

EGYETEMI DOKTORI (Ph. D.) ÉRTEKEZÉS

**HUMÁN PAPILOMAVÍRUS GENOMI RÉGIÓK
FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATA**

Murvai Melinda

Témavezető: Prof. Dr. Gergely Lajos

Dr. Veress György

Debreceni Egyetem

Orvos-és Egészségtudományi Centrum

Általános Orvostudományi Kar

Orvosi Mikrobiológiai Intézet

2005

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
BEVEZETÉS	4
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
1. A HPV16 szerkezete, genomi szerveződése, fehérjéinek funkciói	6
2. A humán papillomavírusok patogenitása	11
3. A HPV DNS fizikai állapotának szerepe	13
4. A papillomavírusok rendszerezése	13
5. A TGF- β szerepe a malignus folyamatok létrejöttében	14
6. A TGF- β 2 és a HPV16 kapcsolata	16
CÉLKITŰZÉSEK	17
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	18
1. Polimeráz láncreakció (PCR)	18
2. Plazmidok, klónozás	19
3. Szekvenálás	22
4. Sejtkultúrák, tranziens transzfekció és luciferáz teszt	23
EREDMÉNYEK	25
1. A HPV16 természetes deléciós variánsainak transzkripciós aktivitása (I. közlemény)	25
<i>A deléciós variánsok szekvenálása</i>	25
<i>A deléciós mutánsok transzkripciós aktivitása HeLa sejtekben</i>	25
<i>Az E2 fehérje hatása az ázsiai variáns deléciós mutánsainak transzkripciós aktivitására</i>	26
2. A HPV 16 E6 és E7 proteinjének hatása a TGF- β 2 promóter transzkripciós aktivitására (II. közlemény)	28
<i>A HPV 16 E6 és E7 proteinjének hatása a TGF-β2 promóter transzkripciós aktivitására különböző sejtvonalakban</i>	28
<i>Az E7 gátló hatásáért felelős régió meghatározása a TGF-β2 promóterében</i>	30
<i>Az E7 gátló hatásáért felelős molekuláris mechanizmusok vizsgálata</i>	31
KÖVETKEZTETÉSEK	33
1. A HPV16 természetes deléciós variánsainak transzkripciós aktivitása (I. közlemény)	33
2. A HPV16 E6 ÉS E7 onkoproteinjének hatása a TGF- β 2 promóter transzkripciós aktivitására (II. közlemény)	35
ÖSSZEFOGLALÁS	38
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	39
IRODALOMJEGYZÉK	40
KÖZLEMÉNYEK	46
Az értekezésben felhasznált közlemények	46
Egyéb közlemények	46
Fontosabb előadások, posztterek	46

RÖVIDÍTÉSEK JEGYÉKE

AP-1	transzkripciós szabályozó faktor (activator protein-1)
Arg	arginin (R)
bp	bázispár
cdc	cell division cycle
CDK	ciklin-dependens kináz
CDI	ciklin-dependens kináz inhibitor
CDP	transzkripciós szabályozó faktor (CCAAT-displacement protein)
Cys	cisztein (C)
EGF-R	epidermális növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor)
Gly	glicin (G)
GRE	glükokortikoid receptort kötő elem (glucocorticoid responding element)
HDAC	hiszton-deacetiláz
HPV	humán papillomavírus
kDa	kilodalton
LCR	a HPV szabályozó régiója (long control region)
NF1	transzkripciós szabályozó faktor (nuclear factor 1)
ORF	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
PCR	polimeráz láncreakció (polimerase chain reaction)
Rb	retinoblasztoma
PDGF-R	vérlemezke-eredetű növekedési faktor receptor (platelet-derived growth factor receptor)
RLU	relatív fényegység (relative light unit)
TEF-1	transzkripciós szabályozó faktor (transcriptional enhancer factor-1)
TGF- β	transzformáló növekedési faktor- β (transforming growth factor- β)
YY1	transzkripciós szabályozó faktor (yin-yang 1)

BEVEZETÉS

A cervix carcinoma a nők harmadik leggyakoribb daganatos megbetegedése, Magyarországon is a vezető halálokok közé tartozik (Parkin et al, 1999). Az endocervix egyrétegű és az ectocervix többrétegű hámjának találkozási helyéről kiinduló elváltozás több stádiumon megy keresztül, míg az invazív carcinoma kialakul. A betegség kialakulásában a humán papillomavírusoknak (HPV) van etiológiai szerepe: a méhnyakrákos betegek 90 %-ában kimutatható az elváltozásokból papillomavírus genom jelenléte, az esetek felében a HPV16 van jelen (Franco et al, 1999).

A genitális hámokat fertőző humán papillomavírus-típusok onkogén kockázatuk alapján alacsony és magas kockázatú csoportba oszthatók. Az előbbi kategóriába tartozik a HPV6, HPV11, míg a magas onkológiai kockázatú csoportban található a HPV16 a HPV18, HPV31 és HPV45 mellett. Egy adott genotípuson belül is előfordulnak különböző intratípusos variánsok. A HPV16 európai (E) prototípusán kívül 2 afrikai (Af1 és Af2), egy ázsiai (As), egy ázsiai-amerikai (AA) és egy észak-amerikai (NA1) variáns létezik (Yamada et al, 1997). Az intratípusos variánsok eltérő onkogén kockázattal rendelkeznek: az AA és NA1 gyakrabban társul magas kockázatú neopláziás elváltozásokhoz, mint a többi variáns. Ezért a jelenségért a P₉₇ fő korai promóter megnövekedett transzkripció aktivitása, és az E6 protein fokozottabb immortalizáló hatása lehet a felelős (Kammer et al, 2000). A HPV16-pozitív cervix carcinomákból gyakran izolálnak megnövekedett transzkripció aktivitású, az LCR-ben deléciókat tartalmazó variánsokat is (Dong et al, 1994). A különböző intratípusos, illetve természetes deléciós variánsok részletesebb vizsgálata magyarázatot adhat a megnövekedett transzkripció aktivitásra, illetve a neopláziás elváltozások kimenetelét tekintve prognosztikai szerepe is lehet.

A cervix carcinoma kialakulásához a HPV fertőzésen kívül celluláris események is hozzájárulnak. A betegség kifejlődésében jelentős szerepe van a gazdaszervezet immunológiai és genetikai hátterének, citokineknek, növekedési faktoroknak, illetve egyéb kofaktoroknak (szexuális szokások, dohányzás, hormonális hatások) is (Schneider, 1994).

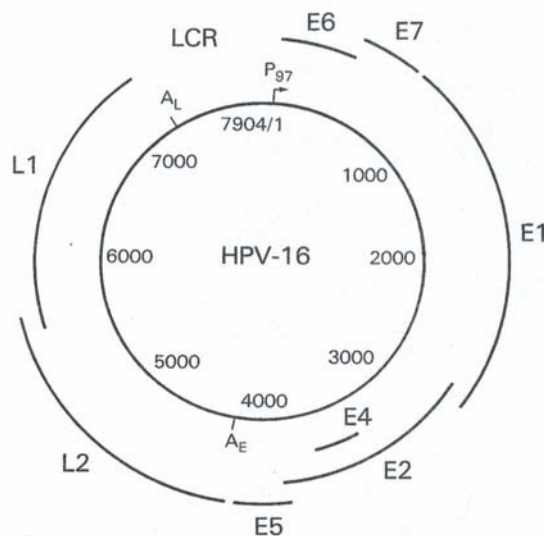
A TGF- β 2 a transzformáló növekedési faktorok családjába tartozó citokin, mely a keratinociták differenciálódása során indukálódik, és gátolja azok szaporodását (Glick et al, 1990). Mivel a humán papillomavírusok szaporodásához szükséges a fertőzött gazdasejtek osztódásának fenntartása, a TGF- β 2 antagonisztikus hatása csökkenti a HPV szaporodásának esélyeit. Egy nemrég megjelent közleményben (Nees et al, 2000) kimutatták, hogy a HPV16

E6 és E7 proteinje primer keratinocita sejt kultúrában csökkenti a TGF- β 2 fehérje szintjét. Arról azonban, hogy milyen mechanizmus állhat a gátló hatás hátterében, nem volt adat.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. A humán papillomavírus 16 (HPV16) szerkezete, genomi szerveződése, fehérjéinek funkciói

A papillomavírusok (PV) a Papillomaviridae családba tartozó, kis méretű, burok nélküli, ikozahedrális szimmetriájú DNS vírusok. Az 52-55 nm átmérőjű, 72 kapszomerből felépülő kapszidon belül cirkuláris, duplaszálú, kb. 8000 bázispár (bp) nagyságú DNS található. A HPV16 összes, vírusfehérjét kódoló szekvenciája a duplaszálú DNS egy szálára lokalizálódik (zur Hausen, 1996). A 7904 bp méretű genom egy megközelítőleg 4,5 kb nagyságú korai (early, E), egy majdnem 3 kb késői (late, L), és egy közel 1 kb méretű, fehérjéket nem kódoló, szabályozó funkciójú szakaszra (long control region, LCR) tagolódik. A korai régió 6, a késői 2 nyitott leolvasási keretet (open reading frame, ORF) tartalmaz (Turek, 1994).



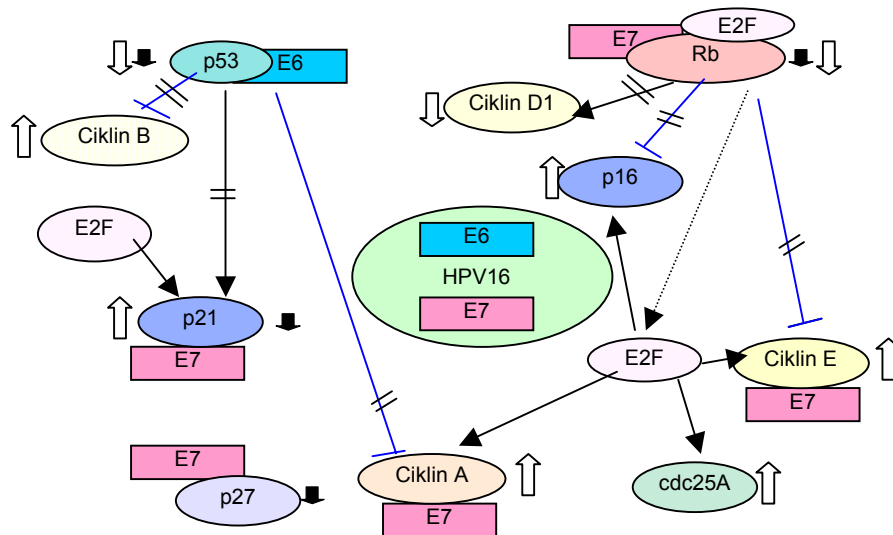
1. ábra
A HPV16 genomi szerveződése
P₉₇: fő korai promóter, A_E és A_L: korai és késői poliadenilációs szignál
(Shah, 1996)

Az E1 ORF terméke egy 68 kDa méretű helikáz és ATP-áz aktivitással rendelkező foszfoprotein. Specifikusan kapcsolódik a vírus replikációs origójához, emellett a celluláris DNS-polimeráz α -primáz kötésével biztosítja a replikáció elindításához és az elongációhoz szükséges celluláris faktorokat (Yang et al, 1993; Park et al, 1994). Az E2 fehérje egy

N-terminális elhelyezkedésű transz-aktivátor domént, egy centrális kapcsoló régiót és egy, a DNS kötéséhez szükséges C-terminálist tartalmaz (Giri and Yaniv, 1988; Yang and Botchan, 1990). Járulékos szerepe van a virális DNS replikációjában: növeli az E1 fehérje kötődési affinitását az ori-elemhez, tehát stimulálja az E1 replikációt indító szerepét (Yang et al, 1991). Ezen kívül alacsony koncentrációban transz-aktivátorként a P₉₇-es promóteren keresztül növeli az E6 és E7 mRNS-ének mennyiségét, míg magasabb koncentrációban ugyanezekre a génekre gátló hatást fejt ki (Bouvard et al, 1994). Az E2 protein represszor hatása a korai promóterre az LCR két proximális helyzetű E2 kötőhelyén keresztül valósul meg azáltal, hogy eltávolítja a promóter mellől a pozitív hatású Sp-1 transzkripció faktorot. A fehérje befolyása a P₉₇-re függ az E2 ORF alternatív splicingjától is (Romanczuk and Howley, 1992). Az E4 ORF a korai régióon belül helyezkedik el, a fehérje expressziója viszont a HPV16 szaporodási ciklusának késői fázisára korlátozódik. Szerepe a produktív infekcióban van ama tulajdonságának köszönhetően, hogy kötődve a gazdasejt citokeratin hálózatához annak összeomlását idézi elő, így segítve a vírus kiszabadulását a sejtmagból (Doorbar et al, 1991). Az E5 gén terméke egy 44 aminosavból felépülő hidrofób transzformáló fehérje, mely a sejtmembránba épülve képes kapcsolatba lépni növekedési faktorok receptoraival (EGF-R, PDGF-R), és aktiválni azokat (Turek, 1994). Az E5 fehérje a HPV-pozitív malignus daganatokban nem expresszálódik, így valószínűleg csak a benignus elváltozások kialakulásában lehet szerepe (Tsai and Chen, 2003).

A HPV16 két legfontosabb transzformáló fehérjéje az E6 és E7 protein. Mindkét fehérje expressziója szükséges (és elégséges) a primer keratinociták hatékony immortalizációjához, melynek során fokozott proliferációjú, a terminális differenciációra rezisztens klónok alakulnak ki (Münger et al, 1989). Mivel a papillomavírusok nem expresszálnak virális polimeráz enzimet, a celluláris proliferáció fenntartása elősegíti a virális genom replikációját. Az E6 fehérje egy mediátor proteinen (E6-associated protein, E6AP) keresztül serkenti a celluláris p53 tumorszuppresszor fehérje ubiquitin-függő lebontását, így fejt ki transzformáló hatását (Stoppler et al, 1996). Gátolja a p53 kapcsolódását a célgénnek megfelelő szekvenciáival, ezen kívül kötődik a p300/CBP molekulához, amely a p53 fehérje koaktivátora (Lechner and Laimins, 1994; Zimmermann et al, 1999). A p53 tumorszuppresszor fehérje mutagén anyagok hatására, vagy más okból bekövetkező DNS-károsodás esetén aktiválja a p21^{CIP1/WAF1} ciklin-dependens kináz (CDK) inhibítort (CDI), mely a ciklin E/CDK2, és a ciklin A/CDK2 gátlása révén G₁ fázisban megállítja a sejtciklust (el Deiry et al, 1993) (2. ábra). A p53 aktivitás megszüntetése lehetőséget teremt a genomi instabilitás és az abnormális sejtosztódás létrejöttéhez. Az E6 fehérje transzaktiváló

funkcióval is rendelkeznek: számos gén promóterére fejt ki aktiváló (adenovírus E2 promóter, herpes simplex vírus timidin kináz promóter, c-fos, c-myc) vagy represszáló (Moloney egér leukémia vírus LTR, CMV nagyon korai promóter) hatást (Sedman et al, 1991; Etscheid et al, 1994).



