

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**REKURRENS LÉGÚTI PAPILLOMATOSIS A HUMÁN PAPILLOMAVÍRUS-11 FERTŐZÉS
TÜKRÉBEN**

Gáll Tamás

Témavezető: Dr. Szarka Krisztina



**DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

DEBRECEN, 2013.

REKURRENS LÉGÚTI PAPILLOMATOSIS A HUMÁN PAPILLOMAVÍRUS-11 FERTŐZÉS TÜKRÉBEN

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

Írta: **Gáll Tamás**
okleveles molekuláris biológus (mikrobiológus)

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

Témavezető: Dr. Szarka Krisztina

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Maródi László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Bíró Sándor, az MTA doktora
Prof. Dr. Minárovits János, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja:

2013. december 6. 10 óra 30 perc, DEOEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet Könyvtára

Az értekezés bírálói:

Dr. Bányai Krisztián, PhD
Dr. Szűcs Attila, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Maródi László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Bíró Sándor, az MTA doktora
Prof. Dr. Minárovits János, az MTA doktora
Dr. Bányai Krisztián, PhD
Dr. Szűcs Attila, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

2013. december 6. 13 óra, DEOEC Belgyógyászati Intézet A épület tanterme

BEVEZETÉS

A rekurrens légúti papillomatózis (recurrent respiratory papillomatosis, RRP) a felső légutakat (elsősorban a géget) érintő benignus elváltozás, mely gyermek- és felnőttkorban egyaránt kialakulhat. A betegség a légutakra lokalizálódó, szoliter- vagy multiplex papillomák megjelenésével jellemezhető, melyek hátterében elsősorban az alacsony onkogén kockázatú human papillomavírus (HPV) típusok, elsősorban a HPV-6 és -11 állnak. Jóllehet az RRP benignus elváltozás, kórlefolyása nehezen megjósolható; gyermekekben igen agresszív, életet veszélyeztető kórlefolyást mutathat a gyakori recidívák, illetve az alsó légutakra és a nyelöcsőre terjedés következtében. Az elváltozás viszonylag alacsony incidenciája (1,8/100000 felnőttek, 4,3/100000 gyermekek esetén) ellenére jelentős emocionális- és gazdasági terhet jelent a társadalomra.

A vírusok - köztük a HPV-ok - genetikai variabilitásának vizsgálata kulcsfontosságú lehet az adott elváltozás prognózisa, kórlefolyása és kezelése szempontjából. A HPV-ok esetén ilyen adatok elsősorban a magas onkogén kockázatú típusok esetén állnak rendelkezésre, ahol az elváltozás agresszivitása egyértelműen kapcsolatba hozható az adott HPV típus variánsaival, illetve a HPV genomban detektálható nukleotid polimorfizmusokkal.

A magas onkogén kockázatú HPV típusokkal ellentétben az alacsony onkogén kockázatú típusok esetén a patogenitással, kórlefolyással és az antivirális szerekkel szembeni rezisztenciával összefüggésbe hozható nukleotid polimorfizmusokra vonatkozó adatok meglehetősen hiányosak még az olyan, alacsony onkogén kockázatú HPV típusokkal egyértelműen kapcsolatba hozható kórképek, mint az RRP, esetén is. Az RRP patogenezise, kórlefolyása, prognózisa, ill. az adott kezelésre adott terápiás válasz szempontjából hasznos lehet az agresszivitással és antivirális rezisztenciával kapcsolatba hozható mutációk, nukleotid polimorfizmusok feltárása, valamint az eltérő anatómiai régiókból, ill. eltérő agresszivitású elváltozásokból származó HPV szekvenciák filogenetikai viszonyainak vizsgálata.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A klasszikus rendszertani besorolás szerint a papillomavírusokat (PV) - a polyomavírusokkal együtt - a *Papovaviridae* családba sorolták. A *Papovaviridae* család tagjai közötti jelentős szerkezeti és genetikai eltérések azonban indokoltá tették az egységes

Papovaviridae család átértelmezését, melynek eredményeként a papillomavírusokat a Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) javaslatára az önálló *Papillomaviridae* családba sorolták. Egy újonnan izolált papillomavírus új *típust* jelent, amennyiben L1 szekvenciája legalább 10%-ban különbözik a hozzá legközelebbi papillomavírus típustól, míg 2-10% L1 szekvencia különbség esetén szubtípusról, 2% alatt pedig variánsról beszélünk.

A papillomavírusok kis méretű, 52-55 nm átmérőjű, ikozahedrális kapsziddal rendelkező DNS vírusok, cirkuláris genomjuk mérete megközelítőleg 8000 bázispár. A vírusgenom a hosszú szabályozó régióra (long control region, LCR), a korai (early, E) és a késői (late, L) génekre osztható. Az LCR, mely számos celluláris transzkripciós faktort és virális szabályozó fehérjét (E1, E2) köt, szerepe elsősorban az E6/E7 onkogének expressziójának és a vírus replikációjának a szabályozása. Egyre biztosabbá válik, hogy a papillomavírusok génexpressziójának szabályozásában fontos szerep jut a CpG metilációnak, mely elsősorban a virális E2 fehérje kötőhelyeket (5'-ACCG(N)₄CGGT-3') érintheti.

A DNS-függő ATP-áz és helikáz aktivitással rendelkező E1 fehérje jól konzervált a különböző HPV típusok esetén; szükséges mind a virális DNS szintézis iniciációjában, mind pedig annak elongációjában.

Az LCR-re lokalizálódó 5'-ACCG(N)₄CGGT-3' konszenzus szekvenciához kötődő E2 fehérje meglehetősen jól konzervált a papillomavírusok között. A genitális papillomavírusok LCR szekvenciájában négy konszenzus E2 kötőhely található, melyek eltérő affinitással kötik az E2 proteint. Irodalmi adatok szerint az E2 fehérje alacsony koncentrációban transzaktiváló, míg magas koncentrációban transzkripciót gátló hatással rendelkezik. Az E2 protein transzkripciót gátló hatásán túl feltehetően más funkciókkal is rendelkezik, mivel más celluláris fehérjékkel (Brd4, TFIIB) is kölcsönhatásba lép.

Az papillomavírusok E6 proteinje fontos szerepet kap a sejtek transzformációjában. A magas onkogén kockázatú HPV típusok E6 fehérje magas, míg az alacsony onkogén kockázatú típusoké alacsony affinitással köti a p53 fehérjét, facilitálva annak lebontását. Az alacsony onkogén kockázatú HPV típusok esetén leírták, hogy azok E6 fehérjéje kölcsönhatásba lép a Gps2 és Bak fehérjékkel és fontos szerepet kap a genom fenntartásában.

A papillomavírusok E7 onkogénjének fő célpontja a celluláris retinoblasztóma fehérje (pRb). A pRb hipofoszforilált formában az E2F celluláris transzkripciós aktivációs

faktorokkal képez komplexet, gátolva a sejtciklus G1-S fázis átmenetet. Az alacsony onkogén kockázatú HPV típusok E7 proteinje is képes a pRb kötésére, de a magas onkogén kockázatú típusokhoz képest jelentősen kisebb affinitással. A papillomavírusok E5 proteinje szintén onkogén aktivitással rendelkezik. A HPV-11 és HPV-16 E5 proteinje gátolja a p21/CIP1 expresszióját fibroblasztokban és keratinocitákban, ill. a HPV-16 E5 proteinje a TRAIL és FasL-mediált apoptózist, így az E6/E7 fehérjékkel együtt fontos szerepet tölt be a keratinociták transzformációjában.

Az E4 fehérje szerepéről meglehetősen kevés információ áll rendelkezésre, irodalmi adatok szerint részt vesz a sejt citokeratin hálózatának összeomlásában és segítheti az újonnan képződött virionok lefűződését

Az papillomavírusok késői fehérjéi (L1, L2) a kapszid felépítésben vesznek részt, fontos szerepet kapnak a HPV elleni oltóanyagok fejlesztése során.

