

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**HUMÁN PAPILOMAVÍRUS 16 E6 ÉS E7 ONKOPROTEINEK HATÁSA A
KERATINOCITÁK DIFFERENCIÁLÓDÁSÁBAN RÉSZTVEVŐ GÉNEK
TRANSZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁSÁRA**

Oraveczné Gyöngyösi Eszter

Témavezető: Dr. Veress György



DEBRECENI EGYETEM

Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2015

**HUMÁN PAPILOMAVÍRUS 16 E6 ÉS E7 ONKOPROTEINEK HATÁSA A
KERATINOCITÁK DIFFERENCIÁLÓDÁSÁBAN RÉSZTVEVŐ GÉNEK
TRANSZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁSÁRA**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: **Oraveczné Gyöngyösi Eszter**
okleveles molekuláris biológus (mikrobiológus)

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Mikrobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Veress György, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

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

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Gyógyszerhatástani Tanszék
2014. október 6. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Deák Judit, PhD
Dr. Benkő Szilvia, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tótsaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Bíró Sándor, az MTA doktora
Prof. Dr. Minárovits János, az MTA doktora
Prof. Dr. Deák Judit, PhD
Dr. Benkő Szilvia, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”
épület tanterem
2015. június 11. 13 óra

BEVEZETÉS

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

A HPV-k kb. 8 kbp hosszúságú, cirkuláris, kettős szálú DNS genomot tartalmaznak. A virionok kb. 55 nm nagyságúak, burokkal nem rendelkeznek. Genomjuk korai (early, E1-E7), késői (late, L1-2) és szabályozó régióra (long control region, LCR) osztható. A *Papillomaviridae* családba tartozó vírusoknak több mint 170 típusát írták már le eddig, és folyamatosan identifikálják az újabb típusokat.

A HPV-k a többrétegű hám bazális sejtjeit fertőzik, tropizmusuk alapján kután ill. mukozális típusokat írtak le. A kután típusok (HPV 1, 2, 3, 10) okozzák a közönséges szemölcsöket, ill. néhány típus az epidermodysplasia verruciformis örökletes betegségben, okoz elváltozásokat (HPV 5, 8). A nyálkahártyákat fertőző típusok között pedig megkülönböztetünk alacsony és magas onkogén kockázatú (low- és high-risk) típusokat. Az alacsony kockázatú típusok (HPV 6, 11, 42) benignus elváltozásokban és enyhe cervicalis dysplasiákban fordulnak elő. A HPV 16, 18 és egyéb magas kockázatú onkogén típusok (HPV 31, 33, 35 stb.) súlyos fokú cervikális intraepitheliális neopláziákban (CIN) és invazív karcinómákban mutathatók ki nagy százalékban.

Ismert, hogy a vírus E6 és E7 onkoproteinjei felelősek a magas onkogén kockázatú HPV típusok transzformáló képességéért. A magas kockázatú típusok E6 onkoproteinje képes a p53 tumorszuppresszor degradációjára az ubikvitin-proteaszóma útvonalon keresztül. Az E7 onkogén pedig a retinoblasztóma proteint (pRB) inaktíválja, amely így nem köti tovább az E2F faktort, és ezzel részt vesz a sejtciklus beindításában. A két onkoprotein ezen kívül számos más virális és celluláris faktort szabályoz.

A többrétegű hám legnagyobb mennyiségben jelenlévő strukturális komponense a keratinocita. A bazális sejtek osztódása után, az utódsejtek a hám felsőbb rétegeibe lépve jelentős morfológiai és biokémiai változáson mennek át. A differenciálódás során a folyamathoz köthető gének (involukrin (IVL), lorikrin (LOR), keratinok (KRT), transzglutaminázok (TGM), S100A kalciumkötő fehérjék (S100A), small prolin-rich

proteinek (SPRR) és dezmoszomális proteinek: dezmozokollin (DSC), dezmozoglein (DSG)) aktivitása megnő, és számos strukturális protein szintetizálódik. A folyamat időben és térben szigorúan szabályozott, végeredménye a bőr elhalt rétege, a stratum corneum.

A vírus életciklusa szoros kapcsolatban van a gazdasejt érési folyamataival. A vírus a többrétegű hám bazális sejtjeihez mikrosérüléseken keresztül jut el, ahol a vírusgenom alacsony szintű a replikációja, és a korai gének, többek között az E6 és E7 onkogének expressziója történik. A hámréteg felsőbb részeiben a sejtek kilépnek a sejtciklusból, azonban a fertőzött keratinocitákban a HPV onkoproteinjeinek hatására a sejtciklus aktív marad. A késői gének expressziója és a virionok képződése a hám differenciálódott rétegeiben zajlik. A papillomavírusok nem lítikusak, a virionok akkor szabadulnak ki a sejtekből, mikor a keratinociták elérik a felső réteget, és leválnak a hámrétegről.

