Mosási lépéseket követően a membránokat inkubáltuk a torna-peroxidázzal jelölt másodlagos antitestekkel. Az immunreakciók detektálását nagy érzékenységgű, kemilumineszcens detektáláson alapuló előhívó oldattal végeztük röntgenfilm alkalmazásával.

Protein foszforiláció vizsgálata

A HPV 16 E6-tal, E7-tel vagy mindkét onkogénnel illetve a kontroll LXSXN vektorral transzdukált keratinocitákban az Src kináz család tagjainak egyedi foszforilációs állapotának vizsgálatára a Human Phospho-Kinase Array Kit-et (Proteome Profiler Array, R&D Systems) alkalmaztuk. Az immunreakciók kimutatását kemilumineszcens detektáláson alapuló előhívó oldattal végeztük röntgenfilm alkalmazásával. A foszfokináz array eredményeinek kiértékeléséhez denzitometriával határoztuk meg a spot denzitásokat (NIH ImageJ software, version 1.46). Egy mérési sorozaton belül az üres üres LXSXN vektort hordozó sejtvonalban két párhuzamosban mért denzitás értékek átlagát vettük viszonyítási alapként.

EREDMÉNYEK

AZ IL-10 EXPRESSZIÓ EPIGENETIKAI GÁTLÁSÁNAK VIZSGÁLATA HUMÁN KERATINOCITÁKBAN ÉS EPITELIÁLIS SEJTEKBEN

Az IL-10 promoter CpG metilációs mintázatának és az IL-10 mRNS expresszió összefüggésének vizsgálata epiteliális illetve limfocita eredetű humán sejtvonalakban

Az IL-10 promoter proximális szakaszának CpG metilációs mintázatát nátrium-biszulfitos modifikálást követő DNS szekvenálással vizsgáltuk limfoid (PBMC), keratinocita (pHKC, HaCaT) valamint méhnyakrák eredetű epiteliális (C-33A, HT-3, CaSki, HeLa, SiHa) sejtekben.

Az általunk tanulmányozott promoter szakaszon nyolc CpG dinukleotid található. A szekvenási eredmények szerint a PBMC sejtekben a proximális promoter szakasz teljesen metilálatlan volt, míg a keratinocita és epiteliális sejtekben metiláltak bizonyult. IL-10 mRNS-t csak a PBMC sejtekben tudtunk detektálni.

A vizsgált méhnyakrák eredetű sejtvonalak közül a HeLa HPV 18, a SiHa és a CaSki HPV 16 genomokat hordoznak eltérő kópiaszámokban. A magas onkogén kockázatú HPV genomi szekvenciák jelenléte azonban nem volt hatással sem a proximális IL-10 promoter metilációs mintázatára sem az IL-10 gén expressziós aktivitására ezekben a sejtekben.

A proximális IL-10 promoter CpG metilációs mintázatának vizsgálata egészséges exfoliált cervikális epiteliális sejtekben és méhnyakrák eredetű szövetmintákban

A sejtvonalak vizsgálata során megfigyelt metilációs mintázatok azt mutatták, hogy az IL-10 promoterben a két legproximálisabban elhelyezkedő (-185 és -110) CpG dinukleotid metilációs állapota tér el a legmarkánsabban az IL-10 termelő és nem termelő sejttípusok között. Annak igazolására, hogy a metilációs mintázatban tapasztalt különbségek nem az epiteliális sejtvonalak tenyésztése során indukálódtak, egészséges exfoliált cervikális epiteliális sejtekben (n=3) és *cervix carcinoma* szövetmintákban (n=10) is meghatároztuk a -185 és -110 CpG dinukleotidok metiláltságának mértékét. A -110 CpG teljesen metiláltak bizonyult az egészséges és a méhnyakrák eredetű betegmintákban. A -185 CpG szintén nagy mértékben (75-100%) metilált volt a klinikai mintákban, azonban csak részleges metilációt (50-75%) tapasztaltunk 2 *cervix carcinoma* biopsziában.