A bazális sejtek HPV virionokkal történő fertőződése feltehetően a hám mikrosérülésein keresztül történik. A fertőzödést követően a virion dekapszidálódik, a HPV DNS pedig a sejtmagba transzlokálódik, ahol epizómálisan, sejtenként megközelítően 100 kópiában van jelen. A fertőzödést követő, kis kópiaszámban történő genom amplifikációs szakaszt követően a HPV életciklusának úgynevezett fenntartó (maintenance) szakasza következik, ahol a vírusreplikáció a sejtciklussal szinkron zajlik. A papillomavírusok a produktív vírusreplikációhoz a gazdasejt replikációs rendszerét igénylik, a terminális differenciálódás során viszont a hámsejtek kilépnek a sejtciklusból és befejezik az osztódásukat. A differenciálódó hámsejtek replikációjának fenntartása és azok immortalizációja az E6/E7 onkogének expressziójának a következménye. A hám magasabb rétegeiben bekövetkezik a vírus késői promóterének aktivációja, amely a virális fehérjék - elsősorban az E1, E2, E1E4 és E5 - fokozott expresszióját eredményezi, így a vírus kópiaszáma a sejtenkénti 50-200-ról több ezerre nő. A differenciálódás során a késői vírusfunkciók aktiválásában az E1E4 és E5 proteinek is szerepet játszanak. A vírusreplikáció lezárásaként a hám felső rétegében bekövetkezik az L1 és L2 kapszidfehérjék expressziója és a vírusgenom enkapszidációja, amelyet az L2 és L1 fehérjék interakciója segít elő, amit a vírus partikulumok hámfelszínen történő felszabadulása követ.

Az RRP etiológiai ágensei a HPV-ok, elsősorban a HPV-6 és HPV-11, melyek a légutak el nem szarusodó hámjának benignus proliferációjához vezetnek. Noha az RRP egy benignus, leggyakrabban a gégét érintő elváltozás, kórlefolyása nehezen megjósolható a

gyakori recidívák, aerodigestív terjedés és malignus traszformáció miatt. Koreláció alapján az RRP-nek két formája ismert, a gyermekkorban megjelenő, agresszívebb *fiatalkori RRP* (juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis, JO-RRP), ill. a felnőttkorban megjelenő *felnőttkori* forma (adult-onset recurrent respiratory papillomatosis, AO-RRP). Irodalmi adatok szerint a HPV-11 fertőzéshez kapcsolódó RRP a HPV-6 okozta elváltozásokhoz képest rosszabb prognózist mutat. Az RRP tünetei a betegek életkorától és a papillomák lokalizációjától függenek, AO-RRP és JO-RRP esetén is azonosak, vezető tünet - a leggyakoribb hangszalagi lokalizáció esetén - a progresszív rekedtség, mely különböző mértékű diszfóniával járhat. Hangszalagi lokalizáció esetén a rekedtség már kisméretű lézió esetén is érzékelhető. Szintén gyakori tünetek a beszédhang megváltozása, a stridor és a respiratorikus distressz. Extralaryngeális szóródás elsősorban a HPV-11 okozta fertőzés esetén tapasztalható.

A rutin diagnózis alapja az endoszkópos és szövettani vizsgálat. A szövettani képen elsősorban acanthosis, koilocytosis and dysplasia látható.

Az RRP kezelésének fő célja a szabad légutak biztosítása és a hangminőség javítása a papillomák eltávolításával, mely elsősorban microdebrider vagy CO₂ lézer segítségével történik. Jóllehet az RRP kezelésében a sebészeti beavatkozás az elsődleges, az esetek mintegy 20%-a adjuváns terápia alkalmazását teszi szükségessé. Adjuváns kezelés alkalmazása az évenkénti magas műtéti szám, disztális terjedés és a papillomák gyors növekedése esetén merül fel. A két leggyakrabban felhasznált adjuváns szer az interferon- α (IFN- α) és a cidofovir (CDV). Papillomavírusok esetén az IFN-ok feltételezett hatásmechanizmusa az HPV onkogének expressziójának gátlása. A CDV-t kezdetben a humán cytomegalovírus (HCMV) által okozott retinitis kezelésére használták. A herpeszvírusoktól eltérően a papillomavírusok nem kódolnak saját virális DNS polimerázt, replikációjukat a gazdasejt polimeráza végzi, így a CDV HPV-fertőzött sejtek esetén tapasztalható antiproliferatív hatása alternatív hatásmechanizmusok létezését valószínűsíti. Az egyik ilyen hatásmechanizmus lehet a CDV apoptózist indukáló hatása HPV fertőzött sejteken, melyet számos apoptotikus marker megjelenése jelez: (1) a kaspáz-3 proteáz aktivitásának indukciója, (2) a foszfatidil-szerin transzlokációja a plazmamembrán külső rétegébe, (3) a nukleáris mátrix protein dezintegrációja és (4) a DNS fragmentációja. Mi több, CDV kezelés hatására HPV fertőzött sejtekben a p53 és a pRb fehérjék, valamint a p21 ciklin-dependens kináz inhibitor akkumulációját figyelték meg. A CDV hatásmechanizmusának egy másik lehetséges módja a HPV E6/E7 onkogének expressziójának transzkripció szinten

történő csökkentése. A CDV első, *légúti papillomatózisban* történő, sikeres intralézionális alkalmazásáról Van Cutsem és mtsai (1995) számoltak be egy algaratra és nyelőcsőre lokalizálódó papillomatózisban szenvedő 69 éves nőbeteg esetén. Chadha és James (2007) a CDV RRP-ben történő adjuváns felhasználásról írt, 17 közlemény 158 betegre kiterjedő adatait elemző összefoglalójuk szerint a betegek 57%-a teljes, 35%-a részleges remisszióba került, 8%-uk esetén pedig nem tapasztaltak javulást. A CDV fő mellékhatásaként a vesetoxicitás említhető.

CÉLKITÚZÉSEK

1. Az általunk vizsgált, légúti papillomatózisból származó HPV-11 szekvenciák filogenetikai vizsgálata a Génbankban rendelkezésre álló, légúti- és anogenitális régiókból származó HPV-11 szekvenciák bevonásával.
2. A különböző agresszivitású légúti papillomatózis elváltozások vírusgenetikai hátterének vizsgálata.
3. A virológiai szempontból sikertelen cidofovir kezelés vírusgenetikai hátterének vizsgálata rekurrens légúti papillomatózisban.
4. A cidofovir kezelés során bekövetkező esetleges vírusszekvencia változások nyomonkövetése, a vírusgenom stabilitásának tanulmányozása a 7 évet (1999-2006) felölelő vizsgálati periódus során rekurrens légúti papillomatózisban.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Munkánk során hat, különböző agresszivitású RRP-ben szenvedő beteg mintáit dolgoztuk fel: az 1. és 2. beteg esetén szoliter papillomatózisról (1-1 sebészi beavatkozás, mindkét beteg esetén csak a gége érintett), a 3. és 4. beteg közepesen agresszív papillomatózisról (9 és 6 sebészi beavatkozás; mindkét beteg esetén IFN adjuváns kezelés és kizárólag a gége érintett), míg az 5. és 6. beteg esetén fokozottan agresszív papillomatózisról (30 és 33 sebészi beavatkozás, az 5. beteg esetén gége, garat, arcüreg, orrüreg, hallójárat, a 6. beteg esetén gége, lágyszájpad; mindkét beteg esetén IFN kezelés, a 6. beteg esetén CDV kezelés is) beszélhetünk.

Az RRP diagnosztizálása minden beteg esetén 18 éves kor előtt történt, tehát valamennyi általunk vizsgált szekvenciát juvenilis papillomatózisnak tekintettük. Malignus degenerációt egyetlen betegnél sem tapasztaltak, CDV kezelésben egy beteg (6. beteg, nagyon agresszív papillomatózis) részesült. Tracheosztóma alkalmazására a 2. beteg (sürgősségi beavatkozás), valamint az 5. és 6. beteg esetén került sor. A CDV terápiában részesült beteg (6. beteg) kezelése Chetri protokolljának (2003) módosításával történt

DNS izolálás, HPV DNS kimutatás és típizálás

Egy-egy nukleinsav izolálás során a frissen fagyasztott, -70°C-on tárolt minta megközelítően 2×2×2 mm-es darabjait használtuk fel. A folyékony nitrogénben elporított mintákat TNE pufferben (10 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) homogenizáltuk. A DNS izolálása fenol-kloroform-izoamilalkohol 25:24:1 arányú keverékével történt. A DNS integritását a β -globin génre specifikus primerekkel végzett polimeráz láncreakcióval (PCR) ellenőriztük. A HPV DNS kimutatása MY/GP nested PCR-rel, míg a HPV DNS típizálása a GP PCR termék RsaI/TruI hasításával történt.