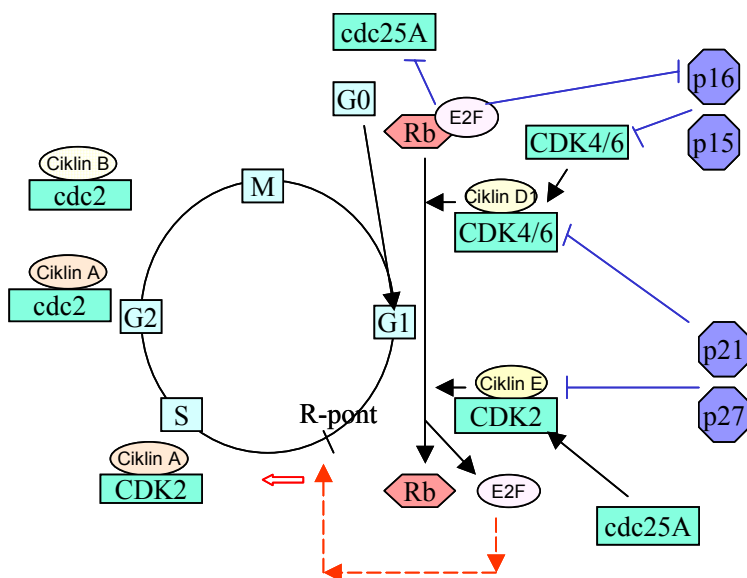
2. ábra

A HPV16 E6 és E7 onkoproteinjének hatása a p53 és Rb tumorszuppresszor proteinekre

A szaggatott vonal jelzi az E2F felszabadulását, a kövér nyilak a tumorszuppresszor funkció inaktíválódását, az üres nyilak pedig az adott fehérje mennyiségében az E7 hatására bekövetkező változásokat mutatják. A kék nyilak gátló funkciót, a feketék aktiválást jelölnek, a kettős vonal a jelzett funkció megszüntetésére utal.
(Milde-Langosch and Riethdorf, 2003 - 3. ábrája alapján)

Az E7 gén terméke egy 98 aminosav méretű foszfoprotein. C-terminálisa felelős a dimer-és multimer képzésért, illetve a cink kötésért (Clemens et al, 1995; Barbosa et al, 1989). Az N-terminális tartalmazza az LXCXE motívumot, melynek révén képes kapcsolódni az ún. 'pocket' proteinekhez (retinoblasztoma fehérje, p107, p130) (Lee et al, 1998). Ebben a régióban található a kazein kináz II (CKII) foszforilációs hely is (Barbosa et al, 1990). A HPV16 patogenitásában betöltött szerepe DNS-szintézist indukáló hatásában nyilvánul meg (Woodworth et al, 1992). A hypofoszforilált retinoblasztoma proteinhez (Rb) kapcsolódva megakadályozza annak az E2F transzkripciós faktorhoz való kötődését, a szabad E2F1 hatására pedig a sejt beléphet az S fázisba, tehát képes immortalizálódni (Dyson et al, 1989). A retinoblasztoma fehérje az egyik legfontosabb tumorszuppresszor protein. Tumorszuppresszor hatásában fontos szerepe van az ún. pocket doménnek, melyhez LXCXE motívumot tartalmazó celluláris, illetve virális fehérjék kötődhetnek (HDAC1, HDAC2, ATP-áz, illetve HPV E7, adenovírus E1A, SV40 T antigén) (Brehm et al, 1998; Dyson et al,

1989; Whyte et al, 1988; Ludlow et al, 1989). Hypofoszforilált, aktív formája a nyugvó vagy differenciálódott sejtekben domináns, míg az osztódó sejtekben hyperfoszforilált formában van jelen (Ezhevsky et al, 1997). Az E2F transzkripciós faktorok családjába 6 fehérje (E2F1-6) tartozik, amelyek bioaktív formájukban a DP1 vagy a DP2 molekulával képeznek dimereket (Helin et al, 1993). Számos, a DNS szintéziséhez szükséges gén (DNS-polimeráz, dihidrofolát reduktáz, timidin kináz, timidilát szintetáz, ciklin A, ciklin E, CDC2, cdc25A) aktivitását befolyásolják, ezen kívül az apoptózis és a szenescencia folyamataiban is részt vesznek (Johnson et al, 1993; Vigo et al, 1999; Ohtani et al, 1995). A hypofoszforilált Rb a sejtciklus G₁ fázisában megköti az E2F1-et, így egy represszor hatású komplex jön létre. Ehhez a komplexhez hiszton-deacetilázok (HDAC) kapcsolódhatnak, melyek acetyl-csoportokat távolítanak el a hisztonokról, ezáltal kondenzálódnak a nukleoszómák, és gátlódik a génexpresszió (Luo et al, 1998; Wolffe and Hayes, 1999). A G₁ fázis végén a ciklin D-CDK4/6 komplex hatására a HDAC leválik a retinoblasztoma fehérjéről, az Rb foszforilálódik, E2F1 szabadul fel, és lehetővé válik az S fázishoz szükséges gének átírása (Harbour et al, 1999) (3. ábra). Mivel a HPV16 E7 proteinje a hypofoszforilált Rb-t köti, az E2F faktorok szabadok maradnak, és folyamatos aktiváló hatásuk miatt a fertőzött sejt újra és újra belép a sejtciklus S fázisába (Münger et al, 2001). Az E7 ezen kívül képes közvetlenül gátolni a p21^{CIP1/WAF1}, illetve a p27^{KIP1} CDI molekulát, így a differenciálódott, illetve bizonyos citokinek miatt nyugalomban lévő keratinociták ismét osztódni kezdenek (Zerfass-Thome et al, 1996; Funk et al, 1997) (2. ábra). A fertőzött sejtekben még nem teljesen tisztázott mechanizmussal az E7 protein abnormalis centroszóma-duplikációt idéz elő, mely genomi instabilitáshoz és aneuploiditáshoz vezethet, így a HPV egy újabb lépéssel közelebb juttatja gazdasejtjeit a daganatos folyamatok progressiójához (Duensing et al, 2000).



3. ábra

A sejtciklus szabályozásában résztvevő fehérjék kölcsönhatásainak sematikus ábrázolása

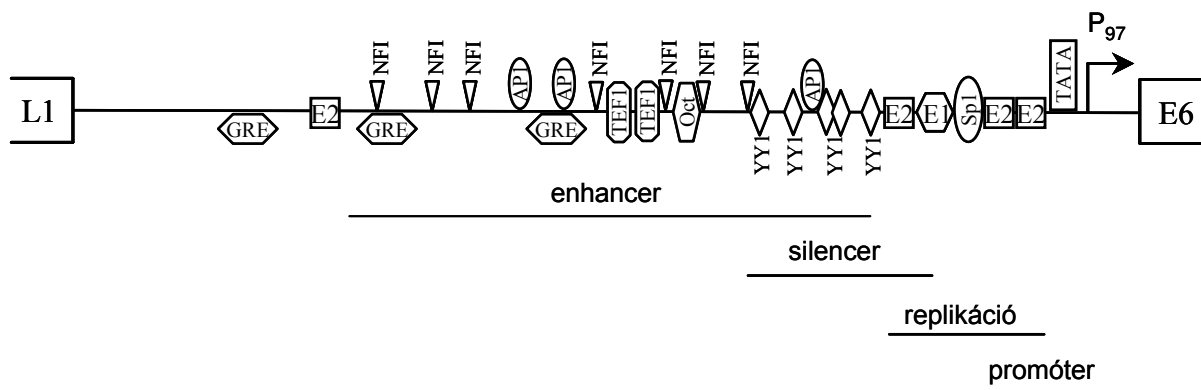
A sejtciklus adott fázisára specifikus ciklinek sárgával, kinázaik (CDK) zölddel, míg a CDI molekulák kékekkel vannak feltüntetve. A kék nyilak gátló, míg a feketék aktiváló hatást jeleznek, a piros nyilak pedig az E2F hatását mutatják.

(Milde-Langosch and Riethdorf, 2003 - 1. ábrája alapján)

A késői ORF-ek csak a produktívan fertőzött sejtekben expresszálódnak. A vírus fehérjéinek 80 %-át kitevő L1 fő kapszidfehérje konzervatív szerkezetű, 55 kDa molekulású. Az L2 régió kevésbé konzervatív, a mellék kapszidproteint kódolja (Pfister, 1984).

A 850 bp méretű LCR-t nevezik még nem kódoló régiónak (non-coding region, NCR), és 'upstream' szabályozó régiónak (upstream regulatory region, URR) is. A HPV16 LCR tartalmaz virális E1 és E2 kötőhelyeket, illetve különböző transzkripciófaktorokra specifikus szekvenciákat is (activator protein-1, AP-1; nuclear factor 1, NF1; transcriptional enhancer factor-1, TEF-1; glucocorticoid responding element, GRE; octamer binding factor-1, oct-1; yin-yang 1, YY1; CCAAG-displacement protein, CDP) (O'Connor et al, 1998; O'Connor, 2000). Az YY1 414 aminosav méretű cink-ujj fehérje. Működhet represszorként, transzkripcióaktivátorként, illetve *in vitro* szerepe lehet a transzkripció iniciációjában is (Shi et al, 1997). A CDP/Cut represszáló hatásáért két mechanizmus felelhet: vagy aktivátor molekulákat távolít el, vagy pedig a HDAC1-hez kötődve megváltoztatja a nukleoszóma szerveződését (Li et al, 1999). A TATA-box, az Sp1 és az AP-1 feltétlenül szükséges a virális transzkripcióhoz (Thierry et al, 1992). Az LCR centrális része egy szövetspecifikus enhancer régió felel meg, mely csak epithel sejtekben aktív. Ezért a specifikus tropizmusért az AP-1, az NF1, a glükokortikoid receptor és a TEF-1 pozitív hatása, illetve az Oct-1, a p53, és

a retinsav-receptor negatív szabályozó hatása felelős. Az LCR-ben található a matrix attachment region-nek (MAR) nevezett szakaszon kívül a vírus replikációs origója és a P₉₇-es fő korai promóter is (Desaintes and Demeret, 1996). A MAR a celluláris DNS és a nukleáris mátrix között teremt kapcsolatot specifikus szekvenciákon keresztül (Tan et al, 1998). Celluláris funkciója mellett a virális DNS fizikai állapotától függően pozitívan vagy negatívan befolyásolja a P₉₇ promóter transzkripció aktivitását: episzómális forma esetén represszorként, míg integrálódott vírusgenom esetén aktivátorként működik (Stunkel et al, 2000).



4. ábra

A HPV16 LCR felépítése

Az ábrán az LCR-ben található celluláris és virális proteinek kötőhelyei vannak feltüntetve a szabályozó régió funkcionális szakaszai mellett.

2. A humán papillomavírusok patogenitása

A papillomavírusok szigorúan fajspecifikusak, nincs ismert példa a fajok közötti természetes transzmisszióra. A humán papillomavírusok csak a többrétegű felszíni hámokat fertőzik meg, és itt speciális tropizmussal rendelkeznek. Szaporodásuk korai és késői fázisa a hámsejtek differenciálódási stádiumaihoz kötött. A fertőzés a szaporodó bazális sejteket érinti, és a sejtekből kimutathatóak a korai virális géntermékek. Késői fehérjék csak a terminálisan differenciálódott, már nem osztódó epithel sejtekben figyelhetők meg (Howley, 2001). Szaporodásuk sejt differenciálódástól való függése miatt a papillomavírusok *in vitro* sejtenyészetben nehezen szaporíthatók, ami megnehezíti tanulmányozásukat (Taichman et al, 1983).

A humán papillomavírusok tropizmusuk alapján 3 csoportba sorolhatók.

1. A *kután típusok* általában benignus sejtproliferációt hoznak létre, de néhány típus kimutatható malignus daganatokból is. A bőrön elváltozást okozó HPV2 és HPV4 a közösleges szemölcs (verruca vulgaris) kialakulásáért felelős, bizonyos papillomavírusok (HPV1, 3, 6, 7, 10, 11, stb.) ritkább szemölcsfajtákban is megjelennek. A szemölcs legtöbbször változatos alakú, ártalmatlan, tranziens tumor; a hangszálakon megjelenő formája viszont életveszélyessé is válhat, mivel akadályozza a légzést. A szemölcsök többsége 2 éven belül spontán eltűnik, valószínűleg a celluláris immunválasznak köszönhetően (Leman and Benton, 2000).

2. Az *EV típusok* (HPV5 és HPV8, esetleg a HPV17, HPV20) az epidermodysplasia verruciformis (EV) nevű, ritka betegségben szenvedőket fertőzik. Ezekben az esetekben a beteg szervezete nem képes eliminálni a szemölcsöket, és a léziók ritkán rosszindulatúvá is válhatnak (Majewski et al, 1997).

3. A *genitális-mukozális típusok* megjelenhetnek a légző- és emésztőtraktus, illetve a nemi szervek mucosa sejtjeiben, illetve a genitális hámon. A HPV13 és HPV32 a szájüregben okoznak fertőzést, és focalis epithelialis hyperplasiát hoznak létre (Syrjanen, 2003). A genitáliák a humán papillomavírusok rezervoárjának tekinthetők: legalább 25 típust lehet innen kimutatni; ezek a leggyakoribb, szexuális úton terjedő virális ágensek. Az alacsony kockázatú (low risk) HPV6 és HPV11 inkább jóindulatú elváltozásokban vannak jelen (pl. condyloma acuminatum, genitális papillomák), és gyakoriak a légzőrendszer, a szájüreg és a conjunctiva infekciókban (Syrjanen, 2002). A magas kockázatú (high risk) humán papillomavírusokat (HPV16, 18, 31, 45) elsősorban méhnyakrákból izolálták (Munoz, 2000). A HPV fertőzéstől a daganat megjelenéséig több év, akár évtized is eltelhet, ezalatt a cervix neoplasiás elváltozásaiból több stádiumon keresztül alakul ki az invazív cervix carcinoma. A folyamat több jól elkülönülő szakaszból áll:

- CIN 1 (cervicalis intraepithelialis neoplasia) stádium \approx enyhe diszplázia
- CIN 2 stádium \approx közepes diszplázia
- CIN 3 stádium \approx súlyos diszplázia, és carcinoma in situ (CIS)

Az első stádium az újabb besorolások szerint az alacsony fokú SIL-nek (low grade SIL) (squamous intraepithelial lesion, laphámsejtes intraepitheliális lézió), míg a második a magas fokú SIL-nek (high grade SIL) felel meg. Az invazív carcinoma előtti stádiumokban mindig lehet regresszió, melynek valószínűsége fordítottan arányos a diszplázia fokával (Kurman et al, 1991).

3. A HPV DNS fizikai állapotának szerepe

A különböző kórképekben a vírus fizikai állapota is eltérő. A benignus léziókban a HPV inkább episzómálisan van jelen, míg a malignus formákban általában a gazdasejt genetikai állományába ékelődött. A HPV18 szinte mindig integrált formájú, a HPV16 esetében ez az arány 30-70 % között változik (Tidy et al, 1989). Az integrációkor a cirkuláris vírusgenom felnyílik, és az E2 gén (esetleg az E1 is) felhasad. Így a P₉₇ promóter felszabadul az E2 protein gátlása alól, és megindíthatja a transzformáló fehérjék termelését. Ezzel együtt a vírusgenom immortalizáló képessége is növekszik (May et al, 1994). Az episzómális vírusgenomot tartalmazó cervix carcinoma metasztázisait vizsgálva az innen izolált HPV16 néha rövidebbnek bizonyult, mint a vad típus. További kísérletekkel megállapították, hogy ezek a minták megnövekedett transzkripciós aktivitással rendelkeznek, valamint, hogy a mutáns vírusok az LCR-ben, a negatív hatású YY1 transzkripciós faktor kötőhelyén tartalmazzák a megfigyelt deléciókat. Tehát, míg az integrált genomú humán papillomavírus P₉₇-es promótere az E2 génszakasz kiesésével tehet szert megnövekedett transzkripciós aktivitásra, az episzómális formájú HPV16 az YY1 célszekvenciák mutációja révén mentesülhet a celluláris represszió alól (O'Connor et al, 1996; Dong et al, 1994).