IL-10 promoter szakaszok *in vitro* CpG metilációjának hatása a promoter expressziós aktivitására

A teljes proximális IL-10 promotert, illetve az IL-10 promoter legproximálisabb 600 bp szakaszát hordozó reporter plazmid konstruktokat hoztunk létre, amelyek segítségével *in vitro* tanulmányozhattuk a CpG metiláció hatását az IL-10 promoter szakaszok transzkripció aktivitására. Annak érdekében, hogy a plazmid vektor szekvenciájában található CpG dinukleotidok metilációjának hatását a promoteraktivitásra kizárhassuk, úgynevezett metilációs kazetta esszét végeztünk. Ennek során több lépésben, emésztési, metilálási és ligálási reakciók segítségével metilált és metilálatlan IL-10 promoter szakaszokat tartalmazó plazmid konstruktokat hoztunk létre anélkül, hogy a vektor metiláltsági állapotát befolyásoltuk volna. A plazmid konstruktokkal cervix carcinoma eredetű, epiteliális HeLa sejtek tranziens transzfekcióját végeztük majd 48 óra múlva mértük a sejt-lizátumok luciferáz aktivitását.

Eredményeink szerint a metilált IL-10 promotert hordozó plazmidok luciferáz aktivitása, tehát a metilált promoterek expressziós aktivitása lényegesen kisebb volt, mint a metilálatlan IL-10 promotert hordozóké.

Az IL-10 promoterhez társuló hiszton fehérjék acetilációs állapotának vizsgálata

Annak megállapítására, hogy az IL-10 promoter az aktív eukromatinban vagy az inaktív heterokromatinban helyezkedik-e el kromatin immunprecipitációt végeztünk PBMC, HaCaT, HeLa és pHKC sejtekből acetilált H3 és acetilált H4 specifikus antitestek segítségével. Az immunprecipitátumból az IL-10 promoterre specifikus DNS szekvenciák kimutatása és kvantifikálása valós idejű PCR alkalmazásával történt, amelynek során a proximális IL-10 promoter két kitüntetett – ismert transzkripció faktor kötőhelyeket tartalmazó - szakaszát amplifikáltuk. A promoter -639 / -531 szakaszát amplifikáló első primerpár az Sp1 kötőhelyet tartalmazó régiót szaporította fel. A második primerpár a promoter STAT3 kötőhelyet hordozó -233 / -70 fragmentumát szaporította fel. Mindkét primerpár segítségével azt az eredményt kaptuk, hogy a vizsgált promoter szakaszok a PBMC sejtekben társulnak acetilált hiszton proteinekhez, amelyek a transzkripció szempontjából aktív eukromatinra jellemző állapotúak. Ezzel szemben a HaCaT, HeLa és pHKC sejtekben a vizsgált promoter szakaszok nem társultak acetilált hiszton fehérjékhez, tehát feltételezhetően a transzkripciósan inaktív heterokromatinban helyezkednek el.

HPV 16 ONKOPROTEINEK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA AZ SRC CSALÁDBA TARTOZÓ KINÁZOK EXPRESSZIÓJÁRA ÉS AKTIVITÁSÁRA HUMÁN KERATIONOCITÁKBAN

A HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatása az Src kinázok fehérje expressziójára

Kíséleteinkhez HPV 16 E6, E7 vagy mindkét onkoproteint expresszáló humán keratinocita sejtvonalakat használtunk, amelyeket először a sejtproliferációt elősegítő szérumentes tápfolyadékban tenyésztettünk. A sejtvonalakban a funkcionálisan aktív E6 és E7 fehérjék expresszióját azok legfontosabb célfehérjéinek, a tumorszupresszor p53 és Rb proteineknek csökkent szintje mutatta, amelyet Western blot vizsgálattal igazoltunk. Ezt követően először Western blot módszerrel tanulmányoztuk a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek egyedi illetve együttes hatását a keratinocitákban expresszálódó Src családba tartozó kinázok (Src, Yes, Fyn) fehérje expressziójára. Proliferáló keratinocitákban azt tapasztaltuk, hogy az E6 és E7 együttes jelenlétében az Src és Yes proteinek expressziója szignifikánsan emelkedett az LXSNI vektort vagy csak az egyik onkoproteint expresszáló sejtvonalakhoz viszonyítva. Ezzel szemben a Fyn fehérje konstitutívan nagy mennyiségben volt jelen a tanulmányozott sejtvonalakban és a HPV 16 onkoproteinek jelenléte sem befolyásolta expresszióját a keratinocitákban. Az Src családba tartozó kinázok katalitikus alegységében található aktivációs hurok tirozin-foszforilációját felismerő és ezáltal az aktív állapotú enzimekre specifikus antitesttel emelkedett Src kináz foszforilációt detektáltunk az E7 onkoprotein jelenlétében.

A HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatása az Src kinázok mRNS expressziójára

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az Src kinázok fokozott mRNS expressziója okozza-e az immunblot vizsgálatok során tapasztalt emelkedett Src és Fyn fehérje expressziót a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek együttes jelenlétében. A kvantitatív TaqMan valós idejű PCR vizsgálatok azonban arra az eredményre vezettek, hogy nem a transzkripció aktivitás változása áll a tapasztalt magasabb fehérje mennyiségek mögött. A HPV 16 onkoproteinek jelenléte nem befolyásolta szignifikánsan egyik Src családba tartozó kináz (Src, Fyn, Yes) gén mRNS expresszióját sem, függetlenül attól, hogy alacsony (Src, Yes) vagy nagyobb (Fyn) mennyiségben mutathatóak ki fehérjeként.

A HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatása az egyes Src kinázok foszforilációs állapotára

Mivel a western blot vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a HPV 16 E7 onkoproteinjének jelenlétében megemelkedett az aktivációs hurokban elhelyezkedő tirozinon foszforilált Src kinázok mennyisége, következő lépésként humán foszfo-kináz array alkalmazásával határoztuk meg ezen kináz-család tagjainak egyedi foszforilációs állapotát a HPV 16 onkoproteinek jelenlétében. Az E7 onkoprotein hatására az Src, Yes és Fyn foszforilációja szignifikánsan megemelkedett, míg az E6 nem volt hatással ezen fehérjék tirozin foszforilációjára az aktivációs hurokban.

A keratinociták differenciálódásának a hatása az Src kinázok aktivitására HPV 16 onkoproteinek expresszálo sejtvonalakban

A többrétegű hámban a HPV-k gazdasejtjeiként szolgáló keratinociták sorsa a differenciálódás, amely során a sejtosztódás leáll és a kromatinállomány fokozatosan eltűnik. Ezt a folyamatot zavarják meg a HPV E6 és E7 onkoproteinek, amelyek a vírus szaporodása érdekében osztódásra készítetik a sejteket. Megvizsgáltuk ezért, hogy változik-e a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatása az Src kinázok fehérje és mRNS expressziójára differenciálódó sejtekben. A sejteket a differenciálódás elősegítéséhez 1,8 mM kalciummal és 10% borjúsérummal kiegészített DMEM tápfolyadékban tenyésztettük. A proliferáló sejtekben tapasztaltnal megegyezően szignifikánsan magasabb Src fehérje mennyiséget detektáltunk a differenciálódó sejtekben a két HPV 16 onkoprotein együttes jelenlétében, azonban a differenciálódó keratinocitákban az Src fehérje expressziójának megemelkedéséhez az E7 onkoprotein jelenléte már önmagában is elegendő volt. Az Src mRNS expresszióra nem volt hatása sem a HPV onkogének jelenlétének, sem a sejt differenciációnak. Ezzel szemben a differenciáció minden sejtvonalon egyöntetűen magas Yes fehérje expressziót eredményezett, amelyre már nem volt hatással a HPV 16 onkoproteinek jelenléte. A valós idejű PCR vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a Yes expresszió emelkedésének a háttérében a differenciálódás hatására szignifikánsan megnövekedett mRNS transzkripció áll, amely az E6 jelenlétében volt a legkifejezettebb. A proliferáló keratinocitákhoz hasonlóan a differenciálódó sejtvonalakban is nagymértékű, a HPV onkoproteinek által nem befolyásolt Fyn fehérje expressziót mutattunk ki. A Fyn mRNS expressziót a sejtek differenciálódása szignifikánsan növelte, és a HPV 16 onkoproteinek nem befolyásolták. A proliferáló keratinocitákhoz megegyezően a differenciálódó sejtvonalakban is az E7 onkoprotein jelenlétében tapasztaltunk Src kinázok foszforilációt.

