

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Rekurrens légúti papillomatózisok prognosztikai tényezőinek vizsgálata

Nagy Zsófia

Témavezető: Dr. Szarka Krisztina



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2022

REKURRENS LÉGÚTI PAPILLOMATÓZISOK PROGNOSZTIKAI TÉNYEZŐINEK VIZSGÁLTA

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

Írta: Nagy Zsófia okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Dr. Szarka Krisztina

Az értekezés bírálói:

Dr. Fehér Enikő, PhD
Dr. Varga István, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, MTA doktora
tagok: Dr. Fehér Enikő, PhD
Dr. Varga István, PhD
Dr. Tóth Erika, PhD
Dr. Kozma Bence, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2022. 11. 08. 11 óra, Debreceni Egyetem, Augusztá, 315-ös
szemináriumi terem

Bevezetés

Bár a rekurrens légúti papillomatózis (recurrent respiratory papillomatosis, RRP) egy jóindulatú elváltozás, a recidívák ismételt megjelenése, a léziók extralaringeális terjedése és esetleges malignizációja következtében súlyos kórlefolyás is kialakulhat, ami a páciensek életminőségének jelentős romlásához vezethet. Ezen elváltozások kialakításában az alacsony onkogén kockázatú humán papillomavírus (HPV) 6 és 11 etiológiai szerepe már bizonyított, további klinikai vizsgálatok pedig igazolták, hogy a papillomatózisok agresszívebb lefolyású eseteiben a HPV11 genotípus mutatható ki gyakrabban. Az elsődleges terápiás lehetőség a papillomák sebészi úton történő eltávolítása, azonban az esetek 20%-ában valamilyen adjuváns kezelés alkalmazása is szükségessé válhat.

Munkacsoportunk korábban már vizsgálata a különböző súlyosságú légúti papillomatózisokból származó HPV11 szekvenciák esetében a vírusgenomok közötti szekvencia eltérések és a kórlefolyásban mutatkozó különbségek közötti kapcsolatot. Az eredmények azt mutatták, hogy a HPV11 fő kapszid fehérjéjét kódoló régióban (L1 ORF), valamint a vírus replikáció/transzkripció szabályozásáért felelős régiókban (E1, E2 ORF, LCR) azonosított nukleotid polimorfizmusok magyarázhatják a papillomatózisok manifesztációjában tapasztalható különbségeket.

Kutatások kimutatták, hogy számos akut és krónikus betegség kialakulása és progressziója összefüggésbe hozható a páciensek egyedi tulajdonságaival. Az infekciós kórképek esetében a fertőző ágensek egyedi jellemzői, genetikai variánsaik eltérő tulajdonságai ugyancsak hatással lehetnek az okozott betegség progressziójára, kimenetelére. A HPV-ok esetében ez az összefüggés a magas onkogén kockázatú genotípusok, különösen a HPV16 esetében, széles körben tanulmányozott, ugyanakkor az alacsony onkogén kockázatú genotípusok esetében ilyen – a klinikummal való korrelációt vizsgáló – tanulmányok eredményei csak korlátozottan állnak rendelkezésre. Vizsgálataink az alacsony onkogén kockázatú HPV6 és HPV11 intratípusos variációjára, a variánsok patogenitására, az okozott betegségek kórlefolyása közötti kapcsolat feltárásához szolgáltatnak újabb adatokat, amely megkönnyíthetik a HPV6- és HPV11-asszociált betegségek prognózisának megítélését, illetve akár segítséget nyújthatnak a személyre szabott terápia kidolgozásához.

Irodalmi áttekintés

Korábban a papillomavírusokat (PV) a polyomavírusokkal együtt a *Papovaviridae* családba sorolták. Ez elsősorban a két vírus hasonló morfológiai tulajdonságai alapján történt. A virális genomok különbségeinek megismerése után azonban a vírusokat a Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) két családba osztotta, a *Papillomaviridae* és a *Polyomaviridae* víruscsaládba.

A PV-ok klasszifikációja a vírus legkonzervatívabb, L1 fő kapszidfehérjét kódoló nyitott leolvasási keret (open reading frame, ORF) szekvenciája alapján történik. Ha az L1 ORF DNS szekvenciája több mint 10 %-ban eltér a legközelebbi ismert PV szekvenciájától, új genotípusról, ha az eltérés 2-10% közötti, szubtípusról, ha pedig kevesebb mint 2%, akkor intratípusos variánsról beszélünk.

A humán papillomavírusokat (HPV) DNS szekvenciájuk alapján öt (*Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, *Mu*- és *Nupapillomavirus*) nemzetségbe sorolhatjuk; az eltérő típusok különböző életciklussal, illetve eltérő hozzájuk asszociált kórképekkel jellemezhetők.