4. A papillomavírusok rendszerezése

A papillomavírusokat gazdaszervezetük és DNS szekvenciájuk hasonlósága alapján rendszerezik. Egy humán papillomavírus akkor számít új típusnak, ha az E6, E7 és az L1 ORF bázissorrendje kevesebb, mint 90%-ban egyezik meg a már ismert típusok megfelelő szekvenciáival. Az egyes típusokon belül variánsokat vagy intratípusokat is elkülönítenek a rendszerezők. Intratípusos eltérésekről akkor van szó, ha a HPV említett régióinak bázissorrendje maximum 2 %-ban tér el az alaptípustól (Xi et al, 1997). A HPV16 európai (E) prototípusán kívül 2 afrikai (Af1 és Af2), egy ázsiai (As), egy ázsiai-amerikai (AA) és egy észak-amerikai (NA1) variáns ismeretes. Az európai prototípushoz tartozó minták döntő többsége Európából, esetleg Észak-Amerikából származik. A délkelet-ázsiai minták mutatják az ázsiai variáns jellegzetességeit, míg Közép- és Dél-Amerika, illetve Spanyolország HPV16 izolátumai alkotják az ázsiai-amerikai intratípust (Yamada et al, 1997). Az intratípusok onkogén kockázata eltérő: a nem európai (főleg az ázsiai-amerikai) variánsok gyakrabban detektálhatóak magas fokú neopláziás elváltozásokban, mint a prototípus (Xi et al, 1997). A jelenség hátterében az állhat, hogy az ázsiai-amerikai variáns LCR régiója nagyobb

transzkripciós aktivitással rendelkezik, és E6 proteinjének is nagyobb a transzformáló képessége (Stoppler et al, 1996; Veress et al, 1999).

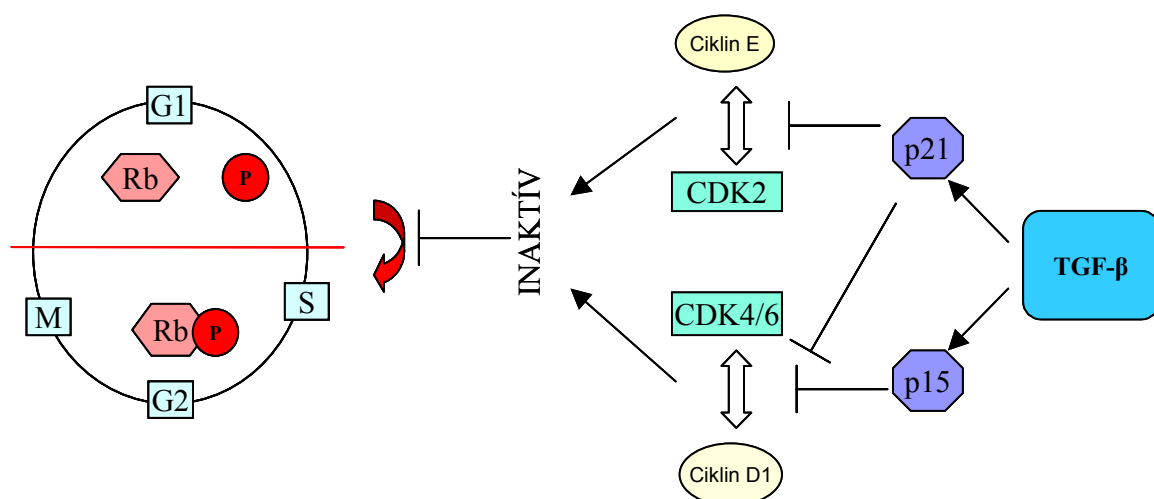
5. A TGF- β szerepe a malignus folyamatok létrejöttében

A cervix carcinoma kialakulásához a HPV-fertőzésen kívül celluláris események is hozzájárulnak, melynek hatására több rákmegelőző állapoton keresztül invazív karcinóma fejlődhet ki. A betegség megjelenésében jelentős szerepe van a gazdaszervezet immunológiai és genetikai hátterének, citokineknek, növekedési faktoroknak, illetve egyéb kofaktoroknak (szexuális szokások, dohányzás, hormonális hatások) is (Schneider, 1994).

A transzformáló növekedési faktor- β 2 (transforming growth factor- β 2, TGF- β 2) a TGF- β citokincsalád tagja. A citokincsaládba több mint 40 fehérje (pl. aktivin, inhibin, dorsalin, nodal, csont morfogenetikus proteinek) tartozik a TGF- β 5 izoformája mellett. A TGF- β izoformák közül emlős szövetekben csak a TGF- β 1, - β 2 és - β 3 fordul elő. Biológiai funkciójuk sokrétű: részt vesznek az embrionális morfogenezisben és differenciálódásban, a sebgyógyulásban, az apoptózisban, stimulálják az angiogenezist, a sejt migrációt és sejtadhéziót (Massague, 1998). A bioaktív TGF- β két 12,5 kDa-os peptid homodimerje, melyek szulfhidril csoporttal kapcsolódnak össze. A pro-TGF- β molekulából endopeptidázok hatására jön létre a monomer, mely egy másik monomerrel és egy fehérjével (latency binding protein, LBP vagy latency associated protein, LAP) látens dimer komplexet képez, és a vérlemezkékben, illetve az extracelluláris mátrixban tárolódik (Clark and Coker, 1998). Az LAP fontos a TGF- β hatékony szekréciójához, megelőzi a sejt felszíni receptorokhoz való kötődést, és a fehérje szerkezetének stabilizálásában is szerepet játszik. A látens komplex aktiválásában proteinázok és a gyulladások helyén felszabaduló elasztázok vesznek részt (Munger et al, 1997). A különböző TGF- β izoformák szövetspecifikus módon expresszálódnak, és hatásuk eltérhet a sejtípustól és a sejt ciklustól függően. A TGF- β 1 főleg endotheliális, hematopoetikus és kötőszöveti sejtekben, a TGF- β 2 epitheliális és neuronális, míg a TGF- β 3 főleg a mesenchymális sejtekben van jelen (Massague, 1998). Az eltérő expressziós mintázat kialakulását a TGF- β 2 és TGF- β 3 promóterében jelenlévő TATAA szekvenciák, CRE-ATF kötőhelyek (O'Reilly et al, 1992; Lafyatis et al, 1990), illetve a TGF- β 1 promóterében jelenlévő regulációs helyek teszik lehetővé (Kim et al, 1990). A TGF- β szignalizációs út szabályozásának megváltozása számos betegségben (arthritis, atherosclerosis, glomerulonephritis, öröklött telangiectasia) és a carcinogenezis során is

megfigyelhető (Hu et al, 1998). A transzformáló növekedési faktoroknak 3 fő receptoruk van: a T β RI (TGF- β receptor I), a T β RII és a T β RIII. Ezeken kívül epithel sejteken előfordul az endoglin receptor is. A ligand először a T β RII-höz kapcsolódik, mely szerin-treonin (Ser-Thr) kináz aktivitása révén foszforilálja a T β RI-et. Ez utóbbi szintén Ser-Thr kináz aktivitással rendelkezik, illetve a citoplazmatikus doménjéhez kapcsolódó glutation-S-transzferáz miatt autofoszforilációra is képes. Az aktivált T β RI R-Smad molekulákat (Smad2, Smad3) aktivál, melyek a Smad4-en keresztül a sejtmagba jutnak, és megindulhat a célgének expressziója (Heldin et al, 1997). A T β RIII a szignalizációs folyamatokban közvetlenül nem vesz részt, de befolyásolja a T β RI és T β RII aktivitását (Pasche, 2001).

A TGF- β karcinogenezisben betöltött szerepe kettős. Normál epithel sejtekben tumorszuppresszorként funkcionál: gátolja a proliferációt, illetve serkenti a differenciálódást és az apoptózist azáltal, hogy sejtciklus-inhibitorokat (p15^{INK4B}, p21^{CIP1/WAF1}) indukál. Ezen kívül gátolja a G₁ ciklinek aktivitását: csökkenti a CDK4 expresszióját, illetve a p27-en keresztül gátolja a CDK2 funkcióját is (Ewen et al, 1993; Laiho et al, 1990) (5. ábra). Megnövekedett TGF- β -szint hatására viszont a tumorsejtek fokozott inváziós és migrációs képességre tesznek szert, és fokozódik az angiogenezis (Wakefield and Roberts, 2002). A karcinogenezis korai stádiumaiban az epithel sejtek még érzékenyek a TGF- β sejtciklus-szabályozó hatására, míg a későbbi stádiumokban ez az érzékenység irreverzibilisen eltűnik (Roberts and Sporn, 1992). Ebben a folyamatban a T β RII mutáció miatti inaktivációja dominál (Markowitz and Roberts, 1996).



5. ábra

A TGF- β által létrehozott G₁ blokk sematikus ábrázolása

A p15 és p21 CKI hatására a ciklin D1-CDK4/6, illetve a ciklin E-CDK2 komplex inaktív marad, és a sejt nem lép az S fázisba.
(Hu et al, 1998 - 3. ábrája alapján)

6. A TGF- β 2 és a HPV16 kapcsolata

A humán papillomavírusok replikációs ciklusa szoros összefüggésben áll a keratinociták differenciálódási folyamatával. A vírus az osztódó bazális sejteket fertőzi meg, és itt történik a korai gének expressziója is. A differenciálódott hámsejtekben lezajlik a vírusgenom replikációja, és a késői gének expressziója után létrejönnek az új virionok (Howley, 2001). Mivel a differenciálódott keratinocitákban már nincs celluláris DNS szintézis, az E6 és E7 protein teremti meg a virális DNS replikációjához szükséges feltételeket, azaz újra osztódásra készíti a gazdasejteket. A TGF- β 2 a keratinociták differenciálódása során indukálódik, és gátolja azok szaporodását (Glick et al, 1990). G₁ fázisban állítja meg a sejtciklust azáltal, hogy sejtciklus-inhibitorokat (p15^{INK4B}, p21^{CIP1/WAF1}) aktivál. Proliferációt gátló hatását a p53 és az Rb tumorszuppresszor molekula is aktiválja (Nees et al, 2000). Mivel így a papillomavírusok szaporodásának feltételei jelentősen romlanak, logikus feltételezni, hogy a HPV16 E6 és/vagy E7 proteinje beleavatkozhat ebbe a mechanizmusba. Nees és munkatársai (2000) megfigyelték, hogy a HPV16 E6 és E7 proteinje csökkenti a TGF- β 2 mRNS, illetve az aktív és a látens TGF- β 2 fehérje szintjét is primer keratinocita sejtekben. E modell alapján tehát a T β RII inaktivációja a cervikális karcinogenezis későbbi stádiumaiban következik be, a korai stádiumokban a keratinociták a HPV fertőzés miatt veszítik el érzékenységüket a TGF- β antiproliferatív hatásával szemben.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálatainkkal az alábbi kérdésekre kívántunk válasz adni:

1. A HPV16 genom cervix carcinomából izolált, természetes deléciós variánsaiban bekövetkezett mutációk milyen hatással vannak a variánsok transzkripciós aktivitására? Eltér-e a különböző HPV16 intratípusok transzkripciós aktivitása? Milyen hatással van a HPV16 E2 proteinje a deléciós variánsok transzkripciós aktivitására?
2. Milyen hatása van a HPV16 E6 és E7 onkogénjének a TGF- β 2 promóterére? Kapcsolódik-e a megfigyelt hatás a TGF- β 2 promóter bizonyos szakaszához?
3. A HPV16 onkoproteinjeinek hatása a TGF- β 2 promóterére összefügg-e a p53 vagy a retinoblasztoma tumorszuppresszor protein jelenlétével? Milyen celluláris proteinek játszhatnak még szerepet a tapasztalt hatás létrejöttében?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Polimeráz láncreakció (PCR)

Mindkét közlemény PCR reakcióihoz Pwo polimerázt (Roche Applied Science, Germany) használtunk, az amplifikáció során a gyártó cég ajánlásait követve. A PCR-hez használt primerek szekvenciáját az 1. táblázat tartalmazza. A Pwo előnye a Taq polimerázzal szemben, hogy az 5'-3' DNS-polimeráz aktivitás mellett 3'-5' exonukleáz (proofreading) aktivitással is rendelkezik, ami magasabb másolási hűséget eredményez. A 100 µl reakcióelegy 1x (MgSO₄-tartalmú) PCR puffert, 0,2-0,2 µg primert, 0,2-0,5 µg templát DNS-t, 200 µM dNTP-t és 2,5 U polimerázt tartalmazott reakciónként.

Az amplifikáció hőmérsékleti profilja (Hybaid HBTR3HLPS, UK) a következő volt:

(A. T.: anellációs hőmérséklet, a primereknek megfelelően)

94 °C	2 perc	1 ciklus
94 °C	15 másodperc	} 10 ciklus
A. T. °C	30 másodperc	
72 °C	2 perc	
94 °C	15 másodperc	} 25 ciklus
A. T. °C	30 + 10 másodperc	
72 °C	2 perc	
72 °C	2 perc	1 ciklus
35 °C	1 perc	1 ciklus

Templátok:

- pcDNA-16E6, pcDNA-16E7, pALuc-pt16LCR, pALuc-16P, pALuc-16PENH:
HPV16 prototípus genom, melyet Prof. Zur Hausen bocsátott rendelkezésünkre (Durst et al, 1983),
- 33LCR, 33LCRA1 és 33LCRA2, illetve 936LCR, 936LCRA1 és 936LCRA2:
A 33-as és 936-os HPV16-pozitív cervix carcinomás mintából kinyert DNS (Veress et al, 1999),
- pALuc-B2-445, pALuc-B2-352, pALuc-B2-251, és pALuc-B2-183, pGL2-Prom-B2-161:
pALuc-B2-528 plazmid.

Plazmid	Primer neve	Primer szekvencia (5' → 3')	Restriktációs hely
pALuc-pt16LCR	16-007	<u>ttctgcag</u> ACCTAGATCAGTTTCC	<i>PstI</i>
pALuc-33LCR	16LCR-R	gcgc <u>ggtacc</u> TTGCAGTTCTCTTTTGGTG	<i>KpnI</i>
pALuc-936LCR	16-014K	gcgc <u>ggtacc</u> ATGTATAAACTAAGGGCGT	<i>KpnI</i>
pALuc-16P	16LCR-R	gcgc <u>ggtacc</u> TTGCAGTTCTCTTTTGGTG	<i>KpnI</i>
pALuc-16PENH	16-7527	gcgc <u>ctgcag</u> AACTTGTACGTTTCCTGCTT	<i>PstI</i>
	16-7857	gtcag <u>gatcc</u> CACACCCATGTGCAGTTTTA	<i>BamHI</i>
pALuc-B2-445	TGFB2335	gcgc <u>ggtacc</u> CTTGTCAGGACGTTCTGGAG	<i>KpnI</i>
	TGFB1833	gcgca <u>agctt</u> AGAGGTAGGACATGAATTTA	<i>HindIII</i>
pALuc-B2-352	TGFB2335	gcgc <u>ggtacc</u> CTTGTCAGGACGTTCTGGAG	<i>KpnI</i>
	TGFB1926	gcgca <u>agctt</u> CACACATAATACAGGAGGGA	<i>HindIII</i>
pALuc-B2-251	TGFB2335	gcgc <u>ggtacc</u> CTTGTCAGGACGTTCTGGAG	<i>KpnI</i>
	TGFB2027	gcgca <u>agctt</u> CCTTCAACAGACCTGTCCAA	<i>HindIII</i>
pALuc-B2-183	TGFB2335	gcgc <u>ggtacc</u> CTTGTCAGGACGTTCTGGAG	<i>KpnI</i>
	TGFB2095	gcgca <u>agctt</u> TCCACCTCCTTCCTCCCTTA	<i>HindIII</i>
pGL2-Prom-B2-161	TGFB1742	gcgt <u>ggtacc</u> CAGCAGTTCACAAACAGAGG	<i>KpnI</i>
	TGFB1902	gcaactc <u>gag</u> CTAGTCTACTCAGGGCCAGG	<i>XhoI</i>
pcDNA-16E6	16E6FK	gcc <u>ggtacc</u> GAGAACTGCAATGTTTCAGG	<i>KpnI</i>
	16E6RE	gcgc <u>gaattc</u> ATTACAGCTGGGTTTCTCTA	<i>EcoRI</i>
pcDNA-16E7	16E7FE	gcgc <u>gaattc</u> AAACCCAGCTGTAATCATGC	<i>EcoRI</i>
	16E7RX	gcgc <u>ctcag</u> TGGTAGATTATGGTTTCTGA	<i>XhoI</i>

1. táblázat

A táblázatban az I. és II. közleményben alkalmazott plazmidok elkészítéséhez szükséges primerek szekvenciája és a klónozáshoz használt restriktációs enzimek vannak feltüntetve.