MEGBESZÉLÉS

Az onkogén HPV típusok okozta tartósan fennálló fertőzés a méhnyakrák több lépésből álló patomechanizmusának kezdő és fenntartó lépése. A fertőzött hámszövetben a kórokozók elleni immunválasz hatékonyságát csökkentő citokinek termelődése elősegítheti a perzisztens HPV fertőzés kialakulását, következetesen szignifikánsan növelve a magas fokú *cervicalis dysplasia* és a tumoros folyamat kifejlődésének esélyét. Cervix carcinomában és rákmegelőző állapotokban az antiinflammatorikus és immunmodulátor IL-10 szint lokális emelkedését figyelték meg. Az IL-10 immunszuppresszív tulajdonsága elősegíti egyes neopláziák kialakulását, ugyanis hatására a tumoros sejtek elkerülhetik, hogy a sejtes immunválasz effektor sejtjei felismerjék őket. Fontos megemlíteni, hogy a tumor mikro környezetének emelkedett IL-10 szintje származhat a tumorba infiltrálódó leukocitáktól. A magas kockázatú HPV 16 fertőzéshez asszociálódó tumorigenezis egérmodelljében megfigyelték, hogy a tumorba infiltráló makrofágok IL-10-et szekretálnak és regulátor T sejt fenotípus kialakulását indukálják, ami az immuntoleranciának és így a malignus progresszióknak kedvez. A méhnyak transzformációs zónájában, amely a *cervicalis neoplasiák* kialakulásának leggyakoribb helye, fiziológiásan is az IL-10 konstitutív expressziója mutatható ki. *Cervix carcinomás* elváltozásokból vett biopsziás szövetmintákban az IL-10 szekréció tovább fokozódik. Megfigyelések szerint azonban a *cervix carcinoma* eredetű immortalizálódott sejtvonalak nem képesek az IL-10 termelésére annak ellenére, hogy ezen citokin transzkripcióját szabályozó legfontosabb transzkripciós faktorokat ezek a sejtek is expresszálják. Hipotézisünk szerint ezért az IL-10 expresszió konzervatív hiánya az emberi keratinocitákban és epiteliális sejtekben epigenetikai inaktivációs folyamatokra utal és cervix carcinomában nem a neoplasztikus sejtek az IL-10 termelői.

A génextpresszió szabályozásában alapvető szerepet játszó epigenetikai regulációs folyamatok tanulmányozása választ adhat arra a kérdésre, hogy miért sejtvonal-specifikus egyes citokinek termelődése. Az utóbbi években bebizonyosodott, hogy a promoter szakaszok CpG metilációja több citokin gén (például IL-2, IL-4, IFN- γ) expresszióját képes befolyásolni. Megjegyezendő, hogy a sejtvonal-specifikusan termelődő citokinek promoter régiójában kevés CpG szekvencia található, ezért feltételezések szerint azon metil-citozinok fognak kihatni a promoter aktivitásra, amelyek az aktiváló transzkripciós faktorok kötőhelyein helyezkednek el.

Munkánk során az IL-10 promoter proximális szakaszának metilációs mintázatát keratinocita (pHKC, HaCaT) és *cervix carcinoma* eredetű epiteliális (C-33A, HeLa, HT-3,

CaSki, SiHa) sejtvonalakban, exfoliált egészséges cervikális epiteliális sejtekben, illetve perifériás vérből származó és köldökzsinór vénából vett PBMC sejtekben. Az IL-10 expressziójára képes PBMC sejtekben a vizsgált promoter metilátlannak bizonyult, ellenben az IL-10-et nem termelő keratinocita és epiteliális sejtvonalakban metilált profilt mutatott. A szekvenálási eredmények jól illeszkedtek az RT-PCR eredményekhez, ugyanis IL-10 mRNS expressziót csak a PBMC sejtekben detektáltunk. A sejtvonalak vizsgálata során megfigyelt metilációs mintázatok azt mutatták, hogy az IL-10 promoterben a két legproximálisabban elhelyezkedő CpG dinukleotid metilációs állapota tér el a legmarkánsabban az IL-10 termelő és nem termelő sejtípusok között.