A HPV genomi DNS amplifikációja és szekvencia analízise

A β -globin és az MY/GP kivételével az esetleges amplifikáció hibák kiküszöbölése érdekében 3'-5' exonukleáz (proofreading) aktivitással is rendelkező, nagy érzékenységu polimeráz rendszert használtuk (GeneAmp High Fidelity PCR System) 500 ng totál DNS felhasználásával reakciónként. Az amplimereket 1,5%-os, ethidium-bromiddal festett agaróz gélen, 0,5×TBE (Tris/borát/EDTA) pufferben elektroforetizáltuk. A megfelelő méretű amplimerek tisztítása az agaróz gélből QIAquick Gel Extraction Kit-tel történt. Minden egyes genomi régió szekvencia-analízisét legalább két független PCR reakcióból származó amplimeren elvégeztük. Az egyes amplimereket mindkét irányból, szekvenáltattuk. A szekvenálási reakciók ABI 3100 BigDye Terminator v3.1 Cycle Kit segítségével, ABI 3100 Genetic Analyzer-en, a BIOMI Kft-nél (Gödöllő, Magyarország) kerültek elvégzésre. A szekvencia adatok elemzése és azok összevetése egymással, ill. a szekvencia adatbázisokban található adatokkal CLC Gene Workbench 4.0 (CLC Bio, Aarhus, Denmark) szoftverrel történt.

A CDV kezelésben részesülő beteg 24 sorozatmintája közül teljes genom analízisre öt minta került kiválasztásra: egy, a CDV és IFN kezelés előtti laryngeális minta (1. minta, 1999), egy-egy laryngeális (2. minta, 2005) és légyszájpadli lézióból (3. minta, 2005)

származó szekvencia a CDV kezelésre jól reagáló terápiás szakaszból, ill. egy-egy laryngeális (4. minta, 2006) és lágyszájpadli lézióból (5. minta, 2006) származó minta a kezelés virológiai szempontból sikertelen szakaszából.

Egyszálú konformációs polimorfizmus (single strand conformational polymorphism, SSCP) analízis

A több HPV-11 variánssal történő fertőződés vizsgálatára elvégeztük az egyes elváltozásokból származó HPV-11 szekvenciák E1, E2, E6, E7 és LCR régióinak SSCP analízisét. Az SSCP vizsgálatot megelőzően az egyes amplimereket különböző restrikciós enzimekkel (NdeI az E6 ORF, SspI az E7 ORF, AluI és SspI az E1A ORF, HaeIII és SspI az E1B ORF, DraI az E2 ORF, Bsh1235I az LCR esetén) emésztettük, majd a hasítás eredményességét 3%-os agaróz gélen történő elektroforézissel (90 perc, 100 V) ellenőriztük. Az SSCP analízis során a hasítási termékeket elektroforézisét 15%-os poliakrilamid gélen végeztük, majd a gél ezüsfestését követően értékeltük.

LCR metilációs analízis a CDV kezelés során

A virális transzkripció szabályozásában szerepet játszó E2 fehérje kötőhelyek metiláltságának mértékét biszulfít-modifikációt követően szekvenálással határoztuk meg. A metilációs analízist a CDV kezelésen átesett betegből származó öt szekvencián végeztük el. Az egyes minták biszulfít modifikációját Kalantari és mtsai (2004) leírása alapján végeztük 1000 ng DNS felhasználásával. A szekvenálási reakciók kivitelezése és a szekvencia adatok elemzése a fentebb ismertetett módon történt.

Plazmidok és LCR klónozása reporter vektorba

Az egyes HPV-11 szekvenciák LCR-ének transzaktiváló hatásának vizsgálatához az egyes szekvenciák LCR-ét pALuc reporter vektorba klónoztuk. A referencia adatbázisban található HPV-11 (Génbank azonosító: M14119) szekvencia alapján tervezett BamHI és KpnI hasítási helyeket tartalmazó, a teljes LCR-t magában foglaló pALuc-LCR reporter konstruktokat hoztunk létre. Az amplimereket 1%-os agaróz gélen elektroforetizáltuk (100 V, 1 óra), a gélből kivágtuk, Qiaquick Gel Extraction Kit segítségével a gyártó utasításai szerint tisztítottuk, majd mind a tisztított amplimert, mind a pALuc vektort KpnI és BamHI enzimekkel hasítottuk, ismét tisztítottuk és T4 DNS ligáz segítségével pALuc reporter vektorba ligáltuk. A ligálást követően a plazmidokat kompetens Escherichia coli (E. coli) XL-1 sejtekbe transzformáltuk. A kompetens baktériumok előállítása és transzformálása során a

Chung és mtsai (1989) által kidolgozott módszert vettük alapul. A klónokat ampicillin tartalmú szelektív táptalajon tenyésztettük, majd plazmid minipreparálást követően szekvenálással ellenőriztük. A transzfektáláshoz szükséges DNS-t Wizard Plus Midiprep Kit segítségével állítottuk elő.

Irányított mutagenézis

Az egyes HPV-11 szekvenciák LCR-ében detektált mutációk (A7413C, C7479T, 7509 T deléció, T7546C, 7584 C inzerció, T7904A) hatását a szabályozó régió transzaktivációs képességére irányított mutagenézissel vizsgáltuk, melynek során az egyes mutációkat a referencia HPV-11 genom (M14119) teljes hosszúságú LCR-ét tartalmazó pHPV-11-LCR-pALuc plazmid konstrukta építettük be. Az amplifikációt követően a termékeket 20 U DpnI enzimmel, 37°C-on, 16 órán át emésztettük, majd a fent említett módszerrel *E. coli* XL-1-be transzformáltuk. Az egyes konstruktokat szekvenálással ellenőriztük, majd HEp-2 sejtekbe transzfektáltuk.

Sejtkultúrák, tranziens transzfekció és luciferáz teszt

Kísérleteinket HPV pozitív HEp-2 (ATCC azonosító: CCL-23) sejteken végeztük. A sejteket 10% magzati borjúsavót (fetal calf serum, FCS), 2 mM glutamint és antibiotikumokat (100 U/mL penicillin és 100 U/mL streptomycin) tartalmazó DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) médiumban, 37°C-on, 5% CO₂ tenzió mellett termosztátban tartottuk fenn.

A HEp-2 sejtek tranziens transzfekciója Lipofectamine 2000 reagenssel történt. A transzfekció során 2 µg pALuc reporter vektort és a transzfekció hatékonyságának vizsgálatára 1 µg pRSV-β-Gal plazmidot használtunk. 48 órával a transzfekciót követően a sejteket Reporter Lysis Buffer-rel és fagyasztás-olvasztással lizáltuk, majd a sejt-extraktumok luciferáz aktivitását Luciferase Assay System segítségével luminométeren határoztuk meg a gyártó utasításai szerint. A luciferáz teszt standardizálásához β-galaktozidáz tesztet használtunk. Minden transzfekciós kísérletet legalább három független ismételtsben végeztünk el. A luciferáz aktivitások összehasonlítása során T-próbát használtunk az SPSS 15.0 for Windows program (SPSS, Chicago, IL, USA) segítségével.

Filogenetikai elemzés

A szekvencia elemzéseket CLC Gene Workbench 4.1.2 programmal végeztük (CLC Bio, Aarhus, Denmark). A filogenetikai elemzések során az adatbázisokban fellelhető 40 teljes HPV-11 genom, 49 L1 ORF, 47 E6 ORF és 47 LCR szekvenciát használtuk fel.