2. Plazmidok, klónozás

Az I. közleményben a 33-as és 936-os minta teljes és 2-2 természetes deléciós variánsának LCR régióját (33LCR, 33LCR Δ 1, 33LCR Δ 2, 936LCR, 936LCR Δ 1 és 936LCR Δ 2) cervix carcinomás mintából szaporítottuk fel a 16-007 és a 16LCR-R primerek segítségével (1. táblázat). Ugyanezt a primerpárt használtuk a prototípus HPV16 LCR régiójának (7003 - 104 bp) felszaporításához is. Az amplimereket a Qiaquick PCR Purification kittel (QIAGEN, Germany) tisztítottuk, KpnI és PstI (Promega, USA) restriktációs enzimmel emésztettük, újra tisztítottuk, majd KpnI és PstI enzimekkel emésztett pUC19 (Promega, USA) vektorba

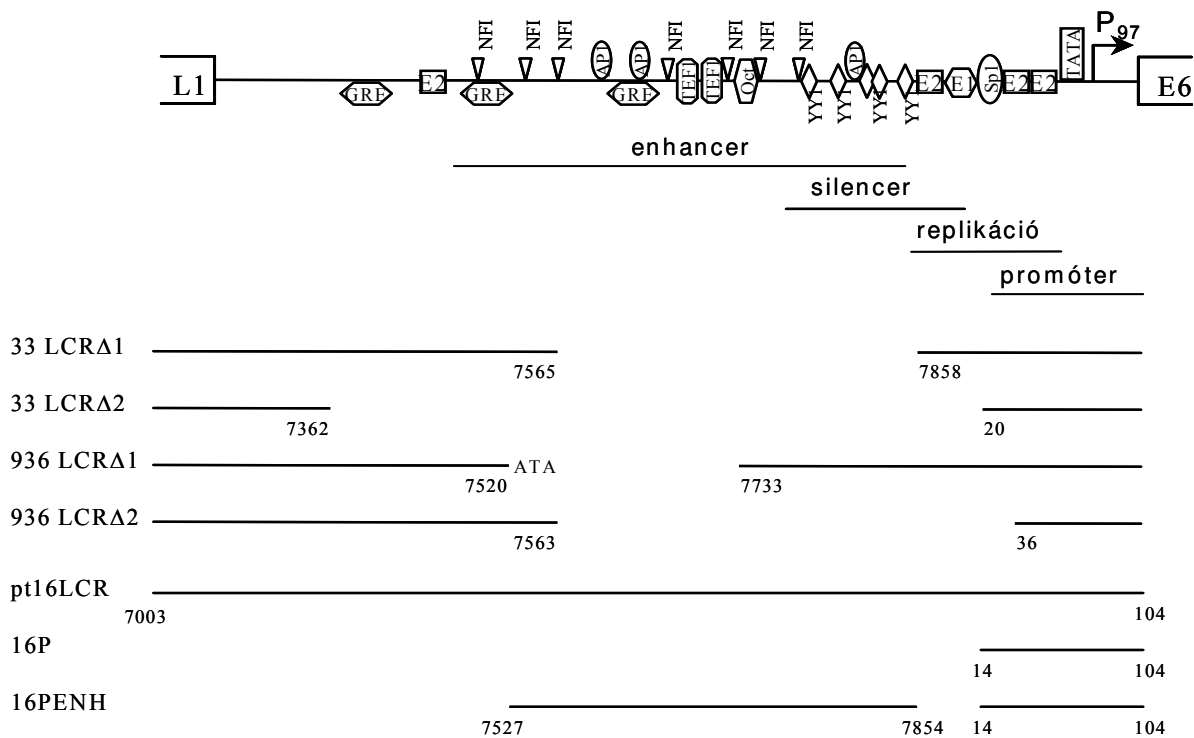
klónoztuk, és szekvenáltuk. A szekvenált plazmidokat transzfekciós kísérleteinkhez pALuc reporter vektorba klónoztuk megfelelő restrikciós emésztés és tisztítás után. A ligálás minden esetben 200 U T4 DNS-ligáz (New England Biolabs, USA) segítségével történt 16°C-on 16 óráig. A plazmidokat *E. coli* XL1 törzsében szaporítottuk, izolálásukhoz pedig a Wizard Plus Midipreps DNA Purification System-et (Promega, USA) használtuk. A pALuc-16P plazmid a HPV16 P₉₇ korai promóterét (14 - 104 bp), a pALuc-16PENH plazmid pedig a szövetspecifikus enhancer régiót (7527 - 7854 bp) tartalmazza a P₉₇ fő korai promóter elé klónozva (6. ábra).

A pC18Sp1-Luc vektor négy E2 és két Sp1 kötőhelyet, illetve a szentjánosbogár luciferáz génjét kódolja az adenovírus fő késői promótere elé klónozva. A pCMV1-16E2 plazmid az EcoRI restrikciós enzimmel emésztett pCMV1 eukarióta expressziós vektorba klónozva tartalmazza a teljes hosszúságú HPV16 E2 gént (2735 - 3873 bp) (Veress et al, 1999).

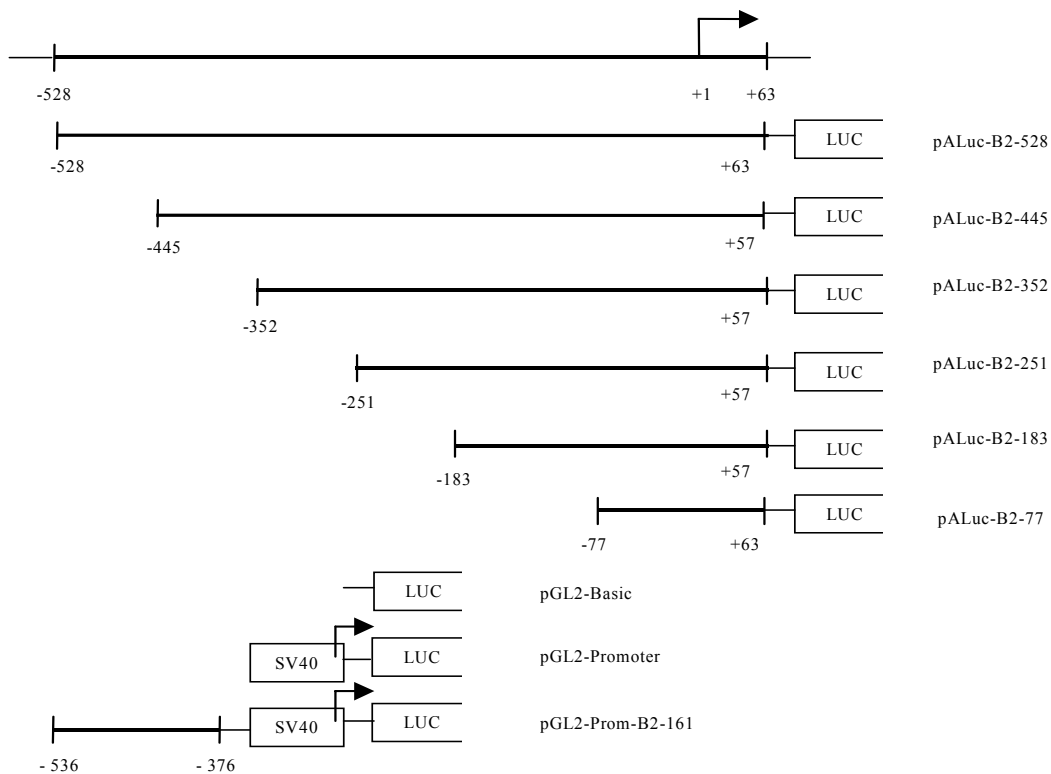
A II. közleményben használt, a TGF- β 2 promóter különböző hosszúságú darabjait magába foglaló p β 2-528 és p β 2-77 vektorokat pGEM4-SV0CAT plazmidba, HindIII és KpnI restrikciós hasítóhelyek közé klónozva kaptuk Dr. Seong-Jin Kim-től (O'Reilly et al, 1992). HindIII és KpnI restrikciós enzimmel történő hasítás után a promóter darabokat hasonló módon kezelt pALuc reporter vektorba klónoztuk. A pALuc-B2-445, pALuc-B2-352, pALuc-B2-251, és pALuc-B2-183 plazmidok létrehozásához templátként a pALuc-B2-528 plazmidot használtuk, és a kapott amplimereket megfelelő restrikciós enzimekkel történt hasítás után a pALuc reporter vektorba klónoztuk. A pGL2-Prom-B2-161 plazmid létrehozásához szintén a pALuc-B2-528 plazmidot alkalmaztuk templátként, és a kapott amplimert pGL2-Promoter vektorba (Promega, USA) klónoztuk restrikciós hasítás és tisztítás után (7. ábra).

A HPV16 E6, illetve E7 fehérjét kódoló szekvenciát PCR-es amplifikáció, restrikciós emésztés és tisztítás után pcDNA3.1+ (Stratagene, USA) eukarióta expressziós vektorba klónoztuk. A plazmidok elkészítéséhez szükséges primerek szekvenciáját az 1. táblázat tartalmazza. A PCR termékek tisztítása a Qiaquick PCR Purification kit-tel történt. A ligálás és a plazmidok izolálása a II. közlemény plazmidjai esetében is a fent említett módon zajlott.

A pAdE2luc reporter vektort Dr. Ann Roman-tól (Armstrong and Roman, 1997), a pcDNA-E2F-1 nevű E2F-1 expressziós plazmidot Dr. Douglas Cress-től (Croxtton et al, 2002), a vad típusú és mutáns E7 fehérjéket expresszáló (pMo, p16E7Mo, p24Gly, p26Gly, p31Arg, p58Gly, és p91Gly) plazmidokat Dr. Karen Vousden-től kaptuk (Edmonds and Vousden, 1989).



6.ábra
Az I. közleményben használt reporter vektorok sematikus ábrázolása



7. ábra
A II. közleményben használt reporter vektorok sematikus ábrázolása

3. Szekvenálás

Az I. közleményben az LCR variánsok (33LCR, 33LCRA1 és 33LCRA2, illetve 936LCR, 936LCRA1 és 936LCRA2) szekvenciáját T7 Sequencing kittel (Amersham Pharmacia, UK) ellenőriztük. 4 µg DNS-t 2 M NaOH segítségével denaturáltunk, 3 M-os Na-acetáttal és 96 %-os etanollal kicsaptuk, majd a DNS-hez 65°C-on 0,06 µg, a pUC19 vektorra specifikus primert (pUC-FOR , szekvenciája: 5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3', illetve pUC-REV, szekvenciája: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') hibridizáltattunk. A jelölő reakció 4 U T7 polimerázzal és 10 µCi $\alpha^{32}\text{S}$ dATP-vel történt. A terminációs reakció után a mintákat 6 % akrilamid / 7 M urea / 1xTBE denaturáló poliakrilamid gélen futtattuk 70 W-on 2x2 óráig. A szekvenáló gélt 1 óráig szárítottuk (Slab Gel Dryer EC355, E-C Apparatus Corporation, USA), majd röntgenfilmet helyeztünk rá. 16-24 órás, 4°C-os hőmérsékleten történő exponálás után a képet előhívtuk, és fixáltuk.

A II. közleményben a TGF- β 2 promóter különböző hosszúságú darabjait tartalmazó plazmidok, illetve a pcDNA-16E6 és pcDNA-16E7 plazmidok szekvenciáját ABI PRISM BigDye Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA) segítségével ellenőriztük. A szekvenáló PCR-hez 0,4 µg templát DNS-t, 0,02 µg primert és 8 µl TRR-mixet (Terminator Ready Reaction) használtunk.

A szekvenáló PCR hőmérsékleti profilja:

95 °C	2 perc	1 ciklus
95 °C	30 másodperc	} 25 ciklus
55 °C	15 másodperc	
60 °C	4 perc	

Szekvenáló primerek:

- pALuc-B2-445: GLP2 (szekvencia: 5'-CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA-3') és TGFB-1833
- pALuc-B2-352, pALuc-B2-251, és pALuc-B2-183: GLP2
- pGL2-Prom-B2-161: GLP1 (szekvencia: 5'-TGT ATC TTA TGG TAC TGT AAC TG-3')
- pcDNA-16E6 és pcDNA-16E7: T7PRP (5'-TAA TAC GAC TCA CTA T-3') és pcDNA-AS: (5'-TGA AAG GCA CAG TCG AGG-3')

A PCR terméket Dye-Ex Spin kittel (Qiagen, Germany) tisztítottuk, vákuum-centrifugán (AES 100 Automatic Environment Speed Vac, Savant, USA) liofilizáltuk, és 20 µl TSR-ben (Template Suppression Reagent) visszaoldottuk. 92°C-os denaturálás után a

szekvenálás ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) készüléssel történt.

4. Sejtkultúrák, tranziens transzfekció és luciferáz teszt

A tranziens transzfekciós kísérletekhez HeLa (ATCC CCL-2) HPV18-pozitív adenocarcinoma sejtvonalat, NIH/3T3 (ATCC CRL-1658) egér embrionális fibroblasztot, és C-33A (ATCC HTB-31) HPV-negatív cervix carcinoma sejtvonalat használtunk. A sejteket 10 % FBS-sel (fetal bovine serum; Invitrogene Corporation, New Zealand), 2 mM glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml streptomycinnel (Invitrogene Corporation, New Zealand) kiegészített DMEM-ben (Dulbecco's modified Eagle's medium; Sigma, USA) az I. közlemény kísérleteiben 6 cm, a II. közlemény kísérleteiben 3 cm átmérőjű sejttenyésztő plate-eken (Sarstedt, illetve Nunc) tenyésztettük. Átlagosan 70 % lefedettség elérése után a sejtekbe 2 µg reporter vektort és 1 vagy 2 µg expressziós plazmidot transzfektáltunk. A transzfekció a C-33A sejtek esetében kalcium-foszfátos módszerrel, a HeLa és a NIH/3T3 esetében Lipofectamine 2000-rel (Invitrogen Life Technologies, USA) történt. Az I. közlemény kísérleteiben a HeLa sejteket Lipofectamine-nal (Invitrogen Life Technologies, USA) transzfektáltuk. A sejteket 48 órával a transzfekció után Reporter Lysis Buffer-rel (Promega, USA), majd 1 fagyasztás-olvasztás ciklussal lizáltuk, és luciferáz tesztben (Luciferase Assay System, Promega, USA), luminométerrel (Digene Diagnostics DCR-1, USA) mértük a sejt-extraktumok luciferáz aktivitását. A luciferáz enzim szubsztrátjaival ATP vagy koenzim-A jelenlétében oxidációs reakcióban foton-felszabadulást indukál. A reporter vektorok a szentjánobogár luciferáz fehérjéjét kifejező *luc* gén előtt különböző, a transzkripciót befolyásoló szekvenciát tartalmaznak. A luciferáz gén aktivitásában (azaz a fotonok mennyiségében) bekövetkező változások ezeknek a szakaszoknak a transzkripcióra kifejtett hatásáról informálnak bennünket. A luciferáz teszt standardizálásához az I. közleményben β-galaktozidáz tesztet használtunk. A β-galaktozidáz teszt során a HeLa sejtekbe juttatott 1 µg pRSV-βGal plazmid aktivitását 1 mg/ml ONPG (orto-nitrofenil-β-D-galaktopiranóz) és a sejtek által kifejezett β-galaktozidáz enzim reagálásából létrejött színreakcióban 405 és 620 nm-en fotométerrel (Anthos htII, Biotest, Ausztria) határoztuk meg. A II. közleményben a luciferáz teszt standardizálásához Bradford tesztet használtunk, mert a HPV16 E6 proteinje a pRSV-βGal és a pCMV-βGal plazmidokra is transzaktiváló hatással volt. A Bradford tesztben a transzfektált sejtek extraktuma és a Bradford oldat

reakciója során az extraktum fehérjetartamának megfelelően színreakció jön létre, melyet 620 nm-en detektáltuk, majd az így kapott adatokkal standardizáltuk a luciferáz teszt adatait. Minden transzfekciós kísérletet legalább 3, független sorozatban végeztünk el. Az eredményeket átlagoltuk, és a megfelelő szórásértékekkel együtt ábrázoltuk.