A metilált DNS szakaszok befolyásolhatják a kromatin állapotát azáltal, hogy hiszton deacetilázok kötésével a környezetükben elhelyezkedő H3 és H4 fehérjék deacetilálódását okozzák, így kompakt kromatinszerkezetet alakítanak ki, amely szintén gátolhatja a transzkripció faktorok kötődését. Következő lépésként ezért azt vizsgáltuk, hogy az egyes sejtípusokban milyen az IL-10 promoterhez társuló kromatin állapota, pontosabban kimutatható-e acetilált H3 és H4 hisztonok jelenléte a proximális promoter szakasz mellett. Az acetilált hisztonok (különösen az acetilált H3) a transzkripcióban aktív eukromatinra jellemzőek, ugyanis elektrosztatikus taszító hatásuk miatt lazább kromatin szerkezetet hoznak létre, így a promoter szakaszok illetve egyéb szabályozó szekvenciák hozzáférhetővé válnak a transzkripció faktorok számára. Acetilált H3 és acetilált H4 fehérjék elleni antitestek alkalmazásával kromatin immunprecipitációt végeztünk PBMC, HaCaT, HeLa és pHKC sejtekből izolált kromatinból. Ezt követően az immunprecipitátumokból DNS-t izoláltunk és valós idejű PCR segítségével IL-10 promoterre specifikus szekvenciákat amplifikáltunk. Eredményeink szerint egyedül a PBMC sejtekből izolált kromatinban társult az IL-10 promoter általunk vizsgált szakasza acetilált hiszton fehérjékhez. A kromatin immunprecipitáció eredményei így szintén arra utalnak, hogy a keratinocita és epiteliális sejtekben az IL-10 promoter a transzkripció szempontjából inaktív heterokromatinban található, környezetében a hiszton fehérjék nem acetiláltak.

A promoter metiláció szerepét az IL-10 expresszió gátlásában sikerült alátámasztanunk egy *in vitro* funkcionális teszt alkalmazásával. Cervix carcinoma eredetű, epiteliális HeLa sejteket transziensen transzfektálva az IL-10 promoter proximális szakaszait metilátlatlan illetve metilált állapotban tartalmazó reporter plazmid konstrukciókkal igazoltuk, hogy a metilált IL-10 promoter szakaszok expressziós aktivitása szignifikánsan kisebb a metilátlatlanokénál. Megjegyzendő, hogy mivel az epiteliális eredetű HeLa sejtvonalonban kifejeződött a metilátlatlan IL-10 promoter, az epiteliális leszármazási vonalba tartozó

sejtekben valóban jelen vannak aktív állapotban az IL-10 gén transzkripciójához szükséges transzkripciós faktorok.

A magas onkogén kockázatú HPV típusok közül a HPV 16 a leggyakoribb genitális HPV típus, amelyet invazív méhnyakrákból és a rákmegelőző elváltozások mintegy feléből detektálnak. A fertőzött hámsejtek immortalizációjáért elsősorban HPV 16 E6 és E7 onkoproteinjei felelősek. Ezen proteinek akkor expresszálódnak nagymértékben, ha a tartósan fennálló HPV infekció során a virális DNS a gazdasejt genomjába integrálódik. Az E7 fehérje legfontosabb szerepe, hogy a hipofoszforilált retinoblasztóma fehérje (pRb) megkötésével és lebontásának elősegítésével aktiválja a sejtciklust, a sejtek a G0/G1 stádiumból a sejtosztódás S fázisába lépnek. Az E6 onkoprotein a p53 tumorszuppresszor fehérjének képes az ubiquitin-függő lebontását kiváltani a 26S proteozóma-komplexein keresztül, így akadályozva meg az abnormálisan osztódó sejtek apoptózisát. Az E6 és E7 virális onkoproteinek kölcsönhatnak számos egyéb celluláris proteinnel is, úgymint tumor szuppresszor fehérjékkel, transzkripciós faktorokkal és koaktivátorokkal, sejt polaritást és növekedést szabályzó fehérjékkel, amelyek megváltozott aktivitása szintén hozzájárulhat a tumoros folyamat kialakulásához és progressziójához.

Számos tumorhoz hasonlóan az Src családba tartozó citoplazmatikus protein tirozin kinázok közé tartozó Src emelkedett aktivitását mutatták ki méhnyakrákos szövetekből. Ezen kináz családban a Src-on kívül még további két kináz, Yes és Fyn, expresszálódik ubiquiter módon, így a többrétegű laphám epiteliális sejteiben is. Ez utóbbi két kináz expresszióját és aktivitását még nem tanulmányozták méhnyakrákban, azonban emelkedett aktivitásukat detektálták egyéb malignus folyamatokban.