A PV-ok burok nélküli, ikozahedrális kapsziddal rendelkező vírusok, körülbelül 8 kilobázis (kb) hosszúságú cirkuláris dupla-szálú DNS genommal rendelkeznek. A genomjuk nyolc gént kódol. Három onkoproteinjük (E6, E7 és E5) a transzformációért felelős, két regulátor fehérjék (E1 és E2) a vírusreplikációt és transzkripciót szabályozza, az E4 protein pedig a vírus kiszabadulásában játszik szerepet. Két kapszid fehérjével rendelkeznek; az L1 a fő kapszidprotein, az L2 pedig a minor kapszid fehérje. A vírus életciklusának szabályozásában egy cisz-válaszadó elemekben gazdag, fehérjét nem kódoló hosszú szabályozó régió (long control region, LCR) is részt vesz, mely az L1 és E6 ORF között helyezkedik el a genomban.

Az alacsony és a magas onkogén kockázatú HPV genotípusok genom szerveződésében több különbség is megfigyelhető. Az egyik eltérést az E5 onkoprotein esetében figyelhetjük meg; míg a magas onkogén kockázatú HPV genotípusok esetében egy E5 fehérjéről beszélhetünk, addig az alacsony onkogén kockázatú genotípusok esetében E5A és E5B (illetve E5 γ és E5 δ) fehérjéket különböztetünk meg. Az alacsony onkogén kockázatú genotípusok E5A fehérjéje a magas onkogén kockázatú típusok E5 fehérjéjéhez hasonlóan gyenge transzformáló hatással rendelkezik.

Ugyancsak különbség van a magas és alacsony onkogén kockázatú HPV-k E6 és E7 onkoprotein expressziójának szabályozásában. A magas onkogén kockázatú HPV genotípusok E6/E7 transzformáló fehérjéjének közös promotere van (pl. HPV16 esetében a p97), míg az alacsony onkogén kockázatú vírusok esetében két külön promoter szabályozza az onkoproteinek expresszióját. A HPV11 esetében az E6 fehérje expressziójáért felelős promoter az LCR-en belül, a 90. nukleotid pozíciónál található, míg az E7 fehérje expressziót szabályozó promoter régió a 264. nukleotid pozíciótól indul.

A HPV-k életciklusa szorosan kapcsolódik a keratinocita sejtek differenciálódási folyamatához, amely során az érett, fertőzőképes virionok megjelenése a terminálisan differenciálódott szuprabazális rétegben lévő sejtekre korlátozódik. A hámrétegének horzsolása következtében a bőr által biztosított mechanikai védelmi vonal megszakad és ez lehetőséget nyújt a HPV virionoknak, hogy hozzáférjenek a többrétegű laphámot határoló *membrana basalis* sejtsíkjaihoz; a fertőzött bazális

sejtek osztódása a vírusgenom leánysejtekbe jutását eredményezi. A mitózist követően az egyik sejt a bazális membránban marad, míg a másik sejt a szuprabazális réteg felé halad, miközben terminálisan differenciálódik és a sejtek migrációja révén a fertőzés végighalad a hámszövet rétegein. A fertőzés során az L1 fő kapszid fehérje kötődik a célsejt felszínén található extracelluláris mátrix heparán-szulfát proteoglikán (HSPG) komponenséhez, ami konformációváltozást eredményezve lehetővé teszi az L2 fehérje N-terminálisának felszínre kerülését és annak az extracelluláris furinnal történő hasítását. Ez a lépés további konformációváltozáshoz vezet a kapszidban, lehetővé téve a vírus másodlagos sejtfelszíni receptorokhoz (pl. $\alpha\beta 4$, integrin, annexin A2) való kapcsolódását. Ezt követi a vírus sejtbe jutása, az endoszomális vezikulumon keresztül történő internalizáció és végül az L2 fehérje segíti a vírusgenom endoszomális eljutását a sejtmaghoz.

A HPV-ok az egyik leggyakoribb szexuális úton terjedő kórokozók világszerte. A HPV-asszociált fertőzések két nagy csoportját különböztethetjük meg: az egyik csoportot a bőr HPV-asszociált fertőzései képezik, melybe beletartoznak a különböző típusú szemölcsök (lapos, pigmentált, talpi, közönséges, fonalas), ide sorolható az *epidermodysplasia verruciformis* (melyet leggyakrabban a HPV5 és HPV8 genotípusok okozzák), valamint egyéb malignus bőrtumorok. A másik csoportot a nyálkahártya HPV-asszociált fertőzései alkotják, melyek további két csoportba sorolhatóak. Az első csoportba az alacsony onkogén kockázatú HPV genotípusok által okozott elváltozások tartoznak, mint pl. a *condyloma acuminatum* vagy a fej-nyaki régiót érintő rekurrens légúti papillomatózis (recurrent respiratory papillomatosis, RRP); míg a másik csoport a magas onkogén kockázatú HPV genotípusok által, az anogenitális traktusban vagy a fej-nyaki régióban okozott rákmegelőző állapotokat és malignus megbetegedéseket foglalja magába.

Az anogenitális HPV infekció a leggyakoribb szexuális úton terjedő fertőzés. A genitális papillomák leggyakoribb megjelenési formája a *condyloma acuminatum*, amely nők esetében elsősorban a méhnyak és a szeméremajak területén, míg a férfiaknál pénisz és végbélnyílás tájékán fordul elő.

A *leukoplakia penis* rákmegelőző állapot, amely kialakulhat HPV-fertőzés következtében, rossz higiénés szokások miatt, de a dohányzás is rizikófaktornak számít.