Ismert, hogy a magas kockázatú genitális HPV-k megzavarják a gazdasejt differenciálódási folyamatát, amelynek célja valószínűleg az, hogy a differenciálódó hámsejtekben is biztosítva legyenek a vírus számára a replikációjához szükséges celluláris faktorok, amelyek fertőzetlen differenciálódó sejtekben már általában nincsenek jelen. Ebben fontos szerepet játszanak a vírus E6 és E7 onkoproteinjei. A magas onkogén kockázatú HPV-k keratinocita differenciálódásra kifejtett gátló hatása még kifejezettebb premalignus és malignus léziókban, úgymint a cervikális intraepiteliális neoplázia (CIN) és a cervix carcinoma. Ezekben az elváltozásokban a vírus életciklusa nem produktív, és a késői gének expressziója, valamint a vírus produkció elmarad (abortív fertőzés).

A differenciálódó sejtek DNS replikációja az E7 onkoprotein hatására reaktiválódik, ezáltal biztosítja a virális genom replikációját is. A HPV 16 E7-ről kimutatták, hogy késlelteti az involucrin és keratin 10 differenciálódási markerek szintjét humán keratinocitákban. A HPV 16 E6 jelenléte organotipikus sejt kultúrákban megzavarja a hámréteg differenciálódását. Xenograft modellt használva kimutatták, hogy a HPV 11 ill. 59 típusok megváltoztatják néhány differenciálódáshoz köthető protein (LOR, SPRR) expresszióját, mRNS és fehérje szinten is.

Több munkacsoport igazolta, hogy a keratinocita differenciálódásban résztvevő gének expressziója megváltozik a HPV onkogének jelenétében cervix carcinomás sejtekben és *in vitro* sejtenyészetekben. Azt azonban mindeddig nem vizsgálták, hogy az onkoproteinek ezen gének szabályozó régiójára hatnak-e, vagy esetleg poszttranszkripciós mechanizmusokkal fejtik ki hatásukat. Ezért munkánk során megvizsgáltuk a HPV16 E6 és E7 onkoproteinek hatását a differenciálódásban résztvevő gének expressziójára, valamint tanulmányoztuk a hatás mechanizmusát. Ehhez kezdetben az involucrin, mint fontos differenciálódási marker

expresszióját, majd promóterének aktivitását vizsgáltuk a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek jelenlétében. Munkánk második felében a HPV 16 onkoproteinek hatását tanulmányoztuk több, differenciálódásban résztvevő gén expressziójára, szabályozó régiójuk aktivitására, valamint néhány, a differenciálódás regulációjában fontos szerepet betöltő transzkripciósfaktor (aktivátor protein 1 (AP-1) és CCAAT enhancer kötő fehérje (C/EBP)) aktivitására.

CÉLKITŰZÉSEK

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

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

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejttenyésztés

A primer humán keratinocita sejtvonalat (HFK) szérummentes, alacsony kalciumtartalmú (<0,1 mM) keratinocita tápfolyadékban tenyésztettük. A PA317-LXSN, -16E6, -16E7, -16E6E7 rekombináns retrovírus termelő sejtvonalakat 10 % borjúsérumot (FBS) tartalmazó DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) tápfolyadékban tartottuk fenn. A primer keratinocitákat a PA317 sejtvonalak felülűszójával fertőztük és genetikinnel szelektáltuk. Az így nyert sejtvonalak a HPV 16 onkogénjeit expresszálják: HFK-LXSN (kontroll retrovírus vektorral transzdukált sejtvonal), HFK-16E6, HFK-16E7, HFK-16E6E7. A fertőzött sejtek egy részét 10 % FBS-t tartalmazó DMEM (1,8 mM kalcium) tápfolyadékban 24 óráig differenciáltattuk

Microarray

A HPV onkogénekkal transzdukált keratinocitákból RNeasy Mini Kit segítségével izoláltunk RNS-t három biológiai párhuzamosban. Az RNS integritását Agilent Bioanalizátor 2100-zal ellenőriztük, és a kísérleteinkben 9.0-nél nagyobb RIN (RNS integritási szám) érték feletti RNS mintákat használtuk. Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST Array-vel végeztük a globális génexpressziós vizsgálatot. 200 µg RNS-t használtunk az amplifikációs és jelölési reakcióhoz. A mintákat 45 °C-on 16 órán keresztül hibridizáltattuk és standard mosási protokollt végeztünk az Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450-en. Az array-ket a GeneChip Scanner 7G-vel szkenneltük. Az RNS jelölési és hibridizációs lépéseket Dr. Póliska Szilárd (UD-GenoMed Kft., Debrecen) végezte.

Microarray adatelemzés

Az adatelemzéseket a Genespring 12 GX szoftverével végeztük. Az Affymetrix CEL fájlokat RMA analízisnek (robust multichip analysis) és medián normalizációnak vetettük alá. Az expresszálódó gének csoportját úgy határoztuk meg, hogy a legalacsonyabb intenzitású gének 20 %-át és azokat a géneket, amik a mediánhoz képest nem mutattak legalább 2-szeres eltérést kiszűrtük, így maradt 3293 gén, amiken a statisztikai analízist elvégeztük. Az általunk használt elemzés az egytényezős varianciaanalízis (ANOVA), amit Tukey-féle post hoc teszttel egészítettünk ki. Az elfogadott szignifikancia szintje $p < 0,05$, a fold change értéke 1,5 volt. A további elemzéseket az Ingenuity Pathway Analysis (IPA) szoftverrel végeztük.