A méhnyak daganatos elváltozásainak kialakulásához és progressziójához - más malignus elváltozásoktól eltérően - exogén HPV onkoproteinek hatása szükséges. Tekintettel a papillomavírusok kulcsfontosságú szerepére a cervikális neopláziák kialakulásában, a keratinociták képességére az ubiquiter celluláris Src kinázok (Src, Yes, Fyn) expressziójára, valamint a korábban megfigyelt Src aktivációra méhnyakrák eredetű sejtvonalakban (SiHa, HeLa) és hámelváltozásokban azt feltételeztük, hogy ezen kinázok aktivitása és a HPV onkoproteinek között kapcsolat lehetséges.

Kísérleteink során ezért a magas kockázatú HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatását tanulmányoztuk keratinocitákban az Src kinázok expressziójára és aktivitására. Proliferáló illetve differenciálódó sejtekben a Western blottal meghatározott Src, Yes és Fyn fehérjék mennyisége heterogén módon változott a HPV 16 onkoproteinek hatására: proliferáló

sejtekben az Src és Yes fehérjék mennyiségének szignifikáns növekedését mutattuk ki mindkét HPV 16 onkoprotein jelenlétében, míg differenciálódó sejtekben az E7 jelenléte elegendő volt az emelkedett Src fehérje expresszió kiváltásához. Ezzel szemben sejtdifferenciáció a Yes fehérje mennyiségének egyöntetű, a papillomavírus onkoproteinek jelenlététől független növekedését eredményezte. Az immunblot vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a Fyn fehérje expressziójára nincsenek hatással a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek sem proliferáló, sem differenciálódó keratinocitákban. Megjegyzendő, hogy nem sikerült az mRNA expreszió megváltozott aktivitását kimutatnunk az egyes kinázok fehérje mennyiségeiben tapasztalt változások okaként, így feltételezhetően a HPV onkoproteinek poszttranszkripciós mechanizmusok útján hatnak ezen fehérjék expressziójára.

További vizsgálataink során kimutattuk, hogy a HPV 16 E7 jelenléte a keratinocitákban expresszálódó Src kinázok katalitikusan aktív (az aktivációs hurokban elhelyezkedő tirozinon foszforilált) állapotát váltotta ki. Mindezek az adatok arra utalnak, hogy a HPV 16 E7 – a HPV 16 E6 segítségével – kettős hatással bírhat az Src kinázokra keratinocitákban: aktiválhatja a konstitutívan expresszálódó Fyn kinázt illetve növelheti a Src és Yes kinázok fehérje expresszióját majd aktív állapotukat idézheti elő.

Annak a kérdésnek a megválaszolásához, hogy a magas kockázatú papillomavírusok onkoprotei milyen módon eredményezik az Src kinázok fehérje koncentrációjában és aktivitásában megfigyelt változásokat, további vizsgálatok szükségesek. Megjegyzendő azonban, hogy az általunk használt homogén sejtenyészetekben nagyobb valószínűséggel állhat intracelluláris folyamat, mint ligandkötődést igénylő extracelluláris eredetű jelátviteli folyamat az Src kinázok expressziójának és aktivációjának megváltozása mögött.

Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy vizsgálataink során olyan mechanizmust sikerült elsőként azonosítanunk, amely hozzájárulhat az onkogén HPV típusok által kiváltott tumorokban a gazdasejtek malignus fenotípusának kialakításához.

ÖSSZEFOGLALÁS

A magas onkogén kockázatú humán papillomavírus (HPV) fertőzéshez társuló malignus folyamatokat elősegítő kofaktorok közül munkám során az immunmodulátor IL-10 termelésének mechanizmusát valamint az Src családba tartozó citoplazmatikus protein tirozin kinázok aktivációját vizsgáltam.