EREDMÉNYEK

1. A HPV16 természetes deléciós variánsainak transzkripciós aktivitása (I. közlemény)

Egy korábbi tanulmány során (Veress et al, 1999) HPV16 variánsokat izoláltunk cervix carcinomás mintákból. Az LCR régió amplifikációja után a teljes hosszúságú szabályozó régió mellett néhány mintából rövidebb amplimereket is kimutattunk. A dolgozat alapjául szolgáló első közleményben a 33-as és 936-os minta teljes és 2-2 természetes deléciós variánsának (33LCR, 33LCR Δ 1 és 33LCR Δ 2, illetve 936LCR, 936LCR Δ 1 és 936LCR Δ 2) vizsgálatával foglalkoztunk.

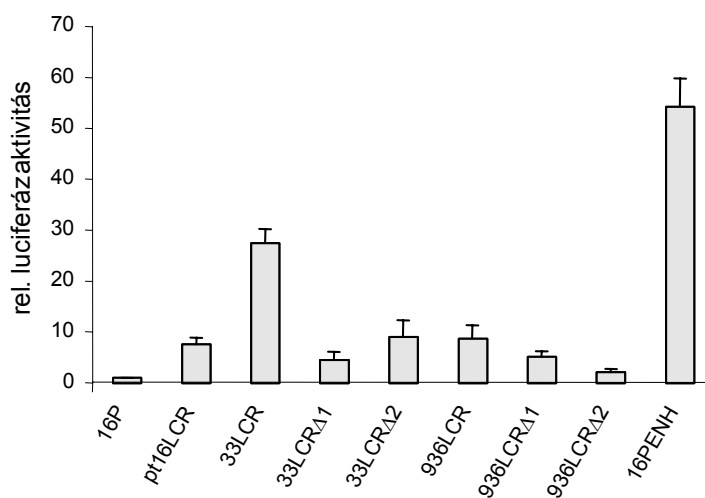
A deléciós variánsok szekvenálása

A részletesebb vizsgálatokhoz a 33-as és 936-os minta teljes és mutáns LCR régióját pUC19 vektorba klónoztuk, és szekvenáltuk. A HPV16 mindkét mintában episzómális formában volt jelen (Szarka et al, 2000). A HPV16 a szekvenálás alapján a 33-as mintában az ázsiai intratípusba sorolható, míg a 936-os minta HPV16-szekvenciája az európai prototípus képét mutatja. A szekvenálás során a deléciók mellett GRE, TEF-1 és NF1 kötőhelyeket érintő mutációkat is kimutattunk (a HPV16 referencia-szekvenciájához viszonyítva), ezek azonban mind a teljes, mind a rövidebb LCR-t tartalmazó variánsokban megjelentek (I. közlemény 1. táblázat). A 33LCR Δ 1 klónban 292 bp-os (7566 - 7857 bp) deléció következtében pozitív hatású elemek estek ki a silencer régió egy részével együtt. A 33LCR Δ 2-ben az 563 bp-os deléció (7363 - 19 bp) a teljes ismert ehancert, illetve a represszor hatású YY1 és CDP faktorokra specifikus szekvenciákat is érintette. A 936LCR Δ 1 variáns a 211 bp-os mutációt (7521 - 7732 bp) a szövet-specifikus enhancerben tartalmazta, a 936LCR Δ 2 klónban ezen kívül az YY1-dependens és a CDP/Cut-dependens silencer rész is elveszett az LCR régió 378 bázispár (7564 - 35 bp) hosszúságú szakaszának kiesése miatt (6. ábra).

A deléciós mutánsok transzkripciós aktivitása HeLa sejtekben

A deléciós variánsok transzkripciós aktivitásának vizsgálatához pALuc reporter vektorba klónoztuk a 33-as és 936-os izolátum eredeti hosszúságú és mutáns variánsait, és HeLa

sejtekbe transzfektáltuk őket (8. ábra). Pozitív kontrollként a HPV16 prototípusának szövetspecifikus enhancer régióját tartalmazó pALuc-16PENH plazmidot használtuk, egységnyi aktivitásúnak pedig a HPV16 P₉₇ promótert tartalmazó pALuc-16P plazmid transzkripció aktivitását tekintettük (8. ábra). A kontroll pALuc-pt16LCR plazmid a HPV16 teljes LCR régióját tartalmazza (6. ábra). Kísérleteinkben mások eredményeivel összhangban (Kammer et al, 2000) az ázsiai-amerikai variáns teljes hosszúságú LCR régiója (pALuc-33LCR) mintegy 3-szor nagyobb transzkripció aktivitással rendelkezett, mint az európai variánsok (pALuc-pt16LCR, illetve pALuc-936LCR) LCR régiója. A 33LCRΔ1 és 33LCRΔ2 jelű klónok a 33LCR-hez képest csökkent, de a pALuc-16P plazmidhoz képest viszonylag magas aktivitással rendelkeztek. Ez különösen a 33LCRΔ2 esetében volt meglepő, hiszen ez a mutáns tartalmazta a legnagyobb deléciót: az LCR régióból csak 210 bp maradt meg 5' helyzetben, az L1 3' vége mellett. A 936LCRΔ1 variáns transzkripció aktivitása kb. 50%-kal csökkent a teljes LCR régiót tartalmazó pALuc-936LCR-hez képest. A 936LCRΔ2 aktivitása nagyobb csökkenést mutatott: alig haladta meg a P₉₇ promótert tartalmazó pALuc-16P plazmid transzkripció aktivitását (8. ábra).



8. ábra
Az LCR variánsok transzkripció aktivitása HeLa sejtekben

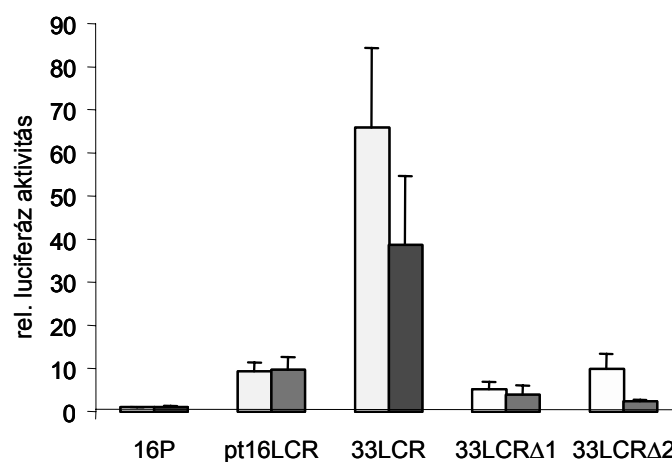
Az E2 fehérje hatása az ázsiai variáns deléciós mutánsainak transzkripció aktivitására

Az LCR régióban található 4 virális E2 kötőhelyből a 33LCRΔ2 variánsban kettő a deléció következtében kiesett, ezért megvizsgáltuk, hogyan hat a HPV16 E2 fehérjéje a különböző deléciós variánsok transzkripció aktivitására. A HPV16 E2 fehérjének szerepe

függ a virális DNS fizikai állapotától, mert az integrációkor a cirkuláris vírusgenom felnyílik, és az E2 gén felhasad. Mivel a 33-as és 936-os minta episzómálisan tartalmazta a HPV16 szekvenciát, az E2 fehérje transzkripcionálisan aktív maradhatott a HPV genomban.

Először azt kellett bizonyítanunk, hogy a transzfekeció során a HeLa kultúrában biológiailag aktív E2 protein fejeződik ki. Ehhez a prototípus HPV16 E2 fehérjét kódoló pCMV-pt16E2 plazmidot a pC18Sp1-Luc reporter vektorral együtt juttattuk a HeLa sejtekbe. A pC18Sp1-Luc vektor négy E2-, két Sp1 kötőhelyet és a szentjánosbogár luciferáz génjét tartalmazza az adenovírus fő késői promótere elé klónozva. Növekvő koncentrációban alkalmazva a pCMV-pt16E2 plazmidot a pC18Sp1-Luc vektor dózis-függő transzaktivációját tapasztaltuk (I. közlemény 3a. ábra).

Az E2 protein deléciós variánsokra gyakorolt hatását HeLa sejtvonalba, pCMV1 kontroll és pCMV1-pt16E2 plazmidok segítségével vizsgáltuk (9. ábra). A prototípus HPV16 LCR régiójának transzkripció aktivitására az E2 fehérje nem volt szignifikáns hatással. A pALuc-33LCR és a pALuc-33LCR Δ 1 plazmidok transzkripció aktivitása kis mértékben csökkent a virális E2 hatására, míg a 33LCR Δ 2 aktivitása szignifikáns csökkenést mutatott.

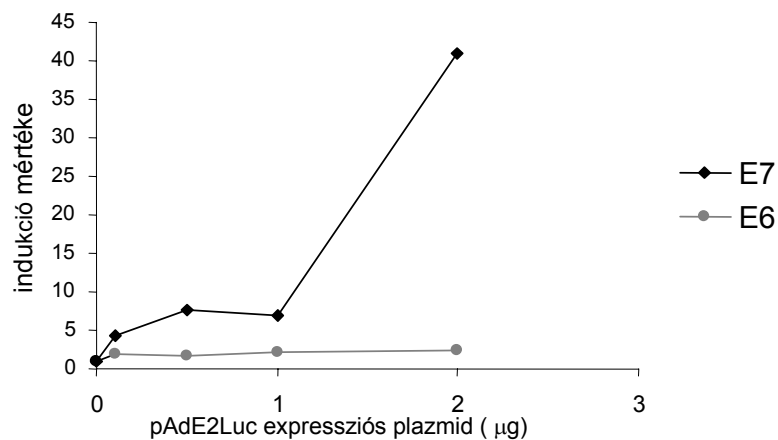


9. ábra
A HPV16 E2 proteinjének hatása az LCR variánsokra HeLa sejtvonalba

2. A HPV 16 E6 és E7 proteinjének hatása a TGF- β 2 promóter transzkripció aktivitására (II. közlemény)

M. Nees és társai 2000-ben kimutatták, hogy a HPV16 E6 és E7 fehérjéje csökkenti a TGF- β 2 mRNS-ének és fehérjéjének szintjét primer keratinocitákban. Mivel ebben a tanulmányban nem volt szó arról, hogy a virális onkogének hogyan hatnak a TGF- β 2 promóterére, II. közleményünkben kotranszfekciós kísérleteket végeztünk ennek kiderítésére.

Annak bizonyítására, hogy a pcDNA-16E6 és a pcDNA-16E7 expressziós plazmidjaink funkcionális E6 és E7 fehérjét fejeznek ki, NIH/3T3 sejtvonalba transzfektáltuk őket a pAdE2Luc vektor jelenlétében. Ez a vektor az adenovírus E2 promóterét (AdE2) tartalmazza a luciferáz gén elé klónozva. A HPV16 E7 fehérjéje az Rb/E2F komplexből felszabadítja az E2F1 transzkripció faktort, amely kötődik az AdE2 promóterben lévő E2F kötőhelyhez, és transzaktiválja a promótert. Transzaktiváló hatás figyelhető meg funkcionális HPV16 E6 jelenlétében is. Kísérleteinkben az E7 a koncentráció függvényében erősen aktiválta az AdE2 promótert, míg az E6 mérsékeltebb (2,5 – 3-szoros) transzaktiváló hatást mutatott (10. ábra).



10. ábra

Funkcionálisan aktív E6 és E7 fehérje expressziójának bizonyítása NIH/3T3 sejtekben

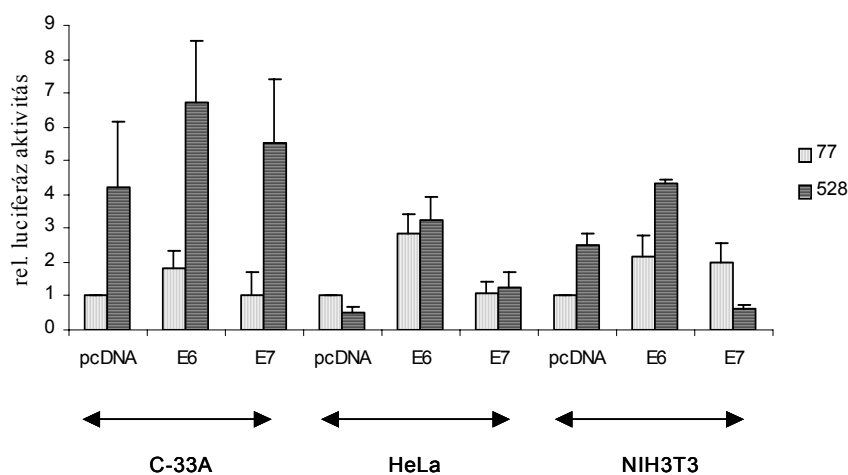
A HPV 16 E6 és E7 proteinjének hatása a TGF- β 2 promóter transzkripció aktivitására különböző sejtvonalakban

Mivel a TGF- β 2 szekrécióját a HPV16 E6 és E7 onkogénje p53, illetve Rb-függő útvonalon csökkenti (Nees et al, 2000), ezért kísérleteinkhez 3 különböző sejtvonalat használtunk. A C-33A kultúra nem tartalmaz papillomavírus szekvenciát, de a p53 mutáns

formában van jelen, a retinoblasztoma protein pedig abnormális méretű. A HeLa sejtekben a p53 és az Rb a HPV18 genom jelenléte miatt funkcionálisan inaktív. A NIH/3T3 kultúra egér embrionális fibroblasztból lett kialakítva, és biológiailag aktív p53 és retinoblasztoma fehérjét tartalmaz.

A kísérletekben használt, a TGF- β 2 promóter különböző hosszúságú darabjait tartalmazó reporter vektorok sematikus ábrázolása a 7. ábrán látható. Először a pB2-77 és pB2-528 plazmid transzkripciós aktivitását vizsgáltuk. Egységnyi aktivitásúnak a pB2-77 plazmid transzkripciós aktivitását tekintettük a pcDNA kontroll plazmid jelenlétében. A pB2-77 plazmid a TATA boxon kívül egy E-boxot és egy CRE (cAMP-response element) szekvenciát tartalmaz, míg a pB2-528 ezeken az elemeken kívül egy eddig részleteiben nem jellemzett 'upstream' szabályozó régióval is rendelkezik. A pB2-77 plazmid alapaktivitása – a transzfektált sejtek típusától függően – 30-150-szer nagyobb volt, mint az üres pALuc vektor alapaktivitása.