Az ismeretlen jelentőségű atípusos laphámsejtek (atypical cells of undetermined significance, ASCUS) és az enyhe fokú laphámsejtes intraepiteliális léziók (low grade squamous intraepithelial lesion, LSIL) esetében - a magas fokú, laphámsejtes intraepiteliális elváltozásokkal (high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL) ellentétben - a laphámsejtek nagyobb gyakorisággal képesek normál állapotukba visszafejlődni és csak néhány esetben alakul ki HSIL. Az ASCUS és az LSIL általánosan a populáció 5,0%-át érinti, a citológiai utánkövetéseket összefoglaló tanulmányok alapján az esetek 5,2%-8,7%-ából alakul ki HSIL.

Az RRP egy ritka, jóindulatú elváltozás, melynek kialakításában az alacsony onkogén kockázatú HPV6 és 11 genotípusok játszanak etiológiai szerepet. A papillomák a légzőrendszer nyálkahártyáján alakulnak ki, kevesebb mint 1% az esély a rosszindulatú átalakulásukra.

Jelenleg a betegek kora alapján 12 éves kor alatt diagnosztizált fiatalkori (juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis, JO-RRP), valamint felnőttkori (adult-onset recurrent respiratory papillomatosis, AO-RRP) – 12 éves életkor felett, de leginkább 20-40 éves kor között - diagnosztizált papillomatózist különböztetünk meg; a HPV11 fertőzés fiatal életkorban történő diagnosztizálás esetén súlyosabb lefolyású kórképpel társulhat.

Számos molekuláris diagnosztikai módszer használható a HPV fertőzések kimutatására. A legfőbb diagnosztikai technikák a HPV detektálására és genotipizálására a target, a szignál és a próba amplifikációs vizsgálati módszerek.

A papillomatózis helyes diagnosztizálásához elengedhetetlen az etiológiai szempontok, a klinikai jellemzők, valamint a bronchoszkópos és képalkotó eszközzel (pl. CT-vel) történő vizsgálatok eredményeinek ismerete. Az RRP diagnosztizálására a legjobb módszer a gége vizuális vizsgálata, melyre alkalmas eszköz a flexibilis száloptikás nazofaringoszkóp, amely információt ad a hangszalagok mobilitásáról és a légutak átjárhatóságáról, melyek alapján meghatározható a sebészi beavatkozások szükségessége és sürgőssége.

Az RRP kezelésére jelenleg nincs teljes eradikációt biztosító gyógymód; a kezelés főként a légutak szabadon tartására és a hangszalagok épségének megőrzésére fókuszál. Az RRP elsődleges kezelési módja a műtéti beavatkozás, azonban az esetek 20%-ában valamilyen adjuváns kezelésre is szükség van. Klinikai kutatások során az interferon-alfa, a cidofovir, a bevacicumab, a celecoxib, az acyclovir, a ribavirin és az indol-3-karbinol hatását vizsgálták az RRP terápiás lehetőségeként.

Jelenleg három, az USA Élelmiszer és Gyógyszerfelügyelete (Food and Drug Administration, FDA) által engedélyezett profilaktikus HPV vakcina érhető el kereskedelmi forgalomban. A bivalens Cervarix a méhnyakrák kialakításáért felelős két leggyakoribb HPV genotípus, a HPV16 és HPV18 vírus-szerű partikulumait (virus-like-particle, VLP) tartalmazza. A négykomponensű Gardasil a két magas onkogén kockázatú HPV genotípus mellett az RRP-ban leggyakrabban kimutatott két alacsony onkogén kockázatú HPV genotípus, a HPV6 és HPV11 VLP-it is magába foglalja. A legújabb Gardasil 9 vakcina egy nonavalens vakcina, melyben már kilenc HPV genotípus VLP-i (HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 és 58) találhatóak.

A HPV6 és 11 genotípusok esetében is vizsgálták az intratípusos variancia jelenlétét. Munkacsoportunk vizsgálata először a HPV11 intratípusos variancia meglétét, valamint a különböző agresszivitású papillomatózisok és a virológiai státusz közötti összefüggést a HPV11 genomok szekvencia-, variáns és filogenetikai analízisével. Az eredmények alapján a HPV11 LCR és a kapszid

fehérjéket kódoló régió variabilitása felelős lehet az eltérő súlyosságú kórképek kialakulásáért. A génbankban található HPV11 szekvenciák filogenetikai analízise során korábban két nagy filogenetikai vonalat (A1 és A2) azonosítottak.

A HPV6 esetében a génbankban található teljes genom szekvenciák filogenetikai analízise során két fő vonalat (A és B klaszter), valamint a B klaszteren belül tovább öt alcsoportot különítettek el.

Jelen és munkatársai 2014-ben a HPV6 esetében végeztek variáns analízist, míg a HPV11 kapcsán 2016-ban született egy tanulmányuk, mely eredményei alapján az intratípusos diverzitás és a globális migrációs mintázat közötti kapcsolatot vizsgálva az nem mutat korrelációt, szemben a magas onkogén kockázatú HPV16 és HPV18 genotípusokkal.