EREDMÉNYEK

HPV koinfekciók vizsgálata különböző agresszivitású papillomatózisokból származó mintákban

Az E1, E2, E6, E7 és a hipervariábilis LCR SSCP analízise alapján több HPV-11 variánssal történő fertőződés nem valószínűsíthető, egy-egy betegből mindig azonos HPV-11 variáns mutatható ki.

A különböző agresszivitású papillomatózisokból származó HPV-11 szekvenciák teljes genom analízise

A teljes genom analízis során két nem (1. és 2. beteg), két közepesen, (3. és 4. beteg) és egy fokozottan agresszív papillomatózisban (5. beteg) szenvedő betegből származó szekvenciákat vizsgáltunk. A 3., 4. és 5. beteg esetén a szekvenciákat két, különböző időpontban vett minta esetén is elemeztük. A genom összehasonlító vizsgálatokba a CDV-vel kezelt, fokozottan agresszív papillomatózisban szenvedő beteg (6. beteg) szekvenciája is bevonásra került.

A vizsgált HPV-11 genomok mind egymáshoz, mind pedig a referencia HPV-11 szekvenciához (M14119) képest mutattak eltéréseket. A hat teljes genom analízise során összesen 41 nukleotid szekvencia változást azonosítottunk. A szekvenálási eredmények alapján a referencia HPV-11 szekvenciában négy lehetséges szekvenálási hibát tártunk fel. Eredményeink alapján az E1 ORF-ben az 1783-1784-es pozíciókban a GC dinukleotid adataink alapján CG-nek olvasandó, ami a 318. aminosav pozícióban az eredeti referencia szekvenciában szereplő alanin helyett arginint kódol. Az LCR-ben detektált, referencia HPV-11 genomban található szekvenálási hibát (7719-7720 GC inzerció) Heinzel és mtsai. eredményei is megerősítik (Heinzel és mtsai., 1995).

A 37 szekvencia változás (a feltételezett szekvenálási hibákat nem számolva) közül hat az LCR-ben, egy a nem kódoló genom szakaszban, illetve 30 a fehérjét kódoló régiókban detektálható. Az LCR-ben található szekvencia változások közül kettő (T7546C, 7584 C inzerció), a nem kódoló régióban (A3832G), ill. tizenhárom, a kódoló régiókban található nukleotidcsere valamennyi szekvenciában kimutatható.

A kódoló régiókban történt nukleotid szekvencia változások közül 11 eredményezett aminosav szekvencia változást: Ala45Ser az E7 ORF-ben, Ala72Glu az E1 régióban, Gln86Lys és Lys308Arg az E2 génben, Gln46Arg, Gly61Glu, Ser76Leu az E2/E4 ORF-ben (aminosav csere csak az E4-ben), Ile28Phe és Val41Leu az E5A génben, illetve Ala476Val és Ser486Phe az L1 ORF-ben. Hat aminosav csere valamennyi HPV-11 szekvenciában kimutatható. Az E4 fehérjében detektált Gln46Arg mutáció a 6. betegből származó szekvencia kivételével valamennyi szekvenciában kimutatható. Négy aminosav csere egyedi szekvencia változathoz vezetett: az Ala72Glu csere az E1 régióban és a Gln86Lys aminosav szekvencia változás az E2 fehérjében csak a 4. beteg (HE574704; közepesen agresszív papillomatózis) szekvenciáira jellemző; az L1 szekvencia polimorfizmusok (Ala476Val és Ser486Phe) pedig csak az 5. beteg (HE574702; fokozottan agresszív papillomatózis) mintáiban mutathatóak ki. Ezen változások egyetlen génbanki szekvenciában sem mutathatóak ki.

A szekvencia analízis alapján megállapítható, hogy a különböző agresszivitású papillomatózis elváltozásokból származó HPV-11 szekvenciák E5/E6/E7 onkogénjei aminosav szekvenciájukban azonosak. A 3., 4. és 5. beteg két különböző időpontjában vett mintákból azonos genom szekvenciájú HPV-11 genomok detektálhatóak.

A hat HPV-11 szekvencia LCR-ében összesen hat nukleotid szekvencia változást (a feltételezett szekvenálási hibákat nem számolva) detektáltunk: négy nukleotid cserét, egy inzerciót és egy deléció. A négy nukleotid csere közül kettő (A7413C és T7904A) egyedi nukleotid polimorfizmus, amelyek közül az A7413C csere csak az 5., míg a T7904A csere csak a 6. betegből (mindkettő fokozottan agresszív papillomatózis) származó HPV-11 szekvenciában detektálható változás, utóbbi közvetlenül a harmadik E2 fehérje kötőhely mellett helyezkedik el. Az inzerció valamennyi szekvenciában kimutatható, Upstream transcription factor 1 (USF1) és Specificity factor (Sp1) transzkripciós faktor kötőhelyet érintő mutáció, míg a deléció öt szekvenciában detektálható.

Az általunk vizsgált hat szekvencia közül kettő LCR-e azonos volt, mindkét szekvencia alacsony agresszivitású szoliter papillomából származott (1. és 2. beteg).

Az LCR analízise alapján megállapítható, hogy a nem agresszív papillomatózisokból (1. és 2. beteg) származó HPV-11 szekvenciák LCR-ei azonosak, a közepesen és fokozottan agresszív elváltozásokból származó szekvenciák LCR-ei azonban mind eltérnek egymástól.

Filogenetikai vizsgálatok

Az adatbázisban található HPV-11 szekvenciák származástaniilag közel állnak egymáshoz, az eddig vizsgálatok alapján két filogenetikai vonal rajzolódik ki. Az általunk vizsgált, 6. betegből származó HPV-11 szekvencia (FR872717) három thaiföldi (JQ773408, JQ773410, JQ773411) és egy szlovén szekvenciával (FN907962) együtt az A2 filogenetikai vonalon belül egy jól megkülönböztethető alcsoportot képez.

A filogenetikai vizsgálatok alapján a legkonzervatívabb régiónak az E6 ORF bizonyult, a 95 rendelkezésre álló E6 szekvencia közül - az általunk közölt hat szekvenciát is beleértve - 82 azonos volt

Az L1 ORF esetében a filogenetikai vizsgálatok 15 szekvencia változatot tártak fel, jóllehet a rendelkezésre álló 96 L1 szekvencia közül 62 azonos volt. Az általunk vizsgált szekvenciák közül mind a két nem agresszív, mind pedig a két közepesen agresszív elváltozásból származó szekvencia ebbe a csoportba tartozik. A fő L1 klaszterben tüdőtumorra progrediáló RRP-ből származó izolátum (JN644141) is található. Az általunk vizsgált szekvenciák közül a két fokozottan agresszív papillomatózisból származó szekvencia eltérő klaszterbe tartozik. A 6. betegből származó szekvencia (FR872717) a fő klasztertől két silent SNP-vel különül el és megegyezik két thaiföldi izolátum (egy tüdőbe történő szóródást mutató gégepapillomatózisból származó és egy magas fokú hámdiszpláziát mutató cervikális izolátum) szekvenciájával. A 5. betegből származó szekvencia (HE574702) szintén két SNP-t hordoz, melyek az aminosav szekvenciában is megnyilvánultak.

A filogenetikai elemzések alapján a legjelentősebb szekvencia diverzitást az LCR esetén tapasztaltuk. A fő LCR klaszterbe a vizsgált 95 LCR szekvencia közül 55 sorolható be. Ebbe a klaszterbe az általunk vizsgált hat szekvencia közül pusztán egy, az 5. betegből izolált, fokozottan agresszív papillomatózisból származó szekvencia (HE574702) tartozik.

A két nem agresszív papillomatózisból származó szekvencia (1. beteg: HE574703; 2. beteg: HE574705) LCR szekvenciája megegyezik, de különbözik minden génbanki LCR szekvenciától. A 3. betegből származó, közepesen agresszív HPV-11 szekvencia LCR-e (HE574701) 11 anális régióból izolált szekvenciával egyezik meg (Szlovénia). A 4. betegből, közepesen agresszív papillomatózisból izolált szekvencia (HE574704) egyedi LCR-t képvisel és különbözik valamennyi rendelkezésre álló HPV-11 szekvenciától. Az 5. betegből (fokozott agresszivitású papillomatózis) származó szekvencia (HE574702) a fő LCR klaszterbe

sorolható. A 6. betegből (fokozott agresszivitású papillomatózis) származó LCR szekvencia (FR872717) két thaiföldi izolátummal egyezik meg.