Reverz transzkripció polimeráz lánreakció (RT-PCR)

A differenciáltatott és nem differenciáltatott transzdukált keratinocita sejtekből Tri Reagens-sel RNS-t izoláltunk a gyártó cég utasításai szerint. A High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit segítségével végeztük el a reverz transzkripció lépést. A PCR reakcióban GoTaq polimerázt és GAPDH (glicerinaldehid 3-foszfát dehidrogenáz), valamint HPV 16 E6 és E7 specifikus primerpárokat használtunk.

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

A valós idejű PCR-t a 7500 Real Time PCR System-en végeztük TaqMan Gene Expression Master Mix-szel és Assay-kkel. A relatív kvantifikációhoz a GAPDH-t használtuk endogén kontrollként és a kontroll retrovírus vektort tartalmazó sejtvonalból (HFK-LXSN) nyert értékekhez viszonyítottuk a többi sejtvonalból nyert eredményeket a komparatív Ct módszerrel. Az RQ (Relatív Quantity) eredményeket standard deviációval és konfidencia intervallumokkal a 7500 System SDS szoftver 1.4 verziójával nyertük. Minden PCR reakciót legalább 3 párhuzamosban és 3 ismétlésben végeztünk.

Fehérje izolálás és Western blot

A differenciáltatott és nem differenciáltatott transzdukált keratinocitákból proteáz és foszfatáz gátló szereket tartalmazó RIPA lízis pufferrel izoláltunk fehérjét. A lízis pufferben a tenyésztőflaskáról leválasztott sejteket jégen inkubáltuk, centrifugáltuk, majd a felülúszó összfehérje-tartalmát Bradford teszt segítségével határoztuk meg. A fehérjeextraktumokból 10 µg mennyiséget 10 %-os SDS poliakrilamid gélben választottuk szét, majd blottoltuk át nitrocellulóz membránra. 5 % tejport tartalmazó TBST-vel (Tris-sel pufferelt sóoldat 0,05 % Tween 20-szal kiegészítve) blokkoltuk a membránok aspecifikus kötőhelyeit. A blottokat az elsődleges ellenanyagokkal (anti-involukrin, anti-p53, és anti-aktin), majd mosási lépést követően tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk. Az antitest komplexeket a SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate segítségével detektáltuk a röntgenfilmeken. A Gel Doc 2000 gëldokumentációs rendszerét és a Quantity One szoftvert (4.0.3. verzió) használtuk a fehérjemennyiségek denzitometriás meghatározásához. Az involukrin és a p53 fehérjeszintjét az aktin mennyiségére normalizáltuk és a kontroll retrovírust tartalmazó (HFK-LXSN) sejtvonalhoz viszonyítottuk. A kísérleteket ebben az esetben is legalább 3-szor ismételtük.

Plazmidok

A pGL3-IVL luciferáz riporter plazmid a humán IVL gén 3,7 kb hosszúságú promóter régióját tartalmazza a luciferáz gén előtt. A pGL3-IVL-2418, pGL3-IVL-1809, pGL3-IVL-744, pGL3-IVL-272 vektorok konstruktokhoz az IVL promótert használtuk templátként, az adott szakaszokat GeneAmp High Fidelity System-mel amplifikáltuk és *XhoI* és *HindIII* restrikciós enzimekkel pGL3-Basic vektorba klónoztuk. A plazmidok helyes nukleotid sorrendjét szekvenálással ellenőriztük az UD-GenoMed Kft. (Debrecen) segítségével.

A p53-Luc, pAP-1-Luc és pC/EBP-Luc riporter plazmidok a p53, AP-1 és C/EBP kötőhelyek több kópiáját, valamint a luciferáz gént tartalmazzák. A pAdE2Luc riporter konstrukt az adenovírus E2 promótert és luciferáz gént tartalmaz. A HPV 16 onkogénjeit tartalmazó pcDNA-16E6, és -16E7 expressziós vektorokat korábban munkacsoportunk tagjai írták le. A keratin 4 (KRT4), a keratin 5 (KRT5), a small prolin-rich protein 1A (SPRR1A), a S100 kalciumkötő fehérje A8 (S100A8) és a dezmozollin 1 (DSC1) riporter vektorok az adott gének promóter régióit és *Renilla* luciferáz gént tartalmazzák.