Eredményeink az alábbiak szerint foglalhatóak össze:

- Keratinocitákban és méhnyaki eredetű hámsejtekben az IL-10 promotert sejtvonal-specifikus epigenetikai szabályozó folyamatok tartják inaktív állapotban.
- Az IL-10 promoter proximális szakaszának CpG metilációját és ezen promoter szakasz mentén az acetilált hisztonok hiányát mutattuk ki az IL-10 transzkripciót akadályozó alapvető tényezőként primer humán keratinocitákban, immortalizált humán keratinocita sejtvonalban és méhnyakrák eredetű epiteliális sejtvonalakban.
- A magas onkogén kockázatú HPV genomok jelenlététől függetlenül az IL-10 expressziót gátló epigenetikai mechanizmusok egységesen fenntartódtak a keratinocitákban és méhnyakrák eredetű epiteliális sejtvonalakban.

Eredményeink tehát azt támasztják alá, hogy a méhnyakrákban illetve a méhnyak rákmegelőző elváltozásaiban tapasztalt lokálisan emelkedett IL-10 szekréció nem hámsejt eredetű.

- A HPV 16 onkoproteinek proszttranszkripciós mechanizmusok útján képesek az Src és Yes kinázok fehérje expresszióját növelni.
- A HPV 16 E7 jelenléte kiváltja a keratinociták által termelt mindhárom Src családba tartozó citoplazmatikus kináz (Src, Yes, Fyn) katalitikusan aktív állapotát okozó tirozin-foszforilációját.

Eredményeink szerint a HPV E6 és E7 onkoproteinek hatással vannak az Src kinázok expressziójára és aktivitására a gazdasejtjeikként szolgáló keratinocitákban, amely hozzájárulhat a malignus folyamatok kiváltásához vagy fenntartásához a HPV fertőzésekhez társuló tumorok kialakulása során.

Iktatószám: DEENKÉTK/111/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Szalmás Anita

Neptun kód: FDMG0K

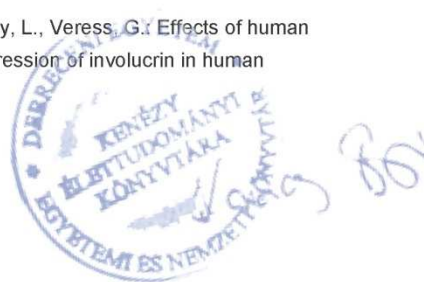
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. 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.
Virologica J. 10 (1), 79, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-10-79>
IF:2.343 (2011)
2. 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

További Közlemények

3. 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.
Virologica J. 9, 36, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-9-36>
IF:2.343 (2011)



4. Hernádi K., **Szalmás A.**, Mogyorósi R., Czompa L., Veress G., Csoma E., Márton I., Kónya J.:
Herpeszvírusok előfordulása humán periodontitis apicalis mintákban.
Fogorv. Szle. 105 (4), 135-140, 2012.
5. 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
6. Karosi, T., Csomor, P., **Szalmás, A.**, Kónya, J., Petkó, M., Sziklai, I.: Osteoprotegerin expression and sensitivity in otosclerosis with different histological activity.
Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryn. 268 (3), 357-365, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-010-1404-y>
IF:1.287
7. Csomor P., **Szalmás A.**, Kónya J., Karosi T., Sziklai I.: Az otosclerosisra jellemző CD46 variánsok molekuláris biológiai jellemzése.
Fül-Orr-Gégegyógy. 56 (1), 221-230, 2010.
8. Csomor, P., **Szalmás, A.**, Kónya, J., Sziklai, I., Karosi, T.: Restriction analysis of otosclerosis-associated CD46 splicing variants.
Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 267 (2), 219-226, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-009-1042-4>
IF:1.214
9. Hernádi, K., **Szalmás, A.**, Mogyorósi, R., Czompa, L., Veress, G., Csoma, E., Márton, I., Kónya, J.:
Prevalence and Activity of Epstein-Barr Virus and Human Cytomegalovirus in Symptomatic and Asymptomatic Apical Periodontitis Lesions.
J. Endod. 36 (9), 1485-1489, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2010.06.008>
IF:3.291
10. **Szalmás, A.**, Kónya, J., Sziklai, I., Karosi, T.: Detection and identification of CD46 splicing isoforms by nested RT-PCR.
Methods Mol. Biol. 630 (1), 83-95, 2010.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-629-0_6
11. Karosi T., Csomor P., **Szalmás A.**, Kónya J., Z. Szabó L., Lektor B., Petkó M., Pytel J., Jóri J., Sziklai I.: Új, otosclerosis-specifikus CD46 variánsok: Az otosclerosisos csontátépülés genetikai alapja?
Fül-Orr-Gégegyógy. 55 (1), 17-27, 2009.