A különböző agresszivitású elváltozásokból származó HPV-11 szekvenciák transzaktiváló potenciáljának vizsgálata

Valamennyi HPV-11 szekvencia esetén a luciferáz-aktivitás jelentős emelkedését figyeltük meg az inzertet nem tartalmazó vektorral transzfektált kontrollhoz képest, a legmagasabb aktivitást a referencia HPV-11 (M14119) esetén detektáltunk.

A két fokozottan agresszív papillomatózisból származó szekvencia (5. beteg, 6. beteg) transzaktiváló hatása jelentősen különbözött egymástól ($p=0,004$), magasabb aktivitást a 6. betegből nyert szekvencia esetén mértünk. Az 5. betegből izolált, fokozottan agresszív papillomatózisból származó szekvencia (HE574702) transzaktiváló hatása közel azonos volt a 3. beteg közepesen agresszív papillomatózisából származó szekvencia (HE574701) aktivitásával ($p=0,575$) és alacsonyabb volt ($p=0,022$) a szintén közepesen agresszív papillomatózisból izolált szekvencia (4. beteg, HE574704) aktivitásánál. Utóbbi szekvencia (4. beteg; HE574704) aktivitása közel azonos volt a fokozottan agresszív papillomatózisból származó, 6. betegből (FR872717) nyert szekvenciával ($p=0,105$).

A nem agresszív elváltozásokból származó szekvenciák (1. és 2. beteg) transzaktiváló képessége jelentősen kisebb volt ($p=0,049$ -től $p<0,001$ -ig) a közepesen agresszív és a fokozottan agresszív elváltozásokból származó szekvenciákhoz képest.

Irányított mutagenézis

A klinikai mintákban detektált hat LCR-re lokalizálódó mutáció közül a 7546-os pozícióban detektált T/C nukleotid csere a referencia plazmidhoz (pHPV-11-LCR-pALuc) képest szignifikánsan ($p=0,003$) csökkentette az LCR transzaktiváló hatását. Ez a mutáció valamennyi, általunk vizsgált szekvenciában, ill. a Génbankban található csaknem valamennyi (88-ból 83) szekvenciában megtalálható.

A fenti egyedi nukleotid polimorfizmuson túl két másik nukleotid szekvencia változás is *attenuátor* hatást eredményezett (7509 T deléción, a 4. betegtől eltekintve valamennyi szekvenciában; A7413C csere az 5. beteg esetén), amely azonban statisztikailag nem volt szignifikáns ($p=0,111$ és $p=0,472$). Ezen két *attenuátor* mutáció a 88 génbanki LCR szekvencia közül 81 ill. 58 esetén figyelhető meg.

A T7904A és a C7479T csere vizsgálataink alapján *potencírozó* hatással bír. A 7904-es pozícióban detektált, közvetlenül az E2BS#3 mellett található T/A csere pusztán a 6. beteg (fokozottan agresszív papillomatózis) és további két génbanki szekvenciában mutatható ki. A C7479T pontmutáció a két fokozottan agresszív, a 3. beteg közepesen agresszív, ill. 81 génbanki szekvenciában detektálható. A T7904A és C7479T mutációk esetén tapasztalt *potencírozó* hatás statisztikailag nem volt szignifikáns ($p=0,551$ és $p=0,372$).

A 7584-es pozícióban detektált C inzerció, mely 77 génbanki szekvenciában is megtalálható, az LCR transzaktiváló hatását nem befolyásolta ($p=0,919$).

Az LCR-ben detektált hat mutáció közül tehát három *attenuátor* (A7413C, T7546C, 7509 T deléción), kettő pedig *potencírozó* (C7479T, T7904A) hatást eredményezett. A 7584-es pozícióban történő C inzerció az LCR transzaktiváló hatását nem befolyásolta. A fenti mutációk közül pusztán a 7546-os pozícióban található T/C hatása bizonyult szignifikánsnak.

Humán papillomavírus koinfekciók vizsgálata a CDV kezelt beteg sorozatmintáiban

Az MY/GP PCR és az azt követő RsaI/TruI emésztés eredménye alapján a vizsgált elváltozásokban HPV-11 mutatható ki, más HPV típussal történt koinfekció nem igazolódott.

A CDV kezelésen átesett beteg 24 sorozatmintájában (14 laryngeális és 10 lágyszájpadli szekvencia) az 1999-től 2007-ig terjedő vizsgálati periódusban kizárólag HPV-11-et detektáltunk, más HPV típus nem volt kimutatható. Az egyes genomi régiók vizsgálata során valamennyi szekvencia esetén mind a vizsgált fehérje kódoló régiók (E1, E2, E6 és E7), mind pedig a hipervariábilis LCR esetén azonos SSCP mintázatot detektáltunk, tehát a 8 évet felölelő vizsgálati szakaszban mindvégig azonos HPV-11 variáns volt kimutatható. A fenti régiók SSCP analízise során több, esetleg eltérő onkogenitású vagy CDV érzékenységgű HPV-11 variáns jelenléte nem mutatható ki.

HPV-11 szekvenciák teljes genom analízise a CDV kezelés előtt, valamint a kezelés virológiai szempontból sikeres és sikertelen szakasza során

A teljes genom analízis során a vizsgálatra kiválasztott öt minta esetén azonos nukleotid szekvenciát detektáltunk. A CDV terápia során nukleotid szekvencia változások nem figyelhetők meg, az egyes terápiás szakaszokból származó HPV-11 szekvenciák nukleotid sorrendje azonos. A teljes genom analízis a vizsgált minták esetén megerősíti az SSCP-vel kapott eredményeket, miszerint a különböző időpontokban vett mintákban

mindvégig azonos variáns mutatható ki, egyéb HPV-11 variáns nem detektálható, illetve SNP-k jelenléte sem igazolható.

A referencia HPV-11 szekvenciához (M14119) képest 28 nukleotid szekvencia változást (24 nukleotid cserét, három inzerciót és egy deléciót) detektáltunk, amelyek közül az inzerciók (7584 C, 7719 G, 7720 C inzerciók) és a deléció (7509 T deléció) kizárólag a fehérjét nem kódoló szabályozó szekvenciát, az LCR-t érintették. A 7584-es, 7719-es és 7720-as pozícióban történt inzerciók potenciális Sp-1 transzkripció faktor kötőhelyet érintenek a virális génexpressziót szabályozó LCR-ben.

Az inzerciókon és deléciókon kívül detektált 24 nukleotid csere közül három az LCR-ben, egy a 3832-es pozícióban fehérjét nem kódoló régióban, húsz pedig a korai és kései fehérjéket kódoló régiókban detektálható. A 7902-es pozícióban, az LCR-ben detektálható T/A mutáció egy E2 fehérje kötőhely közvetlen közelében található. A húsz, kódoló régióban történt mutáció közül hét „*missense*” mutációt detektáltunk, amelyek aminosav cserét eredményeztek az E7, E1, E4, E5 régiókban, míg tizenhárom szekvencia változás „*silent*” mutációhoz vezetett.

A CDV kezelésen átesett beteg sorozatmintáiból származó szekvenciák LCR-ének metilációs analízise

A CDV kezelésen átesett beteg (6. beteg) LCR-ének biszulfít modifikálását követően elvégzett szekvenciális elemzéseinek alapján megállapítható, hogy az E2 kötőhelyekre lokalizálódó nyolc CpG dinukleotid valamennyi vizsgált mintában metilálatlan állapotban van jelen.

MEGBESZÉLÉS

A különböző agresszivitású elváltozásokból származó HPV-11 szekvenciák protein kódoló régióinak szekvencia analízise

Az E6/E7 onkogének szekvenciáinak elemzése alapján megállapítható, hogy az általunk vizsgált szekvenciák esetén a papillomatózis agresszivitása az E6/E7 régiókban tapasztalt mutációkkal nem magyarázható, mivel valamennyi HPV-11 genom E6/E7 szekvenciája azonos (a referencia M14119 szekvenciához képest azonban megfigyelhető eltérések). Az E6/E7 szekvenciákban megfigyelhető variabilitás a szekvencia adatbázisokban

szereplő más HPV-11 izolátumok esetén is minimális, tehát az E6/E7 onkogének a HPV-11 esetén jelentős konzerváltságot mutatnak.