Tranziens transzfekció

A 3-6. passzázsú primer humán keratinocitákat 6 lyukú sejtenyésztő plate-eken tenyésztettünk, úgy, hogy a transzfektáláskor 70-80 %-os konfluenciát érjünk el. A sejteket 0,5 µg riporter plazmiddal (pGL3-IVL, pGL3-IVL-2418, pGL3-IVL-1809, pGL3-IVL-744, pGL3-IVL-272, p53-Luc, pAP-1-Luc, pC/EBP-Luc, pAdE2Luc, KRT4, KRT5, SPRR1A, S100A8 vagy DSC1) és 0,25 µg expressziós vektorral (pcDNA-kontrol, pcDNA-16E6 vagy pcDNA-16E7) kotranszfektáltuk Effectene transzfekciós reagenssel. 5 óra 37 °C-os inkubáció után a tápfolyadékot lecseréltük keratinocita tápfolyadékra. A transzfekciót követően 24 órával a sejtek egy részét további 24 óráig 10 % FBS-t tartalmazó DMEM-ben (1,8 mM kalcium) differenciáltattuk. 48 órával a transzfekció után a sejteket mostuk PBS-sel, és a riporter plazmidoknak megfelelő lízis pufferrel tártuk fel. Luciferase Assay System segítségével mértük le az egyes riporter konstruktok luciferáz aktivitását Berthold luminométeren. Bradford protein teszttel a sejtek teljes fehérjetartalmára normalizáltuk a luciferáz aktivitásokat. A kísérleteket legalább három ismétlésben végeztük, a kapott eredményeket átlagoltuk és SEM (standard error of mean) értékekkel együtt ábrázoltuk. Az átlagok közötti statisztikai különbségeket t-próba (kétmintás és párosított t-teszt logaritmusos transzformáció után) segítségével elemeztük. Szignifikánsnak a $p < 0,05$ értékeket tekintettük.

EREDMÉNYEK

Humán papillomavírus 16 onkoproteinek hatása az involukrin expressziójára humán keratinocitákban

HPV 16 onkoproteinek hatása keratinociták differenciálódásában résztvevő gének expressziójára

Ahhoz, hogy tanulmányozni tudjuk a HPV onkogének hatását a celluláris gének expressziójára, primer humán keratinocitákat transzdukáltunk rekombináns retrovírus vektorokkal, amelyek kontrol vektort (LXSN), a HPV 16 E6 vagy E7 ill. mindkét onkogént expresszálják. A funkcionálisan aktív HPV onkoproteinek jelenlétét a celluláris p53 proteinre és a humán telomeráz reverz transzkriptáz mRNS szintjére kifejtett, ismert hatásukkal igazoltuk. Valós idejű PCR-rel vizsgáltuk a HPV 16 onkogének hatását egyes differenciálódási markerek, így a TGM1 és fő szubsztrátja, az IVL expressziójára a HPV onkogénekkal transzdukált sejtvonalakban. A keratinociták differenciálódásának indukálása megnövelte mind a TGM1, mind az IVL mRNS szintjét. A proliferáló és a differenciálódó sejtekben is az E6 és az E7 szignifikánsan csökkentette az IVL expresszióját. A vektor kontrollal transzdukált sejtekhez viszonyítva, a mindkét onkogént expresszáló sejtekben ez a hatás még szignifikánsabb volt a proliferáló és a differenciálódó sejtek esetén is. A nem differenciáltotott sejtekben a HPV 16 E6 és E7 onkogéneknél együtt csak mérsékelt gátló hatása volt az endogén TGM1 mRNS szintjére, míg a differenciáltotott sejtekben a HPV onkogéneknél nem volt szignifikáns hatásuk.

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

A HPV 16 onkoproteinek hatása a humán involukrin promóter transzkripció aktivitására

A következőkben szeretnénk volna meghatározni, hogy a HPV onkogének IVL expresszióra kifejtett hatása az IVL promóter transzkripció gátlásán keresztül történik-e.

Ezért alacsony passzázsú humán keratinocitákat tranziensen transzfektáltunk olyan luciferáz riporter vektorral, amely az IVL szabályozó régióját tartalmazza, valamint pcDNA-alapú vektorokkal, amik a HPV 16 E6 és/vagy E7 onkogéneket expresszálják. A funkcionálisan aktív HPV 16 onkogének expresszióját a transzfektált HFK sejtekben olyan kotranszfekciós kísérletekben erősítettük meg, ahol a riporter vektorok a p53 protein kötőhelyeit, illetve az adenovírus E2 promóterét (AdE2, E2F transzkripciós faktor kötőhellyel rendelkezik) tartalmazzák.

Proliferáló HFK sejtekben a HPV 16 E6 szignifikánsan csökkentette az IVL promóter teljes hosszúságú szakaszát tartalmazó plazmid (pGL3-IVL) aktivitását. Ezzel szemben az E7-nek nem volt szignifikáns hatása az IVL riporter vektorra proliferáló sejtekben. A sejtek egy részét magas kalcium- és szérumtartalmú DMEM tápfolyadékban differenciáltattuk, ami a pGL3-IVL plazmid aktivitását az üres expressziós vektor (pcDNA) jelenlétében megnövelte. A differenciált keratinocitákban az E6 és az E7 is csak kisebb mértékben csökkentette az IVL promóter aktivitását, míg a két onkogén együtt szignifikáns aktivitás-csökkenést okozott az IVL promóteren. Ebből arra következtethetünk, hogy a HPV 16 E6 onkoprotein az endogén IVL expresszió csökkenését részben az IVL promóter aktivitásának gátlásával fejt ki.

A HPV 16 onkogének hatásának lokalizálása a humán involukrin promóteren

Azért, hogy lokalizálni tudjuk a HPV onkoproteinek hatását az IVL promóteren, a szabályozó régió különböző hosszúságú szakaszait klónoztuk luciferáz riporter plazmidokba. Először ellenőriztük, hogy a konstruktok tranziens transzfekciós kísérletekben válaszolnak-e a differenciációs stimulusra. Mindegyik riporter konstruktt aktivitása megnőtt a differenciáltatás hatására. Ezután kotranszfekciós kísérletekben vizsgáltuk a HPV 16 E6 és E7 onkogének hatását az IVL konstruktok transzkripciós aktivitására. Proliferáló HFK sejtekben a HPV 16 E6 az összes konstruktt aktivitását csökkentette. Az E6 a differenciáltatott sejtekben is szignifikánsan csökkentette az összes IVL konstruktt aktivitását. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a HPV 16 E6 a humán IVL promóter a proximális régióján fejt ki hatását.