A C-33A sejtekben a HPV16 E6 és E7 fehérjéje gyenge aktiváló hatással volt a TGF- β 2 promóterének mindkét darabjára (11. ábra). A HeLa kultúrában az E6 erős transzaktiváló hatást mutatott mind a rövidebb, mind a hosszabb promóter szakasz esetében, míg az E7 fehérje csak a pB2-528 plazmid transzkripciós aktivitását emelte (11. ábra).



11. ábra
A HPV16 E6 és E7 fehérjéjének hatása a TGF- β 2 promóter transzkripciós aktivitására a különböző sejtvonalakban

Bár M. Nees és kollégái közleményében a funkcionálisan aktív p53-at és pRb-t kifejező keratinocitákban az E6 fehérje csökkentette a TGF- β 2 mRNS szintjét, a mi kotranszfekciós kísérletünkben az aktív p53-at tartalmazó NIH/3T3 sejtekben az E6 protein enyhén aktiválta a TGF- β 2 promóter transzkripciós aktivitását mind a pB2-77, mind a

pB2-528 plazmid esetében. Az E7 fehérje ezekben a sejtekben mérsékelten növelte a pB2-77 plazmid aktivitását, míg a pB2-528 aktivitását szignifikánsan (3-4-szeresen) gátolta (11. ábra).

Abban az esetben, ha az E7 fehérjét kifejező expressziós plazmidot növekvő mennyiségben adtuk kísérleti rendszerünkhöz, már kis koncentráció esetén tapasztaltuk ezt a gátló hatást (II. közlemény 3B. ábra).

Az E7 gátló hatásáért felelős régió meghatározása a TGF- β 2 promóterében

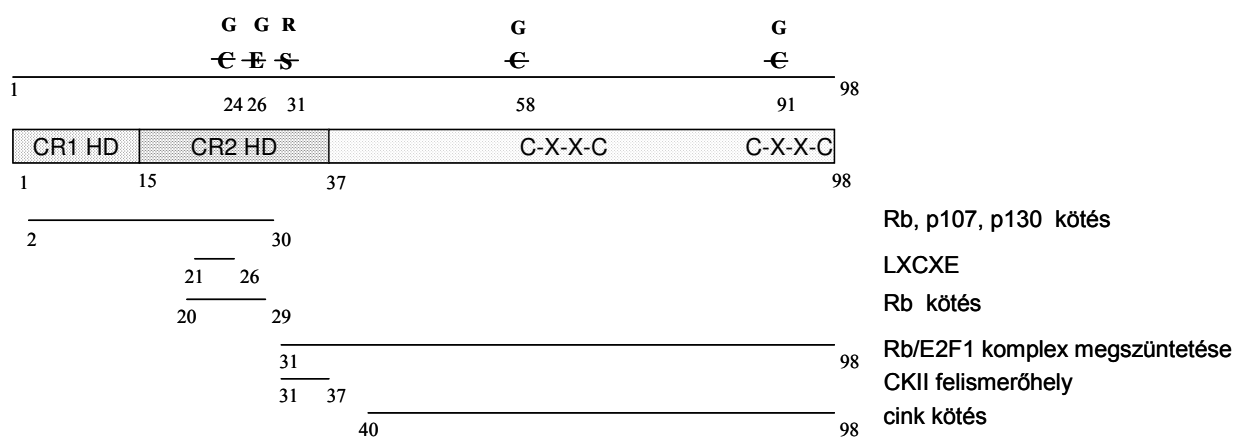
Az E7 gátló hatásáért felelős TGF- β 2 promóter-régió lokalizációjának pontosabb meghatározásához a pB2-528 plazmid felhasználásával különböző hosszúságú, de azonos 3' véggel rendelkező promóter darabokat klónoztunk a pALuc reporter vektorba, és NIH/3T3 sejtekbe transzfektálva vizsgáltuk, hogy milyen transzkripció aktivitással rendelkeznek ezek a plazmidok a papillomavírus E7 proteinjének jelenlétében, illetve hiányában. Egységnyi aktivitásúnak a pB2-528 plazmid transzkripció aktivitását tekintettük a pcDNA kontroll vektor jelenlétében. A pB2-77, pB2-183 és pB2-251 plazmidok aktivitása emelkedett az E7 protein hatására. A 352 bázispár hosszúságú promóter szakaszt tartalmazó, pB2-352 plazmid transzkripció aktivitása szignifikánsan csökkent az E7 hatására, bár a plazmid alapaktivitása is meglehetősen alacsony volt (valószínűleg egy transzkripció 'silencer' elem jelenléte miatt). Míg a pB2-445 plazmid aktivitását nem befolyásolta az E7 fehérje, a pB2-528 aktivitását szignifikánsan gátolta, mint ahogy az már előző kísérletünkben is történt (II. közlemény 4A. ábra). Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy a TGF- β 2 promóterében az E7 gátló hatásáért felelős régió a transzkripció kezdőhelyétől számított -528 és -251 nukleotid között található.

Hogy megerősítsük ezt az eredményt, heterológ - SV40 promóter - elé klónoztuk a gátló hatásért felelős TGF- β 2 promóter szekvenciát (-536 - -376), és tranziens transzfekció kísérletekben vizsgáltuk az így kapott pGL2-Prom-B2-161 plazmid transzkripció aktivitásában bekövetkezett változásokat. Egységnyi aktivitásúnak a pGL2-Basic reporter vektor alapaktivitását tekintettük a pcDNA kontroll plazmid jelenlétében. Az E7 protein nem befolyásolta szignifikánsan a pGL2-Prom vektor transzkripció aktivitását, míg a pGL2-Prom-B2-161 plazmid esetében az aktivitás kb. a felére csökkent (II. közlemény 4B ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a TGF- β 2 promóterében a HPV16 E7 gátló

hatásáért ez a szakasz felelős nemcsak természetes környezetében, hanem heterológ promóter mellett is.

Az E7 gátló hatásáért felelős molekuláris mechanizmusok vizsgálata

Következő kotranszfekciós kísérleteinkben arra kerestünk választ, hogy milyen fehérjék közvetíthetik a HPV16 E7 proteinjének gátló hatását. Az eddig ismertett eredményekből kitűnik, hogy a HPV16 E7 csak funkcionális Rb jelenlétében gátolja a TGF- β 2 promóterének transzkripciósi aktivitását. Különböző mutáns E7 fehérjéket expresszáló plazmidok segítségével kívántuk meghatározni, hogy ez a gátló hatás specifikus-e a retinoblasztoma fehérjére, vagy más pocket proteinek által is létrejöhet. A vad típusú és mutáns E7 fehérjéket kódoló szekvenciákat (pMo-16E7, p24Gly, p26Gly, p31Arg, p58Gly, és p91Gly) Moloney egér leukémia vírus LTR (long terminal repeat) régiója elé klónozva kaptuk dr. Karen Vousdentől (Edmonds and Vousden, 1989). A HPV16 E7 fehérje 24. (Cys→Gly) és 26. (Glu→Gly) aminosavánál bekövetkező mutációk a konzervatív Rb-kötőhelyet érintik, azonban 24. (Glu→Gly) mutáció nemcsak a retinoblasztoma kötését, hanem a p107 és p130 fehérjék kapcsolódását is megakadályozza. A 31. (Ser→Arg) mutáció az E7 kazein-kináz II foszforilációs helyét érinti, az 58. (Cys→Gly) és 91. (Cys→Gly) aminosavat megváltoztató mutációk pedig a Cys-X-X-Cys motívumot, ezáltal a cink-ujj struktúra kialakulását befolyásolják (12. ábra).



12. ábra

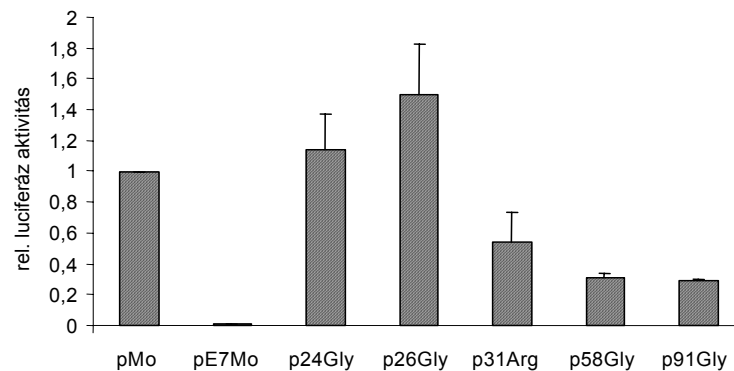
A HPV16 E7 protein doménjeinek sematikus ábrázolása

Az ábra felső részén a II. közleményben használt E7 mutánsok által tartalmazott aminosavcserék vannak feltüntetve. Az ábra alsó része az E7 protein néhány fontosabb biológiai funkciójáért felelős doménjét ábrázolja.

CR1 HD, CR2 HD: az adenovírus E1A proteinjének két konzervatív régiójával homológ domén;

C-X-X-C: cink-ujj struktúra kialakulásáért felelős szekvencia.

A NIH/3T3 sejtekben elvégzett transzfekciós kísérletek során egységnyi aktivitásúnak a pB2-528 plazmid transzkripciós aktivitását tekintettük a pMo kontroll vektor mellett. Azok az E7 mutánsok, amelyek az Rb-kötő képességükben sérültek (p24Gly és p26Gly), megszüntették az E7 fehérje TGF- β 2 promóterét gátló hatását. Mivel a p107-hez és p130-hoz kapcsolódni képes E7 mutáns (p26Gly) sem tudta gátolni a pB2-528 plazmid transzkripciós aktivitását, a kérdéses gátló hatás nem függ az E7 és a p107, illetve a p130 fehérje kapcsolódásától. A 31., 58., illetve a 91. aminosavat érintő mutációk nem szüntették meg az E7 gátló hatását, bár a transzkripciós aktivitás nem volt olyan kifejezett (2-3,5-szeres), mint a vad típusú E7-et expresszáló pMo-16E7 plazmid esetében (110-szeres) (13. ábra). Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy a HPV16 E7 TGF- β 2 promóteret gátló hatásához szükséges az E7 és az Rb kapcsolódása.



13. ábra
A mutáns E7 proteinek hatása a TGF- β 2 promóterének transzkripciós aktivitására NIH/3T3 sejtekben

Irodalmi adatokból tudjuk, hogy a HPV16 E7 és a hypofoszforilált retinoblasztoma fehérje kapcsolódása során E2F1 transzkripciós faktor szabadul fel az Rb/E2F komplexből. Amennyiben ez a folyamat zajlik le akkor is, amikor az E7 gátolja a TGF- β 2 promóterét, exogén E2F1 hatására is transzkripciós aktivitás-csökkenést kell tapasztalnunk. Következő kísérleteinkben E2F1 transzkripciós faktort expresszáló plazmidot (pcDNA-E2F1) juttattunk a NIH/3T3 sejtekbe a TGF- β 2 promóterének 528 bp méretű darabját tartalmazó pB2-528 plazmid jelenlétében, és vizsgáltuk a promóter transzkripciós aktivitásában bekövetkező változásokat. Kontrollként üres pcDNA plazmidot használtunk. Az ilyen módon expresszált exogén E2F1 a HPV16 E7 fehérjéhez hasonló mértékben (2,3-szorosan) gátolta a pB2-528 plazmid transzkripciós aktivitását (II. közlemény 6. ábra). Ezekből az eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az E7 valószínűleg az E2F1 Rb/E2F komplexből történő felszabadítása révén gátolja a TGF- β 2 promóterét.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. A HPV16 természetes deléciós variánsainak transzkripciós aktivitása (I. közlemény)

Egy korábbi tanulmány során (Veress et al, 1999) HPV16 variánsokat izoláltunk cervix carcinomás mintákból. Az LCR régió amplifikációja után a teljes hosszúságú szabályozó régió mellett néhány mintából rövidebb amplimereket is kimutattunk. A dolgozat alapjául szolgáló első közleményben a 33-as és a 936-os minta teljes és 2-2 természetes deléciós variánsának (33LCR, 33LCRA1 és 33LCRA2, illetve 936LCR, 936LCRA1 és 936LCRA2) vizsgálatával foglalkoztunk. A HPV16 a szekvencia-analízis alapján a 33-as mintában az ázsiai intratípusba sorolható, míg a 936-os minta HPV16-szekvenciája az európai prototípus képét mutatja. A szekvenálás során a deléciók mellett GRE, TEF-1 és NF1 kötőhelyeket érintő mutációkat is kimutattunk (a HPV16 referencia-szekvenciájához viszonyítva), ezek azonban mind a teljes, mind a rövidebb LCR-t tartalmazó variánsokban megjelentek. A 33LCR-ben a szekvenálás során talált, egyedi nukleotidot érintő mutációk között kiemelt fontosságú a 7729 A / C: ez a báziscsere gyakran előfordul a magasabb onkogén kockázatú ázsiai-amerikai variánsban, és egyes szerzők (Kammer et al, 2000) feltételezik, hogy - bár nem érinti egyetlen ismert transzkripciós faktor kötőhelyét sem - ez a mutáció felel az ázsiai-amerikai variáns LCR régiójának megnövekedett transzkripciós aktivitásáért.

A 33LCRA1 klónban 292 bp-os deléció következtében pozitív hatású elemek estek ki a silencer régió egy részével együtt. A 33LCRA2-ben az 563 bp-os deléció a teljes ismert ehancert, illetve a represszor hatású YY1 és CDP/Cut faktorokra specifikus szekvenciákat is érintette. A 936LCRA1 minta a 211 bp-os mutációt a szövet-specifikus enhancerben tartalmazta, a 936LCRA2 klónban ezen kívül az YY1-dependens és a CDP/Cut-dependens silencer rész is elveszett az LCR régió 378 bázispár hosszúságú szakaszának kiesése miatt.

Transzfekeciós kísérleteinkben mások eredményeivel összhangban (Kammer et al, 2000) az ázsiai-amerikai variáns teljes hosszúságú LCR régiója nagyobb transzkripciós aktivitással rendelkezett, mint az európai variánsok (prototípus HPV16, 936LCR) LCR régiója. Bár egy korábbi kísérletsorozatban (Veress et al, 1999) ez az aktivitás-különbség kb. 1,7-szeresnek adódott, transzfekeciós kísérleteinkben az ázsiai-amerikai variáns LCR régiója kb. 3-szor nagyobb transzkripciós aktivitással rendelkezett. Ez a különbség valószínűleg a tranziens transzfekecióhoz használt sejtkultúrák különbözőségéből eredhet. A 33LCRA1 és

33LCRA2 plazmidok a 33LCR-hez képest csökkent, de a HPV16 P₉₇ promóteréhez képest viszonylag magas aktivitással rendelkeztek. Ez különösen a 33LCRA2 esetében volt meglepő, hiszen ez a mutáns tartalmazta a legnagyobb deléciót: az LCR régióból csak 210 bp maradt meg 5' helyzetben, az L1 3' vége mellett.