Az E5 ORF-ben az általunk vizsgált szekvenciák esetén az E6/E7 régiókhoz hasonló konzerváltság figyelhető meg, valamennyi szekvencia E5 régiója - az elváltozás agresszivitásától függetlenül - azonos. Az adatbázisban található, elsősorban Szlovéniából származó, minták esetén az E5 ORF variabilitása némileg nagyobb.

Az általunk vizsgált valamennyi szekvencia esetén az E5/E6/E7 onkogének aminosav szekvenciái azonosak, tehát az RRP agresszivitásában mutatkozó különbségek az egyes betegek esetén az E5/E6/E7 onkogén régiók különbségeivel nem magyarázhatóak. Ez a tény érdekes ellentétet mutat a magas onkogén kockázatú HPV típusok (HPV-16, -18) esetén tapasztaltakkal, ahol az egyes intratípusos variánsok, sőt ugyanazon variáns különböző szekvenciájú izolátumai az E6 régió nukleotid és aminosav szekvenciáiban különbözőek, ami egyes variánsok E6 fehérjéhez köthető eltérő onkogenitásban nyilvánul meg. Az E7 régióban a magas onkogén kockázatú típusok esetén jelentős konzerváltságot írták le, ami az általunk vizsgált HPV-11 szekvenciák esetén is megfigyelhető.

A E1/E2 régiókban, a 4. beteg esetén detektált egyedi nukleotid polimorfizmusok (E1 ORF: A72E; E2 ORF: Q86K) az E1 és E2 fehérje esetén is a proteinek szekvencia specifikus DNS kötésért felelős régiókban találhatóak. Mindkét fehérje - egyéb funkciók mellett - fontos szerepet játszik a vírusreplikáció szabályozásában, így részben magyarázhatják az elváltozásból származó HPV-11 szekvencia közepesen agresszív viselkedését.

Az 5. betegből származó HPV-11 szekvencia esetén detektált két L1 mutáció a fehérje C-terminális részét érinti, melynek fontos szerepe van a HPV virionok összeszerelődésében. A két C-terminálisan elhelyezkedő mutáció az L1 fehérje negyedleges szerkezetének módosításával befolyásolhatja a neutralizáló antitest epitóp(ok) hozzáférhetőségét a szervezet antitestjei számára és gátolhatja a hatékony immunválasz kialakulását. Az L1 mutációk az immunválaszt befolyásoló hatáson túl elősegíthetik a virionok összeszerelődését és a virionok képződésének folyamatát. Az 5. betegből származó szekvencia csökkent immunogenitását és/vagy fokozott virion képződését a beteg kórlefolyásában megfigyelhető nagyfokú extralaryngeális szóródás is alátámaszthatja.

Jelen tudásunk szerint a különböző agresszivitású RRP elváltozások és az adott elváltozásból származó HPV-11 szekvenciák nukleotid sorrendje, valamint onkogén

potenciálja közötti összefüggést eddig még nem vizsgálták, ill. a nukleotid adatbázisokban elérhető HPV-11 teljes genom szekvenciák esetén releváns, a kórlefolyást is magában foglaló adatok, a referencia HPV-11 genom, egy thaiföldi és egy USA-ból származó izolátum kivételével, az értekezés írásának idején nem állnak rendelkezésre.

A különböző agresszivitású elváltozásokból származó HPV-11 szekvenciák szabályozó (LCR) régiójának szekvencia analízise

A HPV-k LCR-e fontos szerepet játszik a vírus replikációjában és a vírus-mediált sejtosztódásban. Az LCR transzaktiváló képessége közvetlenül befolyásolja az onkogén expressziót és ezáltal a vírus onkogén potenciálját, ami magas onkogén kockázatú HPV típusoknál már bizonyított. A különböző HPV-16 intratípusos variánsok LCR aktivitása összefüggésbe hozható az adott variáns agresszivitásával.

Vizsgálataink során transzaktivációs kísérletekben tanulmányoztuk az RRP agresszivitása és az egyes HPV-11 szekvenciák LCR-ének transzaktiváló hatásának összefüggését. Kísérleteink során a HEp-2 sejtekben a legalacsonyabb LCR aktivitást a két, egyetlen epizódot okozó, kevésbé agresszív elváltozásból származó HPV-11 szekvencia (1. és 2. beteg) esetén tapasztaltuk, mely feltehetően a két *attenuátor* mutáció következménye lehet.

A közepesen agresszív papillomatózisból (3. és 4. beteg) származó szekvenciák esetén mért magasabb LCR aktivitás a pusztán egyetlen *attenuátor* mutáció jelenléte (4. beteg), ill. a 3. beteg esetén a két *attenuátor* mellett egy *potenciózó* mutáció következménye lehet.

Az 5. beteg agresszív papillomatózisából származó szekvencia LCR aktivitása a közepesen agresszív elváltozásból származó szekvenciákkal közel azonos volt. Az 5. betegből származó HPV-11 szekvencia a 3. beteg két *attenuátor* és egy *potenciózó* mutáció mellett egy további, igen enyhe hatású *attenuátor* mutációt is tartalmaz. Az elváltozás agresszív viselkedése feltehetően az L1 ORF-ben detektált, két aminosav cserét is eredményező mutációra és az erre adott gyenge antitest válaszra vezethető vissza. A 6. beteg agresszív papillomatózisából származó szekvencia fokozott LCR aktivitása a 3. és 5. betegnél is detektálható két *attenuátor* és egy *potenciózó* mutáción túl egy további *potenciózó* hatású szekvencia változásra vezethető vissza. Utóbbi mutáció (T7904A) két thaiföldi izolátumban is megtalálható, melyek egyike súlyos, tüdőbe történő szóródást mutató gégepapillomatózisból, míg másika súlyos, a magas onkogén kockázatú HPV típusokra jellemző, cervikális hámdiszpláziából származik.

Összefoglalva, az egyetlen papillomatózis epizódot okozó HPV-11 szekvenciák esetén csökkent LCR aktivitást és pusztán *attenuátor* mutációkat detektáltunk, míg a relapszusokkal megjelenő elváltozásokból izolált szekvenciák esetén az *attenuátor* mutációk mellett *potenciózó* szekvencia változásokat és a nem agresszív papillomatózisból származó szekvenciákhoz képest fokozott LCR aktivitást tapasztaltunk.

A Génbankban található referencia HPV-11 izolátum (M14119) igen agresszív papillomatózisból származik, amely több mint 70 sebési kimetszést tett szükségessé. A rendelkezésre álló szekvencia adatok alapján valószínűsíthetjük, hogy a 7546-os nukleotid pozícióban általunk is detektált *attenuátor* mutáció reprezentálhatja a vad típust, míg az igen agresszív referencia HPV-11 izolátum ugyanebben a pozícióban *potenciózó* mutációt tartalmaz.

Eredményeinkhez hasonlóan, a HPV-16 intratípusos variánsok esetén az LCR aktivitás korrelál az adott izolátum patogenitásával. Magas onkogén kockázatú HPV típusok esetén az LCR aktivitás közvetlenül hatással van az onkogén expresszióra és ezáltal az adott izolátum onkogén potenciáljára.

Transzfekciós kísérleteink eredményei alapján arra következtethetünk, hogy az általunk vizsgált izolátumok esetén - a HPV-16 intratípusos variánsokhoz hasonlóan - összefüggés lehet az elváltozás agresszivitása és az adott izolátum LCR-ének transzaktivációs képessége között.

A vizsgált HPV-11 szekvenciák filogenetikai analízise

A magas onkogén kockázatú HPV típusok (pl. HPV-16) intratípusos variánsainak geográfiai megoszlásáról, előfordulásáról és az egyes variánsok eltérő onkogenitásáról a HPV kutatás egy jól tanulmányozott területe.