A HPV 16 E7-nek nem volt szignifikáns hatása az IVL promóterre proliferáló sejtekben. A differenciáltatott sejtekben csak a leghosszabb konstruktra (IVL-2418) volt mérsékelt, de szignifikáns gátló hatással, míg a rövidebb IVL riporter plazmidokra nem.

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

A HPV 16 onkogénekkal transzdukált HFK sejtek teljes génexpressziós analízise

Azért, hogy vizsgálni tudjuk a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatását a primer keratinociták teljes mRNS expressziós mintázatára, microarray elemzést végeztünk a HPV 16 onkogéneket expresszáló retrovírus vektorokkal transzdukált HFK sejteken (HFK-LXSN, HFK-16E6, HFK-16E7, HFK-16E6E7). A kísérlet során alacsony passzázsú sejteket használtunk, 3 biológiai párhuzamosban. A 4 sejtvonal expressziós profilja közötti különbséget egytényezős variancia-analízissel (ANOVA) és hierarchikus klaszter analízissel elemeztük. Az IPA (Ingenuity Pathway Analysis) elemzés megmutatta, hogy a vektor kontrollhoz képest szignifikáns expressziós eltérést mutató gének nagy része a sejtciklusban, a sejthalálban és a proliferációban vesz részt. Összhangban más, hasonló módszerekkel dolgozó kutatócsoportokkal, találtunk számos olyan, a keratinocita differenciálódáshoz köthető gént (többek között IVL, SPRR-ek, S100A proteinek, KRT-ok) amelynek az expressziója szignifikánsan csökkent a HPV onkoproteinek jelenlétében.

HPV 16 onkoproteinek hatása a keratinociták differenciálódásában résztvevő gének mRNS szintjére

A microarray elemzésből nyert eredményeinket valós idejű RT-PCR-rel erősítettük meg a differenciálódáshoz köthető gének egy részén. A legtöbb vizsgált gén expressziója szignifikánsan csökkent a HPV 16 E6 és E7 onkogének jelenlétében. Találtunk néhány olyan gént, amelynek az mRNS szintje szignifikáns csökkenést mutatott a valós idejű PCR során, míg a microarray elemzésben nem (CNFN, LOR, S100A10, S100A12).

Azok közül a gének közül, amelyek eltérést mutattak a HPV 16 onkoproteinek jelenlétében a microarray és/vagy a valós idejű PCR során, kiválasztottunk 7-et, és ezeket részletesebben is elemeztük további valós idejű PCR kísérletekben, külön-külön is vizsgálva az E6 és E7 onkogének hatásait. Összehasonlításként választottunk egy bazális keratint is, a keratin 5-öt (KRT5), amelyről tudjuk, hogy expressziója nem változik a differenciálódás során. Ebben az esetben azt tapasztaltuk, hogy a KRT5 mRNS szintje nem csökkent az E6 ill. az E7 hatására. Ezzel szemben, a keratinocita differenciálódásban résztvevő gének (DSC1, KRT1, KRT4, KRT10, S100A8, S100A9 és SPRR1A) szignifikánsan csökkent expressziót mutattak a HPV onkoproteinek jelenlétében. Ezek az eredmények arra engednek

következtetni, hogy a HPV E6 és E7 onkoproteineknek valamilyen általános hatása van a többrétegű hám sejteinek differenciálódásában szerepet játszó gének szabályozásában.

HPV 16 onkoproteinek hatása a keratinociták differenciálódásában résztvevő gének promóter aktivitására

Luciferáz riporter rendszer segítségével vizsgáltuk a HPV onkoproteinek hatását olyan, a differenciálódásban résztvevő gének transzkripció aktivitására, amelyek expressziós változásait valós idejű PCR-rel is vizsgáltuk. A kísérletek során primer humán keratinocitákat transzfektáltunk a különböző, differenciálódásban fontos gének (DSC1, KRT4, S100A8 és SPRR1A) promótereit tartalmazó riporter vektorokkal és a HPV 16 E6 és/vagy E7 onkogéneket expresszáló vektorokkal. Mind a 4 vizsgált gén promóterének aktivitása csökkent a vektor kontrollhoz (pcDNA) képest azokban a sejtekben, amelyekben a két onkoprotein együtt (16E6E7) volt jelen. Ahogy azt vártuk az expressziós kísérleteink és az irodalom alapján, a bazális KRT5 promóterének aktivitását nem csökkentették a HPV onkogének. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a HPV 16 onkoproteinek a hatásukat, legalább részben, a keratinocita differenciálódásban szerepet játszó gének transzkripció gátlásán keresztül fejtik ki.