12. Szalmás, A., Kónya, J.: Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis.
Semin. Cancer Biol. 19 (3), 144-152, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.02.011>
IF:6.918
13. Karosi, T., Szalmás, A., Csomor, P., Kónya, J., Petkó, M., Sziklai, I.: Disease-associated novel CD46 splicing variants and pathologic bone remodeling in otosclerosis.
Laryngoscope. 118 (9), 1669-1676, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MLG.0b013e31817c133d>
IF:1.877
14. 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>
15. Karosi T., Jókay I., Kónya J., Z. Szabó L., Pytel J., Jóri J., Szalmás A., Sziklai I.: Az otosclerosis csontátépülés molekuláris háttere.
Fül-Orr-Gégyógy. 52 (2), 176-183, 2006.
16. Karosi, T., Jókay, I., Kónya, J., Z. Szabó, L., Pytel, J., Jóri, J., Szalmás, A., Sziklai, I.: Detection of Osteoprotegerin and TNF-alpha mRNA in Ankylotic Stapes Footplates in Connection With Measles Virus Positivity.
Laryngoscope. 116 (8), 1427-1433, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/01.mlg.0000225928.35838.e5>
IF:1.736
17. Karosi T., Kónya J., Petkó M., Z. Szabó L., Pytel J., Jóri J., Szalmás A., Sziklai I.: A kanyaróvírus és a tumor nekrosis faktor-alfa mRNS együttes expressziója otosclerosis stapes talpakban.
Fül-, Orr-, Gégyógy. 51 (3), 134-140, 2005.
18. Karosi, T., Kónya, J., Z. Szabó, L., Pytel, J., Jóri, J., Szalmás, A., Sziklai, I.: Codetection of Measles Virus and Tumor Necrosis Factor-Alpha mRNA in Otosclerotic Stapes Footplates.
Laryngoscope. 115 (7), 1291-1297, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/01.MLG.0000165462.35495.DF>
IF:1.617



19. Szőke, K., **Szalmás, A.**, Szládek, G., Veress, G., Gergely, L., Tóth, F.D., Kónya, J.: IL-10 Promoter nt-1082A/G Polymorphism and Human Papillomavirus Infection in Cytologic Abnormalities of the Uterine Cervix.
J. Interferon Cytokine Res. 24 (4), 245-251, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/107999004323034114>
IF:2.593

20. Szabó, K., **Szalmás, A.**, Liker, A., Barta, Z.: Effects of haematophagous mites on nestling house sparrows (*Passer domesticus*).
Acta Parasitolog. 47 (4), 318-322, 2002.
IF:0.732

Összesített impakt faktor: 31.883

Összesített impakt faktor: (értekezés alapján szolgáló közlemények esetén): 6.818

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

Debrecen, 2013.03.20



AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK JEGYZÉKE

Szalmás A, Gyöngyösi E, Ferenczi A, Veress G, Kónya J. Src családba tartozó kinázok aktivációja a humán papillomavírus 16 E7 onkoprotein hatására. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi Nagygyűlése, Keszthely 2012.

Laszló B, Fehér E, Kónya J, **Szalmás A**. Methylation cassette assay testing for inactivation of human IL-10 proximal promoter. 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, July 18-20, 2007, Budapest, Hungary

Szalmás A, Bánáti F, Koroknai A, Salamon D, Fehér E., Minárovits J, Gergely L, Kónya J. Promoter methylation and chromatin structure in the regulation of human interleukin-10 gene expression. 1st Central European Forum for Microbiology, October 26-28, 2005; Keszthely, Hungary

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ POSZTEREK LISTÁJA

Szalmás A, Bánáti F, Koroknai A, Salamon D, Veress G, Minárovits J, Gergely L, Kónya J. Interleukin-10 Promoter Methylation in Human Papillomavirus Infected and Non-infected Human Keratinocyte Cell Lines. 22nd International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop, April 30 – May 6, 2005; Vancouver, Canada

Szalmás A, Bánáti F, Koroknai A, Salamon D, Veress G, Minárovits J, Gergely L, Kónya J. Interleukin-10 promoter methylation and HPV infection in cervical carcinoma cell lines. Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology. October 7-9, 2004, Keszthely, Hungary