A 33LCRA2 deléciós variánssal végzett transzfekciós kísérletek adatai alapján feltételezhető, hogy a HPV16 LCR régió 5' vége a HPV11-hez és HPV18-hoz hasonlóan egy transzkripciós enhancer szakaszt tartalmaz. Ez az enhancer biztosíthatja az E6/E7 onkogének transzkripcióját a centrális, szövetspecifikus enhancer hiánya esetén. Ebben az LCR-részben egy matrix attachment régió (MAR) található, mely a virális DNS fizikai állapotától függően pozitívan vagy negatívan befolyásolja a P₉₇ promóter transzkripciós aktivitását: epizómális forma esetén represszorként, míg integrációkor aktivátorként működik (Stunkel et al, 2000). Bár a mi esetünkben a transzfektált plazmidok epizómálisan voltak jelen, ez az 5' LCR régió mégis enhancerként funkcionált. A látszólagos ellentmondás háttérében az állhat, hogy míg mások kísérleteiben (Stunkel et al, 2000) az 5' LCR mellett jelen volt a centrális enhancer is, a 33LCRA2 variánsban ez deléció következtében teljesen kiesett. Az 5' LCR szakaszban található néhány AP1 kötőhely, amely felelős lehet a tapasztalt aktiváló hatásért. Az is lehetséges, hogy a 33LCRA2 variánsban bekövetkezett deléció az LCR nukleoszómális organizációját érinti, s csökkenti a CDP és a HDAC1 represszáló hatását. Érdeemes megemlíteni, hogy a HPV16 virális replikációs origójának a CDP/Cut-dependens silencer régiójával átfedő területe két deléciós variánsból is kiesett. Elméletileg lehetséges, hogy ezek a deléciós variánsok kis kópiaszámban vannak jelen a teljes hosszúságú LCR-t tartalmazó epizómális variánsok mellett, és a daganatos sejtekbe integrálódva replikálódnak. Az is elképzelhető, hogy az LCR-en kívüli szekvenciák is funkcionálhatnak replikációs origóként az epizómális vírusgenom számára.

Az LCR régióban található 4 virális E2 kötőhelyből a 33LCRA2 variánsban csak kettő található, ezért megvizsgáltuk, hogyan hat a HPV16 E2 fehérjéje a különböző deléciós variánsok transzkripciós aktivitására. Az E2 protein alacsony koncentrációban transz-aktivátorként a P₉₇-es promóteren keresztül növeli az E6 és E7 mRNS-ének mennyiségét, míg magasabb koncentrációban ugyanezekre a génekre gátló hatást fejt ki. Az E2 protein represszor hatása a korai promóterre az LCR két proximális helyzetű E2 kötőhelyén keresztül valósul meg azáltal, hogy eltávolítja a promóter mellől a pozitív hatású Sp-1 transzkripciós faktort. A HPV16 E2 fehérjéjének szerepe függ a virális DNS fizikai állapotától is, mivel az integrációkor a cirkuláris vírusgenom felnyílik, és az E2 gén felhasad.

Így a P₉₇ promóter felszabadul az E2 protein gátlása alól, és megindíthatja a transzformáló fehérjék termelését. Mivel a 33-as és a 936-os minta episzómálisan tartalmazta a HPV16-ot, az E2 fehérjék így biológiailag aktívak maradhattak a HPV genomban. A 33LCR és a 33LCRΔ1 plazmidok transzkripciós aktivitása kis mértékben csökkent a virális E2 hatására, míg a 33LCRΔ2 aktivitása szignifikáns csökkenést mutatott. Ez utóbbinak az lehet a magyarázata, hogy ebből a variánsból a két disztális, a P₉₇ promóterre pozitív hatású E2-kötőhely esett ki a deléció következtében, míg a két proximális, negatívan szabályozó E2 kötőhely megmaradt.

2. A HPV16 E6 és E7 onkoproteinjének hatása a TGF-β2 promóter transzkripciós aktivitására (II. közlemény)

M. Nees és társai 2000-ben kimutatták, hogy a HPV16 E6 és E7 fehérjéje csökkenti a TGF-β2 mRNS és a biológiailag aktív fehérje szintjét primer keratinocitákban. Mivel ebben a közleményben nem vizsgálták a gátló mechanizmus molekuláris hátterét, kotranszfekciós kísérleteket végeztünk annak tanulmányozására, hogy a virális onkogének hogyan hatnak a TGF-β2 promóterére. Mivel az említett cikkben a TGF-β2 szekréciójának csökkentésében a p53, illetve az Rb tumorszuppresszor fehérje által mediált folyamatoknak is szerepe volt, ezért kísérleteinkhez 3 különböző sejtvonalat használtunk. A C-33A kultúrában nincs jelen HPV szekvencia, de a sejtek a p53-at és a retinoblasztoma proteint is mutáns formában tartalmazzák. A HeLa sejtekben a p53 és az Rb a HPV18 genom jelenléte miatt funkcionálisan inaktív. A NIH/3T3 egér eredetű embrionális fibroblaszt, és biológiailag aktív p53 és retinoblasztoma fehérjét tartalmaz. Első kísérleteinkben a TGF-β2 promóter 77, illetve 528 bp méretű darabját tartalmazó plazmid (pB2-77, pB2-528) transzkripciós aktivitását vizsgáltuk a virális E6 és E7 jelenlétében. A C-33A sejtekben a HPV16 E6 és E7 fehérjéje kis mértékben aktiválta a TGF-β2 promóterének mindkét darabját tartalmazó plazmidot. A HeLa kultúrában az E6 erős transzaktiváló hatást mutatott mind a rövidebb, mind a hosszabb promóter szakasz esetében, míg az E7 fehérje csak a pB2-528 jelű plazmid transzkripciós aktivitását emelte. A NIH/3T3 sejtekben a HPV16 E7 fehérjéje mérsékelten növelte a pB2-77 plazmid aktivitását, míg a pB2-528 aktivitását szignifikánsan (3-4-szeresen) gátolta. Abban az esetben, ha az E7 fehérjét kifejező expressziós plazmidot növekvő mennyiségben adtuk kísérleti rendszerünkhöz, már kis koncentráció esetén tapasztaltuk ezt a gátló hatást. Mivel az

E7 csak nagyobb koncentrációban (2 μ g) növelte a pB2-77 transzkripciós aktivitását, a promóter eme szakaszára kifejtett aktiváló hatása nem tűnik biológiailag szignifikánsnak.

Bár M. Nees és kollégái tanulmányában a bioaktív p53-at és retinoblasztoma proteint kifejező keratinocitákban az E6 fehérje is csökkentette a TGF- β 2 fehérje szintjét, a mi kotranszfekciós kísérletünkben az aktív p53-at tartalmazó NIH/3T3 sejtekben az E6 protein enyhén növelte a TGF- β 2 promóter transzkripciós aktivitását mind a pB2-77, mind a pB2-528 plazmid esetében. Az ellentmondás háttérében az állhat, hogy a TGF- β 2 protein pillanatnyi szintje nemcsak promóter-szinten szabályozott, hanem más mechanizmusok által is.

Az E7 gátló hatásáért felelős TGF- β 2 promóter-régió lokalizációjának pontosabb meghatározásához különböző hosszúságú, de azonos 3' véggel rendelkező promóter darabokat klónoztunk a pALuc reporter vektorba, és NIH/3T3 sejtekben vizsgáltuk, hogy hogyan változik transzkripciós aktivitásuk a papillomavírus E7 proteinjének hatására. Transzfekciós kísérleteink szerint az E7 gátló hatásáért felelős régió a TGF- β 2 promóterében a transzkripció kezdőhelyétől számított -528 és -251 bp között található. Kimutattuk azt is, hogy ez a szakasz nem csak homológ, hanem heterológ (SV40) promóter elé klónozva is érzékeny az E7 represszálo hatására.

Következő kísérleteinkben mutáns E7 fehérjéket expresszálo plazmidok segítségével kívántuk meghatározni, hogy ez a gátló hatás csak a retinoblasztoma fehérje kötésétől függ, vagy más pocket proteinek (p107, p130) által is létrejöhet. Eredményeink szerint az az E7 mutáns (p26Gly), amely nem képes kapcsolódni a retinoblasztoma fehérjéhez, de a p107 és p130 proteinekhez igen, elvesztette TGF- β 2 promótert gátló képességét, ugyanúgy, ahogy az Rb-hez és a másik két pocket proteinhez kötődni képtelen E7 mutáns (p24Gly) is. Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy a HPV16 E7 TGF- β 2 promótert gátló hatásához szükséges az E7 és az Rb kapcsolódása. A p31Arg, p58Gly és p91Gly mutáns megőrizte represszálo hatását (bár a megfigyelt pB2-528 aktivitás nem volt olyan alacsony, mint a vad típusú E7 esetében), tehát a kazein kináz II foszforilációs hely és a Cys-X-X-Cys motívum nem játszik döntő szerepet a gátló hatás létrejöttében.

A HPV16 E7 fehérjéje a hypofoszforilált retinoblasztoma proteinhez kapcsolódva megakadályozza annak az E2F transzkripciós faktorhoz való kötődését, a szabad E2F1 pedig számos, a sejtciklus S-fázisában közreműködő gén transzkripcióját befolyásolja. Megvizsgáltuk tehát, hogyan hat az E2F1 transzkripciós faktor a TGF- β 2 promóterére. Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy az E2F1 az E7 proteinhez hasonlóan gátolta a TGF- β 2 promóterének transzkripciós aktivitását. Mindezekből az eredményekből azt a következtetést

vonhatjuk le, hogy a HPV16 E7 fehérjéje valószínűleg az E2F1 Rb/E2F komplexből történő felszabadítása révén fejt ki gátló hatását a TGF- β 2 promóterére. Mivel a TGF- β 2 promóterében nem található konszenzus E2F-kötőhely, az E2F1 hatása indirekt lehet.

Irodalmi adatok szerint a nagy mennyiségben expresszáldó E2F1 képes felülni a TGF- β által létrehozott G₁-blokkot (Schwarz et al, 1995). Az E2F1 fokozza a ciklin E aktivitását, melynek hatására a CDK2 foszforilálja a TGF- β 2 szignalizációs útvonalában fontos szerepet játszó Smad3 molekulát. A foszforilálódás hatására a Smad3 transzkripció aktivitása csökken, csökken a p15 ciklin-dependens inhibitor szintje, ez pedig az S-fázis irányába tolja el sejtciklust (Arata et al, 2000; Matsuura et al, 2004). Ebbe az irányba mutatnak a mi eredményeink is. Ha ugyanis az Rb/E2F komplexből a papillomavírus E7 proteinje hatására felszabaduló E2F1 csökkenti a TGF- β 2 szintjét, a Smad3-célgének átírása gátlódik, illetve emelkedik a CDK2- és CDK4-szint, mindezek hatására pedig a sejtek beléphetnek a sejtciklus S-fázisába.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. A HPV16 genom szabályozó régiójának (LCR) cervix carcinomából izolált, természetes deléciós variánsaiban a deléciók mellett GRE, TEF-1 és NF1 kötőhelyeket érintő pontmutációkat is találtunk (a HPV16 referencia-szekvenciájához viszonyítva), ezek a báziscserék azonban a teljes LCR-t tartalmazó klónokban is megjelentek. A deléciók az LCR-ben a szövetspecifikus enhancert és az YY1-, illetve a CDP/Cut-dependens silencer régiót érintették. Az ázsiai-amerikai variáns szabályozó régiójának transzkripciós aktivitása (33LCR) magasabbnak bizonyult, mint az európai variánsoké (pt16LCR, 936LCR). A deléciós variánsok transzkripciós aktivitása általában alacsonyabb volt, mint a teljes LCR-t tartalmazó variánsé. Egy deléciós variánsnál (33LCR Δ 2) viszont nem várt, viszonylag magas transzkripciós aktivitást tapasztaltunk annak ellenére, hogy a mutáció a teljes ismert enhancert, illetve a represszor hatású YY1 és CDP/Cut faktorokra specifikus szekvenciákat is érintette. Ezek alapján feltételezhető, hogy a HPV16 LCR 5' végén egy eddig nem definiált enhancer elem helyezkedik el.
2. A HPV16 E7 fehérje a biológiailag aktív retinoblasztoma proteint expresszáló NIH/3T3 egér eredetű embrionális fibroblaszt sejtekben szignifikánsan csökkentette a TGF- β 2 promóter transzkripciós aktivitását. A gátló hatásért felelős régió a TGF- β 2 promóterében -528 és -251 bp között helyezkedik el.
3. A HPV16 E6 proteinje enyhén aktiválta a TGF- β 2 promóterét. Ez a hatás független volt a p53 tumorszuppresszor protein jelenlététől, illetve hiányától, és valószínűleg a TGF- β 2 promóterében jelenlévő TATA boxon keresztül valósul meg. Az E7 gátló hatása csak a retinoblasztoma fehérjétől függ, a másik két pocket proteintől (p107, p130) nem, és nem befolyásolja szignifikánsan az E7 kazein kináz II foszforilációs helyének és cink-ujj struktúrájának épsége sem. Mivel az E2F1 transzkripciós faktor hasonló mértékben gátolta a TGF- β 2 promóterét, mint az E7 onkoprotein, feltételezhető, hogy a HPV16 E7 fehérje az E2F1 Rb/E2F komplexből történő felszabadítása révén fejt ki gátló hatását.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Gergely Lajos professzor úrnak és Dr. Veress György egyetemi adjunktusnak, akik elméleti és gyakorlati munkámat egyaránt lelkiismeretesen irányították, segítették.

Köszönöm Borbély Ágnes Anikó, Csoma Eszter, Nagy Etelka és Szládek Györgyi hallgatótársaimnak, valamint az intézet munkatársainak, Dr. Szarka Krisztinának és Dr. Kónya Józsefnek a segítséget és a támogatást.

Végül szeretnék köszönetet mondani Kissné Deák Andrea, Kissné Geréby Viktória, Rácz Péterné és Márton József asszisztenseknek a kísérletekhez nyújtott gyakorlati tanácsokért.

IRODALOMJEGYZÉK

Arata,Y., Fujita,M., Ohtani,K., Kijima,S., and Kato,J.Y. (2000) Cdk2-dependent and -independent pathways in E2F-mediated S phase induction. *J.Biol.Chem.*, 275:6337-6345.

Armstrong,D.J. and Roman,A. (1997) The relative ability of human papillomavirus type 6 and human papillomavirus type 16 E7 proteins to transactivate E2F-responsive elements is promoter- and cell-dependent. *Virology*, 239:238-246.

Barbosa,M.S., Edmonds,C., Fisher,C., Schiller,J.T., Lowy,D.R., and Vousden,K.H. (1990) The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J.*, 9:153-160.

Barbosa,M.S., Lowy,D.R., and Schiller,J.T. (1989) Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J.Virol.*, 63:1404-1407.

Bouvard,V., Storey,A., Pim,D., and Banks,L. (1994) Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J.*, 13:5451-5459.

Brehm,A., Miska,E.A., McCance,D.J., Reid,J.L., Bannister,A.J., and Kouzarides,T. (1998) Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*, 391:597-601.

Clark,D.A. and Coker,R. (1998) Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 30:293-298.

Clemens,K.E., Brent,R., Gyuris,J., and Munger,K. (1995) Dimerization of the human papillomavirus E7 oncoprotein in vivo. *Virology*, 214:289-293.

Croxtton,R., Ma,Y., Song,L., Haura,E.B., and Cress,W.D. (2002) Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1. *Oncogene*, 21:1359-1369.

Desaintes,C. and Demeret,C. (1996) Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin.Cancer Biol.*, 7:339-347.

Dong,X.P., Stubenrauch,F., Beyer-Finkler,E., and Pfister,H. (1994) Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int.J.Cancer*, 58:803-808.

Doorbar,J., Ely,S., Sterling,J., McLean,C., and Crawford,L. (1991) Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, 352:824-827.

Duensing,S., Lee,L.Y., Duensing,A., Basile,J., Piboonniyom,S., Gonzalez,S., Crum,C.P., and Munger,K. (2000) The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 97:10002-10007.

Durst,M., Gissmann,L., Ikenberg,H., and zur,H.H. (1983) A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 80:3812-3815.

Dyson,N., Howley,P.M., Munger,K., and Harlow,E. (1989) The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243:934-937.