A HPV-16 intratípusos variánsok létezésére számos bizonyíték áll rendelkezésre, melyek a jellemző földrajzi eloszlási mintázat mellett patogenitásukban (onkogén kockázat) is jelentősen különböznek. Mindez felvetheti annak a lehetőségét, hogy az RRP-s elváltozások esetén megfigyelhető jelentős agresszivitásbeli különbségek hátterében eltérő onkogén potenciállal rendelkező HPV-11 intratípusos variánsok állhatnak, mely indokoltá teszi az adatbázisokban található HPV-11 szekvenciák filogenetikai analízisét.

Az alacsony onkogén kockázatú HPV típusok által okozott elváltozások (pl. RRP) eltérő agresszivitásának hátterében álló virológiai, vírus-genetikai tényezők feltárása jelen tudásunk szerint a HPV kutatások eddig nem vizsgált területe, az egyes elváltozások agresszivitása és az adott elváltozásból származó mintában detektálható variáns(ok) szekvencia adatai értékes prognosztikai jelentőséggel bírhatnak.

Burk és mtsai. által végzett szekvencia vizsgálatok alapján a HPV-11 izolátumok kapcsán két lehetséges filogenetikai vonal /A1 és A2/ rajzolódik ki. A két filogenetikai vonal közötti távolság meglehetősen kicsi (0,2%), azonban a HPV-16 intratípusos variánsok esetén megfigyelhető hasonló mintázat kapcsán felvetődhet, hogy a HPV-16-hoz hasonlóan a HPV-11 esetén is léteznek intratípusos variánsok. Az általunk vizsgált HPV-11 izolátumok és az adatbázisban található HPV-11 szekvenciák filogenetikai analízise alapján megállapítható, hogy az eltérő anatómiai régiókból (anogenitális és légúti) származó minták mindkét filogenetikai ágon megtalálhatóak, tehát adott anatómiai lokalizációhoz köthető leszármazási vonal nem határozható meg. A filogenetikai elemzések szerint a legkonzervatívabb régió az E6 ORF, míg a legváltozatosabb az LCR volt.

Az általunk vizsgált hat szekvencia azonos filogenetikai vonalhoz tartozik és származástaniilag közel állnak egymáshoz (a papillomatózis agresszivitásától függetlenül), tehát esetünkben az egyes elváltozásokból származó HPV-11 izolátumok agresszivitásában megfigyelhető különbségek filogenetikai tényezőkkel nem magyarázhatóak. Az esetleg eltérő agresszivitású HPV-11 intratípusos variánsok azonosítását és ezek filogenetikai viszonyainak tanulmányozását nehezíti az a tény, hogy szekvencia adatok kapcsán publikált releváns klinikai adatok meglehetősen hiányosak. Néhány Ázsiából és egy USA-ból származó izolátumon kívül csak Közép-Európából, két szomszédos országból (Szlovénia és Magyarország) állnak rendelkezésre teljes HPV-11 genom szekvenciák a Génbankban, így az intratípusos variánsok és további filogenetikai ágak feltárása a jövőben folytatott munkák feladata.

HPV-11 variáns analízis a CDV kezelés során

A CDV egyike a HPV fertőzések során elsőként felhasznált kemoterápiás szereknek, jóllehet HPV ellen kifejtett pontos hatásmechanizmusa még nem teljesen ismert. A HPV-CDV összefüggésben megjelent közlemények elsősorban a CDV kezelésre adott terápiás választ vizsgálják. A beszámolók szerint a CDV kezelés a HPV fertőzéshez kapcsolható

papillomatózisban az esetek mintegy 60%-ában sikerrel jár, a kezelt betegek mintegy 40%-ában csak átmeneti, részleges terápiás siker, vagy annak teljes sikertelensége figyelhető meg.

A CDV kezelés terápiás és virológiai sikertelenségének hátterét vizsgáló tanulmányok azonban jelen tudásunk szerint nem állnak rendelkezésre. A CDV kezelés kezdeti terápiás sikere, majd a relapszusok számának növekedése, ill. a teljes terápiás sikertelenség felvetheti több olyan HPV mutáns/variáns jelenlétét, akár azok CDV kezelés során történő létrejöttét, melyek CDV érzékenysége eltérő lehet. Ezt a feltevést támaszthatja alá a CDV kezelésen átesett, agresszív papillomatózisban szenvedő beteg esetén Major és mtsai (2008) által megfigyelt kezdeti, jelentős HPV-11 kópiaszám csökkenés, majd ezt követő markáns növekedés a CDV terápia során.

Az eltérő HPV variánsok jelenlétének vizsgálata papillomatózis elváltozásokban viszonylag ritka, ezek is inkább magas onkogén kockázatú HPV típusokra terjednek ki. Azonos betegből származó, különböző időpontokban vett sorozatmintákban történő HPV variáns analízis is elsősorban magas onkogén kockázatú HPV típusokra és döntően a variábilis LCR-re terjednek ki, légúti papillomatózisok esetén az ilyen irányú vizsgálatok teljesen hiányoznak. Az 1. közleményben leírt vizsgálatok során a CDV kezelés virológiai sikertelenségének vírus-geneteikai hátterét vizsgáltuk. A CDV kezelés előtti terápiás-virológiai siker, majd az ezt követő virológiai sikertelenség szakaszaiból származó mintákból izolált HPV-11 szekvenciák E6, E7, E1, E2 régiói és LCR-e SSCP és teljes genom analízise alapján megállapítható, hogy a vizsgált, mintegy 8 évet magában foglaló periódusban (1999-2007) mind a gégeből, mind a lány szájpadból származó mintákban ugyanazon HPV-11 variáns mutatható ki. A szekvenciák elemzése alapján az eltérő cidofovir érzékenységgű HPV-11 genomok jelenléte és csökkent CDV érzékenységet biztosító mutációk kialakulása nem igazolható, a CDV terápia virológiai sikertelensége a kezelés során kialakult mutációk létrejöttével esetünkben nem magyarázható, hiszen a CDV kezelést megelőzően, mind pedig azt követően azonos teljes genom szekvenciákat detektáltunk.

A HPV-11 genom nagyfokú stabilitását támaszthatja alá az a tény, hogy a 8 évet felölelő vizsgálati periódus során a HPV tipizálás alapján mindvégig ugyanazon HPV-11 szekvencia volt kimutatható, eltérő HPV-11 altípusok és variánsok nem detektálhatóak. Ez feltehetően arra a tényre vezethető vissza, hogy a papillomavírusok replikációját a nagy másolási hűséggel rendelkező humán DNS polimeráz végzi.

HPV-11 teljes genom és LCR metilációs analízis a CDV kezelés során

A HPV-k LCR-ére lokalizálódó konszenzus E2 fehérje kötőhelyek szekvenciájukból (5'- ACCG(N)₄CGGT-3) adódóan lehetőséget teremtenek az E6/E7 onkogén expresszió CpG metiláció útján történő epigenetikai szabályozásra. Thain és mtsai (1996) megfigyelése szerint az E2 kötőhelyek *in vitro* metilációja gátolja az E2 fehérje LCR-hez történő kötődését, a regulatorikus E2 kötődésének gátlása így hatással lehet az E2 onkogén expressziót szabályozó működésére.

A referencia HPV-11 genommal (M14119) összehasonlítva a CDV kezelt betegből származó HPV-11 (FR872717) E1, E4, E5, E7 és LCR szekvenciákban detektált mutációk a terápia sikertelenségét és a papillomatózis agresszivitását ugyan magyarázhatják, a kezelés során a vírus kópiaszám változásaira és a kezelés kinetikájának lefutására azonban nem adnak magyarázatot, mivel valamennyi, különböző időpontban vett mintában kimutathatóak. A vizsgált öt szekvencia E2 kötőhelyinek metilációs mintázata feltehetően nem ad magyarázatot a kezelés virológiai sikertelenségére, mivel a metilációs analízis során mind a kezelést megelőző, mind pedig az követő vizsgálati periódusból származó HPV-11 szekvenciák esetén az E2 kötőhelyek CpG dinukleotidjai egyöntetűen metilálatlanok voltak.