Célkitűzések

1. Új és a korábban vizsgálatba vont betegek mintáiban azonosított HPV11 szekvenciák teljes genom analízise és a teljes genomok filogenetikai elemzése a génbanki adatok felhasználásával. A vizsgálatainkat kiterjesztettük a HPV6 genotípusra is.
2. A nukleotid polimorfizmusok hatásának vizsgálata az aminosav-sorrendre és a fehérje struktúrára. HPV 11 esetében fehérje modellezés segítségével vizsgáltuk, hogy az aminosav-cserék hogyan befolyásolhatják az E2 vírusfehérje funkcióját.
3. HPV11 esetében irányított mutagenézissel a hosszú szabályozó régióban (long control region, LCR) újonnan azonosított egyedi polimorfizmusok hatásának vizsgálata.
4. Az LCR funkcionális analízise, valamint a HPV11 esetében az E2 fehérje variánsokkal való kölcsönhatásának vizsgálata.

Anyag és módszer

Betegek adatai

Munkacsoportunk rekurrens légúti papillomatózisban szenvedő páciensek mintáit (papillómákból származó szövetminták, valamint egészséges nyálkahártya területéről vett exfoliatív sejtminták), valamint genitális szövet- és exfoliált sejt mintákat vizsgált. Az RRP minták közül kilenc bizonyult HPV6, 13 pedig HPV11 pozitívnak (mely közül hatot munkacsoportunk már korábbi vizsgálata során bemutatott). Két korábban is vizsgált HPV11 pozitív beteg esetében (5-ös és a 6-os páciens), lehetőségünk volt új recidívákból származó szövetminták, valamint exfoliatív sejtek vizsgálatára is. Több újonnan vizsgálatba vont páciens esetében is több recidívából származó szövetminta vizsgálata történt meg, valamint egy esetben több eltérő lokalizációból (szupraglottis, szubglottis, illetve sztóma) is érkezett szövetminta. A minták eltérő súlyosságú kórképekből származtak (szoliter,

mérsékelt és agresszív papillomatózis) és 10 felnőttkori, valamint 12 juvenilis eset vizsgálatára nyílt lehetőségünk.

A fej-nyaki minták mellett lehetőségünk volt anogenitális mintákban (*condyloma acuminatum*, ASCUS, LSIL, cervikális atípiá, *leukoplakia penis*) azonosított HPV6 és HPV11 genomok vizsgálatára is. A tanulmány megkapta az etikai bizottság jóváhagyását (engedélyezési száma: 4169-2014).

Nukleinsav izolálás és a vírusok jelenlétének kimutatása

A szövet, illetve az exfoliált sejt mintákból a nukleinsav izolálást végeztünk, majd a β -globin gén egy körülbelül 110 bp hosszúságú szakaszára specifikus polimeráz láncreakcióval (polymerase chain reaction, PCR) ellenőriztük az izolált DNS integritását és amplifikálhatóságát.

A HPV-specifikus szekvenciák kimutatása MY/GP nested PCR-rel, a HPV genotípusok meghatározására az MY amplimerek restrikciós fragmenthossz polimorfizmus analízissel (restriction fragment length polymorphism, RFLP) történt.

Teljes genom amplifikáció és egyedi nukleotid polimorfizmusok meghatározása

A HPV6 és 11 genotípusok meghatározása után a munkacsoportunk által tervezett primerekkel teljes genom amplifikációt végeztünk. A PCR-t követően az amplimereket 1%-os alacsony olvadáspontú preparatív agaróz gélben elektroforetizáltuk, majd a megfelelő termékeket gélből tisztítottuk. A tisztított mintákat agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, majd mindkét irányból szekvenáltattuk (Macrogen, Amsterdam, Hollandia).

A teljes genomok összeállítását, a referencia genomokhoz történő illesztését és a szekvencia adatok elemzését a CLC Main Workbench 7.9.1 szoftverrel végeztük.

Filogenetikai analízis

A génbankban található, összesen 197 HPV6 és 88 HPV11 teljes genom szekvenciát (magába foglalja a munkacsoport által korábban vizsgált hat szekvenciát), valamint az újonnan azonosított szekvenciáinkat használva filogenetikai analízist végeztünk.

Az azonos HPV6 és HPV11 szekvenciák esetében az analízis során csak egy szekvenciát használtunk. A dendrogrammok elkészítéséhez a CLC Main Workbench 7.9.1 szoftvert használtuk, az elemzéshez neighbour-joining módszert, 1000-szeres bootstrapping-et állítottunk be. Outgroupként a HPV6 szekvenciák filogenetikai elemzéséhez a HPV11 referencia szekvenciát, a HPV11 esetében pedig a HPV6A1 (korábban HPV6b) referencia szekvenciát használtuk.

Transzkripciós faktor kötőhelyek vizsgálata HPV6 genotípus esetében

A feltételezett transzkripciós faktor kötőhelyek meghatározása során maximális 10%-os szekvencia különbséget engedélyeztünk, a kötőhelyek keresését a PROMO szoftver segítségével az ALGGEN szerveren végeztük. Az egyes LCR-ekben a feltételezett transzkripciós kötőhelyek elvesztését vagy megjelenését az adott csoport referencia szekvenciájához viszonyítottuk.