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

Feltételeztük, hogy a HPV 16 onkoproteinek a gátló hatásukat a keratinocita differenciálódásban résztvevő génekre esetleg néhány transzkripció faktor aktivitásának módosításán keresztül fejtik ki. Ennek érdekében két adatbázis segítségével elemeztük a vizsgált promóterek szekvenciáit. A promóterek mindegyike tartalmaz lehetséges kötőhelyeket az AP-1 és a C/EBP transzkripció faktor család tagjainak. Ezért tranziens transzfekció kísérletekben vizsgáltuk, hogy a HPV onkoproteineknek van-e valamilyen hatása ezeknek a faktoroknak az aktivitására. Ehhez a HPV 16 onkogéneket expresszáló vektorok mellett, olyan luciferáz riporter plazmidokkal transzfektáltunk HFK sejteket, amelyek az AP-1, ill. a C/EBP faktorok kötőhelyeinek több kópiáját tartalmazták. Azt tapasztaltuk, hogy a két onkoprotein együtt csökkentette mind az AP-1, mind a C/EBP faktorok aktivitását. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek a keratinocita differenciálódásban résztvevő gének promóterét néhány olyan transzkripció faktor aktivitásának gátlásával szabályozzák, amik fontos szabályozói ezeknek a promótereknek, mint például az AP-1 és a C/EBP faktor családok tagjai.

MEGBESZÉLÉS

Munkám során a HPV természetes gazdasejtjeiben, a humán keratinocitákban vizsgáltam a differenciálódási folyamatban szerepet játszó gének expressziós változását a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinjeinek hatására. Kutatásunk első felében az IVL és a TGM1 gének, mint fontos keratinocita differenciálódási markerek expressziós változásait vizsgáltuk a HPV onkoproteinek jelenlétében. Azt tapasztaltuk, hogy a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek szignifikánsan csökkentették az endogén IVL mRNS és fehérje szintjét humán keratinocitákban. Ezek az eredmények összhangban vannak korábbi tanulmányokkal, amik cervix carcinomából származó mintákon és HPV onkogéneket expresszáló retrovírus vektorokkal transzdukált humán keratinocitákon végeztek microarray analízist. Ezekben az IVL és néhány más differenciálódás által szabályozott gén (KRT-ok és SPRR-ek) csökkent expressziót mutatott. Ahogy azt vártuk, a HFK sejtek differenciálódásának indukálása szérummal és a megemelt kalcium szinttel jelentősen megnövelte az endogén IVL és a TGM1 mRNS szintjét. A HPV 16 E6 és E7 onkogének együtt szignifikánsan csökkentették az IVL mRNS szintjét, de érdekes módon csak mérsékelt hatásuk volt a TGM1 mRNS szintjére. Ez arra utal, hogy a HPV onkoproteinek hatása különböző a differenciálódásban fontos gének expressziójára. Úgy tűnik, hogy proliferáló sejtekben az E6 és az E7 onkogéneknek szinergista szabályozó hatása van az IVL mRNS szintjére. Differenciálódó sejtekben, ahol az IVL expressziója megemelkedett, a HPV onkogének okozta IVL mRNS csökkenés kisebb volt, de még mindig szignifikáns. A Western blot analízis is azt mutatta, hogy a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek együtt csökkentik az IVL fehérje szintjét is, mind a proliferáló, mind a differenciálódó sejtekben. Egy korábbi tanulmányban már megállapították, hogy a HPV 6 ill. HPV 16 E7 expressziója csökkenti az IVL protein szintjét humán keratinocitákban. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek az IVL alap és differenciáció-indukálta expresszióját is csökkentik HFK sejtekben.

A keratinociták differenciálódásában résztvevő gének expressziója a transzkripció szintjén szabályozódik. Ezért vizsgáltuk tovább a HPV 16 onkoproteinek hatását az IVL promóterének transzkripciós aktivitására. Ehhez HFK sejteket transzfektáltunk HPV 16 E6 és/vagy E7 onkogéneket expresszáló vektorokkal és olyan luciferáz riporter plazmiddal, ami a humán IVL gén teljes szabályozó régióját (URR-upstream reguláló régió) tartalmazza. A transzfektált sejtek egy részét ezt követően 24 óráig differenciáltattuk. Korábbi eredményekhez hasonlóan, a differenciáltatás szignifikánsan megnövelte az IVL promóter aktivitását. Proliferáló sejtekben csak a HPV 16 E6 csökkentette az IVL promóter

transzkripció aktivitását, míg az E7 nem. Differenciálódó HFK sejtekben pedig a két HPV onkoprotein együtt csökkentette az IVL szabályozó régiójának aktivitását. Összefoglalva ezek az eredmények azt mutatják, hogy az endogén IVL mRNS és protein szintjének csökkentése a HPV 16 E6 által az IVL promóter gátlásán keresztül történik. Azonban nem lehet kizárni azt sem, hogy a HPV 16 E6 az IVL vagy más differenciálódáshoz köthető gének expresszióját más mechanizmusokkal is szabályozza.