- Edmonds,C. and Vousden,K.H. (1989) A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. *J.Virol.*, 63:2650-2656.
- el Deiry,W.S., Tokino,T., Velculescu,V.E., Levy,D.B., Parsons,R., Trent,J.M., Lin,D., Mercer,W.E., Kinzler,K.W., and Vogelstein,B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75:817-825.
- Etscheid,B.G., Foster,S.A., and Galloway,D.A. (1994) The E6 protein of human papillomavirus type 16 functions as a transcriptional repressor in a mechanism independent of the tumor suppressor protein, p53. *Virology*, 205:583-585.
- Ewen,M.E., Sluss,H.K., Whitehouse,L.L., and Livingston,D.M. (1993) TGF beta inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell*, 74:1009-1020.
- Ezhevsky,S.A., Nagahara,H., Vocero-Akbani,A.M., Gius,D.R., Wei,M.C., and Dowdy,S.F. (1997) Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 94:10699-10704.
- Franco,E.L., Rohan,T.E., and Villa,L.L. (1999) Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. *J.Natl.Cancer Inst.*, 91:506-511.
- Funk,J.O., Waga,S., Harry,J.B., Espling,E., Stillman,B., and Galloway,D.A. (1997) Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.*, 11:2090-2100.
- Giri,I. and Yaniv,M. (1988) Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *EMBO J.*, 7:2823-2829.
- Glick,A.B., Danielpour,D., Morgan,D., Sporn,M.B., and Yuspa,S.H. (1990) Induction and autocrine receptor binding of transforming growth factor-beta 2 during terminal differentiation of primary mouse keratinocytes. *Mol.Endocrinol.*, 4:46-52.
- Harbour,J.W., Luo,R.X., Dei,S.A., Postigo,A.A., and Dean,D.C. (1999) Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*, 98:859-869.
- Heldin,C.H., Miyazono,K., and ten Dijke,P. (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390:465-471.
- Helin,K., Wu,C.L., Fattaey,A.R., Lees,J.A., Dynlacht,B.D., Ngwu,C., and Harlow,E. (1993) Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev.*, 7:1850-1861.
- Howley, P. M. Papillomaviruses I. Lowy, D. R. In: Knipe DM, Howley PM ed. *Fields Virology*, 2197-2230. 2001. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins.
- Ref Type: Generic
- Hu,P.P., Datto,M.B., and Wang,X.F. (1998) Molecular mechanisms of transforming growth factor-beta signaling. *Endocr.Rev.*, 19:349-363.
- Johnson,D.G., Schwarz,J.K., Cress,W.D., and Nevins,J.R. (1993) Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature*, 365:349-352.
- Kammer,C., Warthorst,U., Torrez-Martinez,N., Wheeler,C.M., and Pfister,H. (2000) Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J.Gen.Virol.*, 81:1975-1981.

- Kim,S.J., Angel,P., Lafyatis,R., Hattori,K., Kim,K.Y., Sporn,M.B., Karin,M., and Roberts,A.B. (1990) Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol.Cell Biol.*, 10:1492-1497.
- Kurman,R.J., Malkasian,G.D., Jr., Sedlis,A., and Solomon,D. (1991) From Papanicolaou to Bethesda: the rationale for a new cervical cytologic classification. *Obstet.Gynecol.*, 77:779-782.
- Lafyatis,R., Lechleider,R., Kim,S.J., Jakowlew,S., Roberts,A.B., and Sporn,M.B. (1990) Structural and functional characterization of the transforming growth factor beta 3 promoter. A cAMP-responsive element regulates basal and induced transcription. *J.Biol.Chem.*, 265:19128-19136.
- Laiho,M., DeCaprio,J.A., Ludlow,J.W., Livingston,D.M., and Massague,J. (1990) Growth inhibition by TGF-beta linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell*, 62:175-185.
- Lechner,M.S. and Laimins,L.A. (1994) Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J.Virol.*, 68:4262-4273.
- Lee,J.O., Russo,A.A., and Pavletich,N.P. (1998) Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature*, 391:859-865.
- Leman,J.A. and Benton,E.C. (2000) Verrucas. Guidelines for management. *Am.J.Clin.Dermatol.*, 1:143-149.
- Li,S., Moy,L., Pittman,N., Shue,G., Aufiero,B., Neufeld,E.J., LeLeiko,N.S., and Walsh,M.J. (1999) Transcriptional repression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, mediated by CCAAT displacement protein/cut homolog, is associated with histone deacetylation. *J.Biol.Chem.*, 274:7803-7815.
- Ludlow,J.W., DeCaprio,J.A., Huang,C.M., Lee,W.H., Paucha,E., and Livingston,D.M. (1989) SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell*, 56:57-65.
- Luo,R.X., Postigo,A.A., and Dean,D.C. (1998) Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell*, 92:463-473.
- Majewski,S., Jablonska,S., and Orth,G. (1997) Epidermodysplasia verruciformis. Immunological and nonimmunological surveillance mechanisms: role in tumor progression. *Clin.Dermatol.*, 15:321-334.
- Markowitz,S.D. and Roberts,A.B. (1996) Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 7:93-102.
- Massague,J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu.Rev.Biochem.*, 67:753-791.
- Matsuura,I., Denissova,N.G., Wang,G., He,D., Long,J., and Liu,F. (2004) Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature*, 430:226-231.
- May,M., Dong,X.P., Beyer-Finkler,E., Stubenrauch,F., Fuchs,P.G., and Pfister,H. (1994) The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J.*, 13:1460-1466.
- Milde-Langosch,K. and Riethdorf,S. (2003) Role of cell-cycle regulatory proteins in gynecological cancer. *J.Cell Physiol*, 196:224-244.
- Munger,J.S., Harpel,J.G., Gleizes,P.E., Mazziere,R., Nunes,I., and Rifkin,D.B. (1997) Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int.*, 51:1376-1382.

- Münger,K., Basile,J.R., Duensing,S., Eichten,A., Gonzalez,S.L., Grace,M., and Zacny,V.L. (2001) Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*, 20:7888-7898.
- Münger,K., Phelps,W.C., Bubb,V., Howley,P.M., and Schlegel,R. (1989) The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J.Virol.*, 63:4417-4421.
- Munoz,N. (2000) Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J.Clin.Virol.*, 19:1-5.
- Nees,M., Geoghegan,J.M., Munson,P., Prabhu,V., Liu,Y., Androphy,E., and Woodworth,C.D. (2000) Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins inhibit differentiation-dependent expression of transforming growth factor-beta2 in cervical keratinocytes. *Cancer Res.*, 60:4289-4298.
- O'Connor,M.J. (2000) Targeting of transcriptional cofactors by the HPV E6 protein: another tale of David and Goliath. *Trends Microbiol.*, 8:45-47.
- O'Connor,M.J., Stunkel,W., Zimmermann,H., Koh,C.H., and Bernard,H.U. (1998) A novel YY1-independent silencer represses the activity of the human papillomavirus type 16 enhancer. *J.Virol.*, 72:10083-10092.
- O'Connor,M.J., Tan,S.H., Tan,C.H., and Bernard,H.U. (1996) YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J.Virol.*, 70:6529-6539.
- O'Reilly,M.A., Geiser,A.G., Kim,S.J., Bruggeman,L.A., Luu,A.X., Roberts,A.B., and Sporn,M.B. (1992) Identification of an activating transcription factor (ATF) binding site in the human transforming growth factor-beta 2 promoter. *J.Biol.Chem.*, 267:19938-19943.
- Ohtani,K., DeGregori,J., and Nevins,J.R. (1995) Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 92:12146-12150.
- Park,P., Copeland,W., Yang,L., Wang,T., Botchan,M.R., and Mohr,I.J. (1994) The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 91:8700-8704.
- Parkin,D.M., Pisani,P., and Ferlay,J. (1999) Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int.J.Cancer*, 80:827-841.
- Pasche,B. (2001) Role of transforming growth factor beta in cancer. *J.Cell Physiol*, 186:153-168.
- Pfister,H. (1984) Biology and biochemistry of papillomaviruses. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.*, 99:111-181.
- Roberts,A.B. and Sporn,M.B. (1992) Mechanistic interrelationships between two superfamilies: the steroid/retinoid receptors and transforming growth factor-beta. *Cancer Surv.*, 14:205-220.
- Romanczuk,H. and Howley,P.M. (1992) Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 89:3159-3163.
- Schneider,A. (1994) Natural history of genital papillomavirus infections. *Intervirol.*, 37:201-214.
- Schwarz,J.K., Bassing,C.H., Kovetski,I., Datto,M.B., Blazing,M., George,S., Wang,X.F., and Nevins,J.R. (1995) Expression of the E2F1 transcription factor overcomes type beta transforming growth factor-mediated growth suppression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 92:483-487.

- Sedman,S.A., Barbosa,M.S., Vass,W.C., Hubbert,N.L., Haas,J.A., Lowy,D.R., and Schiller,J.T. (1991) The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J.Virol.*, 65:4860-4866.
- Shah, K. V. Papillomaviruses. Howley, P. M. (In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, ed. *Fields Virology*), 2077-2109. 1996. Philadelphia, Lippincott-Raven.
Ref Type: Generic
- Shi,Y., Lee,J.S., and Galvin,K.M. (1997) Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1..... *Biochim.Biophys.Acta*, 1332:F49-F66.
- Stoppler,M.C., Ching,K., Stoppler,H., Clancy,K., Schlegel,R., and Icenogle,J. (1996) Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J.Virol.*, 70:6987-6993.
- Stunkel,W., Huang,Z., Tan,S.H., O'Connor,M.J., and Bernard,H.U. (2000) Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 repress or activate the E6 promoter, depending on the physical state of the viral DNA. *J.Virol.*, 74:2489-2501.
- Syrjanen,K.J. (2002) HPV infections and oesophageal cancer. *J.Clin.Pathol.*, 55:721-728.
- Syrjanen,K.J. (2003) HPV infections in benign and malignant sinonasal lesions. *J.Clin.Pathol.*, 56:174-181.
- Szarka,K., Veress,G., Juhász,A., Kónya,J., Sápy,T., Soós,G., Hernádi,Z., and Gergely,L. (2000) Integration status of virus DNA and p53 codon 72 polymorphism in human papillomavirus type 16 positive cervical cancers. *Anticancer Res.*, 20:2161-2167.
- Taichman,L.B., Reilly,S.S., and LaPorta,R.F. (1983) The role of keratinocyte differentiation in the expression of epitheliotropic viruses. *J.Invest Dermatol.*, 81:137s-140s.
- Tan,S.H., Bartsch,D., Schwarz,E., and Bernard,H.U. (1998) Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 point toward conservation of these genomic elements in all genital papillomaviruses. *J.Virol.*, 72:3610-3622.
- Thierry,F., Spyrou,G., Yaniv,M., and Howley,P. (1992) Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J.Virol.*, 66:3740-3748.
- Tidy,J., Vousden,K.H., Mason,P., and Farrell,P.J. (1989) A novel deletion within the upstream regulatory region of episomal human papillomavirus type 16. *J.Gen.Virol.*, 70 (Pt 4):999-1004.
- Tsai,T.C. and Chen,S.L. (2003) The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch.Virol.*, 148:1445-1453.
- Turek,L.P. (1994) The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer. *Adv.Virus Res.*, 44:305-356.
- Veress,G., Szarka,K., Dong,X.P., Gergely,L., and Pfister,H. (1999) Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J.Gen.Virol.*, 80 (Pt 4):1035-1043.
- Vigo,E., Muller,H., Prosperini,E., Hateboer,G., Cartwright,P., Moroni,M.C., and Helin,K. (1999) CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol.Cell Biol.*, 19:6379-6395.

Wakefield,L.M. and Roberts,A.B. (2002) TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 12:22-29.

Whyte,P., Buchkovich,K.J., Horowitz,J.M., Friend,S.H., Raybuck,M., Weinberg,R.A., and Harlow,E. (1988) Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature*, 334:124-129.

Wolffe,A.P. and Hayes,J.J. (1999) Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res.*, 27:711-720.

Woodworth,C.D., Cheng,S., Simpson,S., Hamacher,L., Chow,L.T., Broker,T.R., and DiPaolo,J.A. (1992) Recombinant retroviruses encoding human papillomavirus type 18 E6 and E7 genes stimulate proliferation and delay differentiation of human keratinocytes early after infection. *Oncogene*, 7:619-626.

Xi,L.F., Koutsky,L.A., Galloway,D.A., Kuypers,J., Hughes,J.P., Wheeler,C.M., Holmes,K.K., and Kiviat,N.B. (1997) Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J.Natl.Cancer Inst.*, 89:796-802.

Yamada,T., Manos,M.M., Peto,J., Greer,C.E., Munoz,N., Bosch,F.X., and Wheeler,C.M. (1997) Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J.Virol.*, 71:2463-2472.

Yang,L. and Botchan,M. (1990) Replication of bovine papillomavirus type 1 DNA initiates within an E2-responsive enhancer element. *J.Virol.*, 64:5903-5911.

Yang,L., Mohr,I., Fouts,E., Lim,D.A., Nohaile,M., and Botchan,M. (1993) The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 90:5086-5090.

Yang,L., Mohr,I., Li,R., Nottoli,T., Sun,S., and Botchan,M. (1991) Transcription factor E2 regulates BPV-1 DNA replication in vitro by direct protein-protein interaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, 56:335-346.

Zerfass-Thome,K., Zwerschke,W., Mannhardt,B., Tindle,R., Botz,J.W., and Jansen-Durr,P. (1996) Inactivation of the CDK inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*, 13:2323-2330.

Zimmermann,H., Degenkolbe,R., Bernard,H.U., and O'Connor,M.J. (1999) The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J.Virol.*, 73:6209-6219.

zur Hausen,H. (1996) Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim.Biophys.Acta*, 1288:F55-F78.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezésben felhasznált közlemények

- I.** G. Veress, **M. Murvai**, K. Szarka, A. Juhász, J. Kónya, L. Gergely
Transcriptional activity of human papillomavirus type 16 variants having deletions in the long control region
Eur. J. Cancer. 2001. 37: 1946-1952 IF: 3,694 (3,46)
- II.** **M. Murvai**, A. A. Borbély, J. Kónya, L. Gergely, and G. Veress
Effect of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes on the activity of the transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2) promoter
Arc. Virol. 2004. 149: 2379-2392 IF: 1,876

Egyéb közlemények

G. Szládek, A. Juhász, L. Asztalos, K. Szőke, **M. Murvai**, K. Szarka, G. Veress, L. Gergely, J. Kónya
Persisting TT virus (TTV) genogroup 1 variants in renal transplant recipients
Arch. Virol. 2003. May; 148 (5): 841-51. IF: 1,876

Fontosabb előadások, poszterek

Veress G., Szarka K., **Murvai M.**, Kónya J., Gergely L.: Humán papillomavírus 16 deléciós variánsok transzkripció aktivitásának vizsgálata
First Joint Meeting of the Slovenian Society for Microbiology and the Hungarian Society for Microbiology, 2000. augusztus 24-26., Keszthely

Murvai M., Veress Gy., Borbély Á., Gergely L.: A humán papillomavírus 16 (HPV16) E6 és E7 onkogénjeinek hatása a transzformáló növekedési faktor- β 2 (transforming growth factor- β 2, TGF- β 2) promóterének aktivitására
Magyar Mikrobiológiai Társaság Jubileumi Nagygyűlése, 2001. október 10-12., Balatonfüred

Murvai M., Borbély Á. A., Szarka K., Gergely L., Veress Gy.: Effect of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes on the activity of the transforming growth factor- β 2 promoter

20th International Papillomavirus Conference, October 4-9. 2002., Paris, Franciaország

Murvai M., Borbély Á. A., Gergely L., Veress Gy.: A humán papillomavírus (HPV), a cervix carcinoma és az E-cadherin polimorfizmus kapcsolata

A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs

Kollokvium, 2004. október 7-9., Keszthely

I.

II.