HPV11 E2 fehérjének in silico modellezése

Az egyedi nukleotid polimorfizmusok meghatározását követően vizsgáltuk, hogy az egyes ORF-ek esetében mely nukleotid polimorfizmusok eredményeznek aminosavcserét a referencia típusokhoz képest. Ezt követően *in silico* fehérje modellezéssel vizsgáltuk, hogy az aminosav eltérések okozhatnak-e a variánsban szerkezeti, illetve funkcionális eltéréseket a referencia vírusfehérjéhez képest. Vizsgálatunk a HPV11 E2 fehérje modelljének elkészítésére terjedt ki, mivel ez a fehérje fontos szerepet tölt be a vírus replikáció szabályozásában, valamint képes kötődni a vírus LCR-éhez, mely kölcsönhatásra funkcionális vizsgálataink is kiterjedtek.

A referencia HPV11 szekvencia alapján meghatároztuk az aminosav szekvenciát és ezt alapul véve homológ modellezéssel és loop modellezés használatával létrehoztuk a referencia E2 fehérje teljes hosszúságú negyedleges szerkezetét. A HPV11 transzaktivációs domén (TAD) dimer modellezéséhez szerkezetileg összehasonlítottuk az irodalomban elérhető HPV11 TAD kristályszerkezetet a szintén elérhető HPV16 E2 fehérje dimer transzaktivációs doménjének kristályszerkezetével az UCSF Chimera szoftvert használva, majd a modellt szerkezetileg optimalizáltuk. A HPV11 DNS-kötő domén (DBD) homológ modelljének előállítását a HPV6 B3 alcsoport E2 DBD-DNS komplex kristályszerkezete alapján a SWISS-MODEL szerver segítségével történt. A DNS komplementert a HPV11 E2 DBD-hez a SCF BIO DNA Sequence to Structure Tool webszerverrel terveztük. A HPV11 E2 DBD variánsaihoz a komplementer DNS-t a NPDock szerverrel dokkoltuk; a fehérje és a DNS felület kapcsolódása korlátozott a konzervált DNS-kötőhelyek miatt. Végezetül a hinge régió (193-270 aminosav közötti régió) *de novo* modellezése az I-Tasser szerver segítségével történt és a legmagasabb konformációs C-score értékkel rendelkező modellt illesztettük a TAD és DBD doménekhez az UCSF Chimera szerveren, ezzel létrehozva a teljes hosszúságú HPV11 E2 fehérje szerkezetét.

A fehérje létrehozása után három megközelítésből vizsgáltuk a referencia E2 fehérje és a variáns fehérjék közötti különbségeket. Megvizsgáltuk a sejtfelszíni töltésváltozást, a lehetséges foszforilációs helyek jelenlétét és hiányát, valamint az aminosavak közötti interakciókat a fehérjeláncon belül, illetve természetes ligandjukkal. Emellett az Autodock Vina, valamint a PreDBA szerver használatával megbecsültük és összehasonlítottuk a szabadentalpia-változásokat. A ligand

kölcsönhatásokat a LigPlot+ szerverrel elemeztük, a modellek végső ábrázolásához pedig az UCSF Chimera X szoftvert használtuk. Végezetül a fehérje modell geometriáját a SAVES Ramachandran Plot használatával hitelesítettük és a modelleket feltöltöttük a Protein Model Adatbázisba.

A lehetséges foszforilációs helyeket az E2 fehérje variánsokban a NetPhos 3.1. szerver segítségével vizsgáltuk.

Klónozási folyamatok

Az egyedi HPV11 és HPV6 LCR szekvenciákat pALuc riporter vektorban klónoztuk, melyhez az LCR szekvenciákat a restrikciós endonukleáz hasítási helyeket is tartalmazó primerekkel amplifikáltuk. A referencia és az egyedi E2 szekvenciákat CMV promótert tartalmazó pCDNA3.1+ emlős expressziós vektortba klónoztuk a KpnI és az XbaI restrikciós hasítási helyekre.

Ezt követően a különböző klónozási folyamatok lépési megegyeztek. Az amplimereket gélből tisztítottuk, majd megfelelő restrikciós enzimekkel emésztettük. Az emésztést követően az inzerteket a riporter és az expressziós vektorba ligáltuk és a kész konstruktokat *Escherichia coli XL-1* baktériumtörzsbe transzformáltuk.

A klónokat ezután tisztítottuk, a tisztított plazmidokat restrikciós emésztéssel ellenőriztük, majd a megfelelő klónokból nagyobb mennyiséget tisztítottunk. Az így kapott variáns klónokat szekvenálással ellenőriztük (Macrogen, Amsterdam, Hollandia).