Azért, hogy lokalizálni tudjuk a HPV onkogének hatását az IVL promóteren, olyan luciferáz riporter konstruktokat használtunk, amelyek a szabályozó régió különböző hosszúságú szakaszait tartalmazták. Az IVL gén URR-je tartalmaz egy disztális (DRR, a transzkripció starthelytől számított -2473/-1953 nukleotidok között) és egy proximális (PRR, a transzkripció starthelytől számított -2473/-1953 nukleotidok között) részt. Az IVL szabályozó régiója 5 AP-1 kötőhelyet tartalmaz. A DRR (AP-1-5) és a PRR (AP-1-1) részekben elhelyezkedő két elem esszenciális a promóter aktivitásához. Az AP-1 faktorok (c-fos, fosB, Fra-1, Fra-2, c-jun, junB és junD) a többrétegű hám különböző rétegeiben expresszálódnak, expressziós mintázatuk pedig a differenciálódásban résztvevő gének kifejeződését szabályozza. A mi eredményeink azt mutatják, hogy a HPV 16 E6 legnagyobb mértékben a leghosszabb IVL promóter konstrukt aktivitását csökkentette, ami a teljes URR-t tartalmazta. De csökkent annak az IVL konstruktnak az aktivitása is a HPV 16 E6 onkoprotein hatására, amely csak a PRR-t foglalja magába. Ez a hatás mind a proliferáló, mind a differenciálódó keratinocitákban észlelhető volt. Ebből arra következtethetünk, hogy az IVL gén szabályozó régiójának proximális része tartalmaz olyan transzkripció faktor kötőhelyeket, amelyeket a HPV 16 E6 képes szabályozni.

A HPV E7 onkogénnek csak a leghosszabb IVL promóter fragmentet tartalmazó (IVL-2418) konstruktra volt szignifikáns gátló hatása, és ezt a hatást csak a differenciálódó sejtekben tapasztaltuk. Ez arra utalhat, hogy az E7 hatása az IVL promóterre kevésbé direkt vagy specifikus, mint az E6 hatása. Elképzelhetőnek tartjuk, hogy az E7 hatása az IVL expressziójára (szinergista gátló hatás az E6-tal) és az IVL promóter aktivitására (mérsékelt gátló hatás differenciálódó sejtekben) nem direkt vagy specifikus kapcsolat, hanem inkább olyan mechanizmusoknak köszönhető, amiket nemrégiben írtak le. Ilyen például az, hogy a DEK proteint transzkripciósan, a nucleophosmint pedig poszttranszkripció szinten aktiválja a HPV 16 E7, és kimutatták, hogy ezek fontos szerepet játszanak a differenciálódási folyamat gátlásában.

Kutatásunk folytatásaként, terveink között szerepelt, hogy egyéb, differenciálódáshoz köthető gének expresszióját is vizsgáljuk a HPV 16 onkoproteinek jelenlétében. Munkánk

következő részében lehetőségünk nyílt elvégezni a HPV 16 E6 és/vagy E7 onkogénekkal transzdukált humán keratinociták teljes genom expressziós mintázatának elemzését microarray segítségével. A differenciálódásban fontos gének esetén az eredményeinket valós idejű PCR-rel erősítettük meg. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy néhány gén esetén (CNFN, KRT4, LOR, S100A10 és S100A12) csak a valós idejű PCR vizsgálatokban tudtuk kimutatni, hogy a HPV onkoproteinek hatására megváltozik az expressziójuk, ez a különbség a microarray analízisben nem volt észlelhető.

A legtöbb keratinocita differenciálódáshoz köthető génről, amiket vizsgálataink során találtunk, már méhnyakrákos mintákon kimutatták, hogy csökken az expressziójuk a HPV 16 onkogének hatására a normál cervikális sejtekhez képest. Ennek megfelelően a magas onkogén kockázatú HPV-k onkoproteinjei *in vitro* sejttenyésztési modellekben is csökkentették ezen gének expresszióját. Ebből úgy tűnik, hogy a magas kockázatú HPV típusok a keratinocita differenciálódásban résztvevő gének expresszióját valamilyen általános hatással csökkentik. A HPV onkoproteinek ezen hatásának fontos szerepe lehet a vírus produktív életciklusában. A gazdasejt differenciálódásának késleltetése kiemelkedő fontosságú a HPV-hez társítható premalignus cervikális léziókban (CIN), és ez látható a HPV-k által immortalizált organotipikus (raft) kultúrákban tenyésztett keratinocitákban is.

Azonban kevés adat van arról, hogy a keratinocita differenciálódásban fontos gének expresszióját a HPV onkogének milyen mechanizmussal befolyásolják. Ezért kutatásunk második részében tovább vizsgáltuk az IVL-on kívül más, differenciálódásban résztvevő gének (DSC1, KRT4, S100A8 és SPRR1A) transzkripció aktivitását. Ezek a gének csökkent expressziót mutattak a HPV 16 onkoproteinek jelenlétében a mi vizsgálatainkban és korábbi tanulmányokban is. Kimutattuk, hogy mindegyik gén promóterének aktivitása csökkent a HPV onkoproteinek hatására. Minden esetben a legerősebb hatást azokban a sejtekben tapasztaltuk, ahol mindkét HPV onkogén jelen volt. Ezért arra következtethetünk, hogy a magas kockázatú HPV E6 és E7 onkoproteineknek talán additív vagy szinergista hatása van a differenciálódáshoz köthető gének expressziójára.