A CDV kezelt beteg kapcsán rendelkezésre álló sorozatminták - a CDV rezisztenciához kapcsolható metilációs analízis mellett - egyedülálló lehetőséget jelentettek a HPV-11 szekvenciák metilációs mintázatának mintegy 8 évet felölelő, időbeli nyomonkövetésére. A vizsgált öt szekvencia analízise a HPV-11 metilációs mintázatának stabilitására utalhat.

Az alacsony onkogén kockázatú HPV típusok LCR-ének metilációs analízisét célzó tanulmányok az értekezés írásának idején meglehetősen hiányosak. A rendelkezésre álló irodalmi adat az aerodigestív papillomákból származó HPV-6 izolátumok LCR-ének metilálatlanságáról számol be. A rendelkezésre álló csekély számú irodalmi adat szükségessé teszi a terület behatóbb, jelentős mintaszámot magában foglaló analízisét, mely magában foglalhatja a több papillomatózis epizóddal rendelkező izolátumok esetén a metilációs mintázat esetleges változásainak időben történő nyomon követését, esetleg az extralaryngeális szóródást mutató elváltozások esetén az eltérő anatómiai lokalizációkból nyert minták metilációs elemzését is.

ÖSSZEFOGLALÁS

A HPV által okozott légúti papillomatózis különböző agresszivitású papillomatózis elváltozások formájában nyilvánulhat meg, amelyek a relapszusok és a szükséges sebészeti beavatkozások eltérő gyakorisága, az elváltozások különböző anatómiai régiókra történő kiterjedésre, valamint az esetleges adjuváns terápia szükségessége alapján enyhe, közepesen és fokozott agresszivitású elváltozásokra csoportosíthatóak.

Munkánk során a papillomatózis agresszivitása és virológiai státusza közötti összefüggéseket vizsgáltuk az elváltozásokból származó HPV-11 genomok szekvencia-, variáns- és filogenetikai analízisével. Munkánk másik vonalát egy cidofovir kezeléssel átesett beteg sorozatmintáinak szekvencia- és metilációs analízise képezi, melynek során a cidofovir kezelés sikertelenségének virológiai hátterét vizsgáltuk.

Eredményeinket az alábbiak szerint foglalhatóak össze:

- 1) A különböző agresszivitású elváltozásokból származó HPV-11 genomok szekvencia analízise alapján megállapítható, hogy az egyes RRP elváltozások agresszivitásában megfigyelhető különbségek az egyes HPV-11 szekvenciák nukleotid/aminosav sorrendjének különbségeivel egyértelműen nem magyarázhatóak, az eltérő agresszivitás nem hozható összefüggésbe pusztán az adott (kevésbé, közepesen vagy fokozott) agresszivitást mutató csoportra jellemző mutációval/szekvencia változással.
- 2) Az eltérő agresszivitás lehetséges, bár nem egyértelmű magyarázata az LCR transzaktiváló hatásában megfigyelhető különbségek lehetnek. Az egyes szekvenciák esetén a virális transzkripciót szabályozó E1/E2, ill. az L1 kapszid fehérjét kódoló génszakaszokban található mutációk magyarázhatják annak agresszívabb viselkedését. Az agresszivitás mértéke és a nukleotid/aminosav szekvencia különbségek közötti összefüggés közötti kapcsolat vizsgálatát nehezíti az a tény, hogy a rendelkezésre álló HPV-11 szekvenciák kapcsán a hozzáférhető releváns klinikai adatok erősen limitáltak.
- 3) Az agresszivitás mértékében megfigyelhető különbségek virológiai tényezőkkel egyértelműen nem magyarázhatóak, az eltérő agresszivitásban feltehetően fontos szerepet kap a beteg egyedi génexpressziós profilja,

immunológiai státusza, immunválasza is, ill. az esetleges más vírusokkal történő koinfekció is.

- 4) A CDV kezelt beteg sorozatmintáinak szekvencia és SSCP vizsgálata alapján megállapítható, hogy a vizsgálati periódus (1999-2007) során valamennyi anatómai lokalizációban ugyanazon HPV-11 típus detektálható, melyek LCR-e azonos metilációs mintázatot mutatott, a kezelés virológiai sikertelensége HPV-11 mutációkkal és eltérő érzékenységű HPV-11 variánsokkal nem magyarázható.

Iktatószám: DEENKÉTK/303/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Gáll Tamás

Neptun kód: FUA5FH

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gáll, T.**, Kis, A., Tatár, T.Z., Kardos, G., Gergely, L., Szarka, K.: Genomic differences in the background of different severity in juvenile-onset respiratory papillomatosis associated with human papillomavirus type 11.
Med. Microbiol. Immunol. Epub ahead of print (2013)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-013-0297-y>
IF:3.545 (2012)
2. **Gáll, T.**, Kis, A., Fehér, E., Gergely, L., Szarka, K.: Virological failure of intralesional cidofovir therapy in recurrent respiratory papillomatosis is not associated with genetic or epigenetic changes of HPV11: Complete genome comparison of sequential isolates.
Antiviral Res. 92 (2), 356-358, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.09.007>
IF:4.301

További Közlemények

3. Palicz, Z., Jenes, Á., **Gáll, T.**, Miszti-Blasius, K., Kollár, S., Kovács, I., Emri, M., Márián, T., Leiter, É., Pócsi, I., Csősz, É., Kalló, G., Hegedűs, C., Virág, L., Csemoch, L., Szentesi, P.: In vivo application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF).
Toxicol. Appl. Pharmacol. 269 (1), 8-16, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.02.014>
IF:3.975 (2012)



4. Ruzsnavszky, O., Dienes, B., Oláh, T., Vincze, J., **Gáll, T.**, Balogh, E., Nagy, G., Bátori, R., Lontay, B., Erdődi, F., Csernoch, L.: Differential Effects of Phosphatase Inhibitors on the Calcium Homeostasis and Migration of HaCaT Keratinocytes.
PLoS One. 8 (4), e61507-, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061507>
IF:3.73 (2012)
5. Csoma, E., Mészáros, B., **Gáll, T.**, Asztalos, L., Kónya, J., Gergely, L.: Dominance of variant A in human Herpesvirus 6 viraemia after renal transplantation.
Viol. J. 8, 403, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-8-403>
IF:2.343
6. Fehér, E., Kardos, G., **Gáll, T.**, Kis, A., Gergely, L., Szarka, K.: Comparison of diversity of torque teno virus 1 in different mucosal tissues and disorders.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 58 (4), 319-337, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/AMicr.58.2011.4.8>
IF:0.787
7. Fehér, E., **Gáll, T.**, Murvai, M., Kis, A., Boda, R., Sápy, T., Tar, I., Gergely, L., Szarka, K.: Investigation of the occurrence of torque tenovirus in malignant and potentially malignant disorders associated with human papillomavirus.
J. Med. Virol. 81 (11), 1975-1981, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21627>
IF:2.47
8. Kis, A., Fehér, E., **Gáll, T.**, Tar, I., Boda, R., D. Tóth, E., Méhes, G., Gergely, L., Szarka, K.: Epstein-Barr virus prevalence in oral squamous cell cancer and in potentially malignant oral disorders in an eastern Hungarian population.
Eur. J. Oral. Sci. 117 (5), 536-540, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0722.2009.00660.x>
IF:1.956
9. Szarka, K., Tar, I., Fehér, E., **Gáll, T.**, Kis, A., D. Tóth, E., Boda, R., Márton, I., Gergely, L.: Progressive increase of human papillomavirus carriage rates in potentially malignant and malignant oral disorders with increasing malignant potential.
Oral Microbiol. Immunol. 24 (4), 314-318, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-302X.2009.00516.x>
IF:2.336

10. Major, T., Sziklai, I., Czeglédy, J., **Gáll, T.**, Gergely, L., Szarka, K.: Follow-up of HPV DNA copy number in cidofovir therapy of recurrent respiratory papillomatosis.
Anticancer Res. 28 (4B), 2169-2174, 2008.
IF:1.39

Összesített impakt faktor: 26.833

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 7.846

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

Debrecen, 2013.09.13