Írányított mutagenézis

Munkacsoportunk a HPV11 LCR szekvenciákban korábban azonosított nukleotid polimorfizmusokon kívül egyetlen új, egyedi nukleotid polimorfizmust detektált (9-es páciens szövetmintáiból kimutatott szekvenciában). A T7331G polimorfizmus hatását az LCR transzkripciót aktiváló hatására irányított mutagenézis segítségével vizsgáltuk. A mutagenizált LCR-t tartalmazó pALuc riportert tartalmazó plazmidot *Escherichia coli XL-1* baktériumtörzsbe transzformáltuk. A transzformálástól a transzfekcióig történő lépéseket előző fejezet tartalmazza. A kész konstruktot szekvenálással ellenőriztük (Macrogen, Amsterdam, Hollandia).

A hosszú szabályozó régió (LCR) transzkripciót szabályozó aktivitásának vizsgálata, valamint az E2 virális fehérjék hatásának vizsgálata az LCR aktivitására

Transzfekciós és ko-transzfekciós kísérleteket HEp-2 gégekarcinómából származó sejtvonalon végeztük. A HEp-2 sejteket 10% magzati borjú savót tartalmazó DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) médiumban tenyésztettük. A sejtek tranziens transzfekcióját Lipofectamine 2000 reagenssel végeztük. A transzfekciók során 2-2 µg, a referencia és az egyedi LCR-eket hordozó pALuc riporter vektort, a referencia és az egyedi E2 ORF-eket hordozó pCDNA 3.1+ emlős

expressziós vektort, valamint RSV- β -Gal plazmidot használtuk. A sejteket a transzfekciót követően 48 óra múlva lizáltuk. A luciferáz aktivitás mérése a Luciferase Assay System rendszerrel történt. A luciferáz teszt standardizálásához β -galaktozidáz tesztet használtunk, a teszt normalizálása protein koncentrációra történt, amelyet Bradford reagenssel határoztunk meg. Minden transzfekciós kísérletet legalább három független ismétlésben végeztünk.

Eredmények

Teljes genom szekvenciák elemzése és filogenetikai besorolásuk

A HPV6 teljes genom szekvenciák vizsgálatának eredményei

A szekvencia analízis során ugyanazon betegek (AO-RRP1/6, AO-RRP3/6, AO-RRP5/6, JO-RRP1/6 és a JO-RRP2/6) különböző recidívaiból kimutatott HPV6 szekvenciák identikusnak bizonyultak. A 13 teljes genom szekvencia közül három (AO-RRP2/6, AO-RRP3/6, AO-RRP4/6) a HPV6A (korábban HPV6b) klaszterbe, kilenc (JO-RRP1/6, JO-RRP2/6, AO-RRP1/6, AO-RRP5/6, AO-RRP6/6, AO-RRP7/6, CAC1/6, LSIL1/6, LP1/6) a B1 (korábban HPV6vc) alcsoportba, egy (ASCUS1/6) pedig a B2 alcsoportba sorolható a szekvencia analízis alapján.

A mintáink között B3 (HPV6a), B4 és B5 alcsoportba tartozó szekvenciát nem azonosítottunk. A HPV6A klaszter és a B1 alcsoport esetében az azonosított szekvenciák mérete megegyezett a referencia genomok méretével, ezzel szemben a B2 alcsoportba tartozó szekvenciában azonosítottunk egy 19 bázispár hosszúságú deléciót, amely további 19 génbanki, B2 alcsoportba tartozó genomban is megtalálható. Az fehérjét kódoló régiók közül az E2, E6 és E7 nagy állandóságot mutat, míg az E5a, L1 és L2 ORF-ek, valamint az LCR variabilitása jelentősen magasabb.

HPV6A vonal esetén a referencia és a konszenzus szekvencia 13 nukleotid pozícióban tért el egymástól, illetve egy 94 bp hosszúságú inzerció is jelen van a konszenzus szekvencia LCR-ében, ami viszont nem fordul elő sem a referencia szekvenciában, sem pedig a saját szekvenciáinkban. Ezzel szemben a B1 alvonal referencia és konszenzus szekvenciája csak egyetlen nukleotid pozícióban tér el egymástól. A B2 alvonal vizsgálata során hat nukleotid pozícióban azonosítottunk különbséget a referencia és a konszenzus szekvencia között.

A HPV6A filogenetikai vonalban 25 nukleotid mutációt azonosítottunk a referencia genomhoz való illesztést követően, az SNP-k az E1, E5a, E6, L1 és L2 ORF-ekben, az E5b és L2 ORF között elhelyezkedő nem kódoló régióban, valamint az LCR területén fordultak elő. Az ORF-ekben azonosított nukleotid eltérések közül azonban csak kettő okozott aminosavcserét, mindkettő egy páciens mintájának E5a régiójában lokalizálódik.

A HPV6B1 alvonalba tartozó szekvenciákban összesen 26, a B2 alvonalban pedig 8 nukleotidcserét azonosítottunk. A HPV6B1 alvonal esetében a fiatalkori papillomatózisból és *condyloma acuminatum*-ból kimutatott szekvenciák esetében magasabb volt a genom variabilitása, mint a felnőttkori papillomatózisokból származó szekvenciák esetében. A B1 alvonal esetében az E7 ORF-et kivéve minden ORF-ben és az LCR-ben is azonosítottunk nukleotid cseréket, valamint az A vonallal szemben több esetben találtunk aminosav eltérést. Az E2/E4 ORF esetében négy, L2 ORF-ben egy, míg az L1 ORF-nél három aminosavcserét detektáltunk. Az összes aminosav eltérés egyedi volt, kivéve az L1 fehérjében lévő Y219D-t (T6444G), amely minden általunk vizsgált HPV6B1 alvonalba tartozó szekvenciában megtalálható. Így, míg az A vonal esetében csak egyetlen szekvencia különbözött fehérje szinten is a referenciától, addig a B1 alvonal minden szekvenciájában legalább egy egyponthoz nukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphism, SNP) aminosav változást eredményezett a referencia genomhoz képest.