A valós idejű PCR-rel kapott génexpressziós és a luciferáz teszttel nyert promóter aktivitási eredmények jól korreláltak egymással. Azonban néhány esetben a szabályozó régiók aktivitásai eltérést mutattak a génexpressziós eredményekhez képest. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a transzkripció szabályozáson kívül más mechanizmusok (talán poszttranszkripció módosítások) is hozzájárulhatnak ezeknek a géneknek a HPV onkoproteinek általi expressziós gátlásához.

A HPV onkoproteinek nem gátolták a KRT5 promóterét. A KRT5 egy bazális keratin, melynek expresszióját nem a differenciálódás szabályozza. Ebből úgy tűnik, hogy a HPV 16 onkoproteinek azoknak a géneknek az expresszióját gátolják specifikusan, amiket a differenciálódás szabályoz. Összefoglalva, a luciferáz eredményeink azt mutatják, hogy a HPV 16 onkogének az általunk vizsgált keratinocita differenciálódásban résztvevő gének transzkripció aktivitását csökkentik. Ez a mechanizmus valószínűleg hozzájárul ezeknek a géneknek premalignus és malignus cervikális léziókban mutatott csökkent expressziójához.

Az általunk vizsgált promóterek mindegyike, melynek az aktivitása változott a HPV onkoproteinek hatására, tartalmaz lehetséges AP-1 és C/EBP transzkripció faktor kötőhelyeket. Ezekről a transzkripció faktorokról tudjuk, hogy a keratinocita differenciálódáshoz köthető gének transzkripció szabályozásában lényeges funkciót töltenek be, és a differenciálódás szabályozza aktivitásukat és expressziójukat. A HPV 16 E7 proteinről már megállapították, hogy köti az AP-1 transzkripció faktorokat, mint a c-jun, junB, junD és c-fos. A kísérleteinket olyan riporter konstrukciókkal folytattuk, amelyekben több kötőhelye található ezeknek a faktoroknak, és a HPV onkoproteineknek szignifikánsan gátolták az aktivitásukat. Ezért elképzelhető, hogy a HPV 16 onkoproteinek a keratinociták differenciálódásában fontos gének promóterét az AP-1 és C/EBP transzkripció faktorok aktivitásának módosításával gátolják. Annak bizonyítására, hogy ez valóban így van, további kísérleteket tervezünk, úgy, mint promóter mutagenézis és kromatin immunprecipitáció (ChIP).

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

ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

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

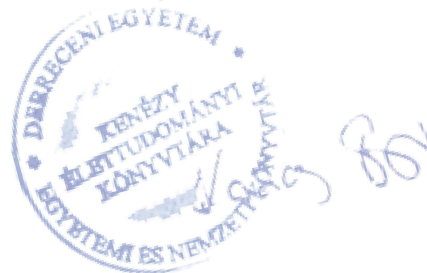


Nyilvántartási szám: DEENK/75/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





További Közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,925

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

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

Debrecen, 2015.04.07.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK JEGYZÉKE

Gyöngyösi E., Veress G.: Effect of human papillomavirus oncogenes on the expression of cellular genes involved in keratinocyte differentiation. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2008. évi Nagygyűlése, Október 15-17, 2008, Hotel Helikon, Keszthely

Gyöngyösi E., Szalmás A., Ferenczi A. Kónya J., Veress G.: Human papillomavirus oncogenes down-regulate involucrin expression. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2010. évi Nagygyűlése, Október 12-15, 2010, Hotel Helikon, Keszthely

Gyöngyösi E., Szalmás A., Ferenczi A. Kónya J., Veress G.: Effect of human papillomavirus oncoproteins on the expression of involucrin in human keratinocytes. 16th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, July 20-22, 2011, Budapest, Hungary

Gyöngyösi E., Szalmás A., Ferenczi A., Kónya J., Veress G.: Effects of human papillomavirus (HPV) type 16 oncoproteins on the expression of involucrin in human keratinocytes. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi Nagygyűlése, Október 24-26, 2012, Hotel Helikon, Keszthely

Gyöngyösi E., Szalmás A., Ferenczi A., Kónya J., Veress Gy.: Human papillomavirus 16 alters the expression of genes important in keratinocyte differentiation. 4th Central European Forum for Microbiology, October 16-18., 2013, Keszthely, Hungary

Gyöngyösi E., Szalmás A., Ferenczi A., Póliska Sz., Kónya J., Veress Gy.: Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins alter the expression of differentiation-associated genes in human keratinocytes. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése, Október 15-17., 2014, Hotel Helikon, Keszthely

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ POSZTEREK LISTÁJA

Gyöngyösi E., Szalmás A., Kónya J., Veress Gy.: Effect of human papillomavirus 16 E6 and E7 oncogenes on the expression of involucrin in human keratinocytes. 2nd Central European Forum for Microbiology, October 7-9, 2009, Keszthely, Hungary

Gyöngyösi E., Szalmás A., Ferenczi A., Kónya J., Veress Gy.: Keratinocyták differenciálódásában résztvevő gének expressziós változásainak vizsgálata humán papillomavírus onkoproteinek hatására. Debrecen az élettudományi kutatásokért. Május 29, 2014., Debrecen