A B2 alvonalba sorolt egyetlen szekvencia az E1, E5a, L1 és L2 ORF-ek, valamint az LCR esetében különbözött a referencia genomtól, de csak egyetlen SNP okozott aminosav eltérést az L2 ORF területén.

A HPV11 teljes genom szekvenciák vizsgálatának eredményei

Az 5-ös beteg (JO-RRP5/11) új recidívájából kimutatott HPV11 szekvencia identikus a munkacsoport által korábban vizsgált szekvenciával. A 6-os páciens (JO-RRP6/11) esetében a 2015-ben és 2016-ban kialakult recidívákból, valamint egészséges nyálkahártya felszínéről származó exfoliatív sejt mintákból származó HPV11 szekvenciák szintén identikusnak bizonyultak a korábban vizsgált HPV11 szekvenciával. A JO-RRP8/11, illetve a JO-RRP9/11 esetében is több minta vizsgálatára volt lehetőségünk, az ezekben kimutatott HPV11 szekvenciák is identikusak voltak. A JO-RRP7/11 páciensről három lokalizációból (szupraglottis, szubglottis és sztóma) érkezett szövetszövetminta; mindhárom esetben sikerült HPV11 genom kimutatása, amelyek szekvenálási eredmény alapján szintén azonosnak bizonyultak. Azonosnak bizonyult a JO-RRP8/11-es, illetve a CAC/11-es mintákból származó HPV11 szekvencia is. A referencia genomban már korábban leírt két szekvenálási hiba jelen volt minden mintánkban.

Az újonnan vizsgálatba vont HPV11 pozitív páciensek (7-15. betegek) mintáiban kimutatott HPV11 teljes genomok szekvencia analízise során 19 új nukleotid cserét azonosítottunk, melyek közül 17 egyedinek bizonyult. A 19 SNP közül egy (T4380G) található az E5B és L2 ORF közötti nem kódoló régióban; valamint egyet (T7331G) azonosítottunk az LCR területén. A kódoló régiókban 17 SNP-t detektáltunk, melyek közül hét eredményezett aminosavcserét (E1, E2/E4, E5A és L2 ORF). Az AO-RRP1/11-es páciens mintájából származó genomban egy 58 bp hosszúságú deléciót azonosítottunk az E2/E4 ORF területén, amely kereteltolódást és korai stop kodon

kialakulását eredményezte. A csonka E2 fehérje 266 aminosav hosszúságú (referencia E2 fehérje 367 aminosav hosszú), csonka dimerizációs és DNS kötő doménnel rendelkezik, valamint a leolvasási kereteltolódás miatt több aminosavcsere is történt. A delécio érinti az E4 ORF-et is, ami a prolin-gazdag régió, valamint a komplett E1^E4 fúziós fehérje pozitív töltésű régiójának eltűnését eredményezi.

A CA/11-es páciens mintájából származó HPV11 genom a filogenetikai analízis alapján a referencia genommal egy klaszterbe tartozik (A1 alcsoport), míg a többi általunk vizsgált HPV11 genotípus az A2 alcsoportba sorolható. A JO-RRP6/11, valamint a JO-RRP7/11 a súlyosabb kórlefolyású esetekből azonosított genomokkal csoportosul az A2 alcsoporton belül.

Az E1 fehérje esetében három egyedi aminosavcsere azonosítottunk, melyből kettő a fehérje N-terminálisán található egyedi eltérés (A72E-JO-RRP4/11, valamint N100T-JO-RRP9/11). Ugyancsak egyedi mutáció az 1870. nukleotid pozícióban jelen lévő A-T csere eredményeként létrejövő I347F aminosavcsere a protein oligomerizációs doménjének területén a JO-RRP10/11 beteg mintájában. Az R318A eltérés minden klinikai mintából kimutatott HPV11 szekvenciában megtalálható; valószínűsíthető, hogy az alanin a vad típus, a referenciában található arginin pedig az agresszív JO-RRP-ből származó referencia genomban kialakult egyedi polimorfizmus. A hexamer struktúra fehérje modellezése alapján az arginin erősebb másodlagos kötést hoz létre a szomszédos monomer 322. pozícióban lévő triptofánjával, a 323. pozícióban lévő fenil-alaninnal, valamint a 327. helyen lévő izoleucinnal. Ezzel szemben az alanin semmilyen interakciót nem alakít ki szomszédos aminosavakkal.

Az E5a fehérjét kódoló régióban három aminosavcsere azonosítottunk, melyek közül kettőt már korábban leírt a munkacsoport (I28F és V41L) és a CA/11 szekvencia kivételével minden általunk vizsgált HPV11 genomban megtalálható. Az I28F a fehérje N-terminális transzmembrán régiójában lokalizálódik, míg a V41L feltételezhetően az első és második transzmembrán régió között található. Az AO-RRP2/11 betegből származó HPV11 szekvencia E5a ORF-ében azonosított D39N egyedi polimorfizmust szintén a fehérje első két transzmembrán régiója között lokalizálódik.

Az E6 ORF-ben aminosavcsere azonosítottunk, melyet nem azonosítottunk. Az E7 ORF régióban egyetlen aminosavcsere azonosítottunk (A45S) detektáltunk, amely a CA/11 mintából származó HPV11 szekvencia kivételével minden HPV11 genomban megtalálható. Ez a fehérje C-terminális részén található, közel az N-terminus második konzervált régiójához (CR2-höz). Az E5a ORF-ben, illetve az E7 ORF-ben azonosított aminosav eltéréseket ismert kristályszerkezet hiánya miatt nem tudtuk modellezni.

Az L1 ORF-ben új, aminosavcserét eredményező nukleotidcserét nem azonosítottunk, de három, aminosavcserét nem eredményezőt igen, melyek közül a C6028T minden általunk vizsgálat korábbi és új HPV11 szekvenciában megtalálható (kivéve CA/11). A 6484-es pozícióban három mintában azonosítottunk nukleotid polimorfizmust, két szekvenciában (JO-RRP8/11 és CAC/11) ebben a pozícióban a timin citozinra cserélődik, egy esetben pedig a timin helyett guanin található a genomban (AO-RRP1/11). Az utolsó aminosavcserét nem eredményező nukleotid mutáció a C6607T, melyet a JO-RRP7/11 beteg mintájából mutattuk ki. Munkacsoportunk korábban leírt két aminosavcserét eredményező mutációt a fő kapszidproteint kódoló L1 ORF-ben (A476V, S486F); az eltéréseket egyetlen beteg szövetmintáiból tudtuk kimutatni. Jelen tanulmányunkban lehetőségünk volt az ettől a betegtől származó, orális mukózáról gyűjtött exfoliált sejt minták HPV tartalmának vizsgálatára is. A mintákban azonosított HPV11 szekvenciában - a papillóma szövetből származó szekvenciával szemben - ez a két, aminosavcserét eredményező nukleotid mutáció hiányzik L1 ORF-ből.

L2 ORF-ben azonosított aminosavcsere (E35D) a fehérje N-terminális régiójában elhelyezkedő aktin-kötő doménben lokalizálódik és csak a CA/11 mintában található. A kizárólag az AO-RRP2/11 beteg mintájában kimutatott SNP (G5437T) a fehérje L1 kötőhelyet is tartalmazó C-terminális régiójában korai stop kodon kialakulását és így csonka fehérje szintézisét eredményezi (L1 kötő domén HPV11 L2 fehérjében 396 és 439 aminosavak között található).

A hosszú szabályozó régió (LCR) funkcionális vizsgálata

A HPV6 LCR funkcionális vizsgálatának eredményei

Az A klaszterbe (korábban HPV6b és rokon genomok) tartozó HPV6 szekvenciák LCR-ében a referencia genom LCR-éhez képest hat SNP-t azonosítottunk, amelyek a G7815C kivételével mindhárom genomban megtalálhatóak. Ezek az SNP-k befolyásolhatják a lehetséges transzkripció faktor kötőhelyek jelenlétét. Az LCR-ek funkcionális vizsgálata során a három LCR transzkripciót aktiváló hatása szignifikánsan nem tért el sem egymástól, sem pedig a referencia LCR aktivitásától.

A B1 alcsoportba (korábban HPV6vc és rokon genomok) tartozó kilenc HPV6 LCR szekvenciája közül hét szekvencia megegyezett a referencia genom LCR-ének szekvenciájával, további két szekvenciában pedig három nukleotid cserét azonosítottunk. Ezek az eltérések nem befolyásolják a potenciális transzkripció faktor kötőhelyeket. Mivel a referencia HPV6B1 plazmid nem állt rendelkezésünkre, a variánsok LCR aktivitásának összehasonlításához szükséges referencia LCR aktivitást az alábbiak szerint határoztuk meg. Mértük három, a referencia LCR szekvenciával azonos, HPV6B1 csoportba tartozó HPV6 genom (AO-RRP1/6, AO-RRP5/6, AO-RRP7/6) LCR aktivitását; ezek nem különböztek egymástól szignifikánsan és a referencia LCR aktivitást ezen

aktivitások három ismétlésben mért átlagaként definiáltuk. A két egyedi LCR közül a JO-RRP2/6 aktivitása a referencia aktivitáshoz hasonló volt, ezzel szemben a CAC1/6 LCR-e szignifikánsan magasabb transzkripciós aktiváló hatást mutatott, mint a referencia LCR.

A B2 alcsoportba tartozó egyetlen HPV6 szekvencia tartalmaz egy 19 bp hosszúságú deléciót, valamint további két nukleotid mutációt. A deléció következtében négy lehetséges transzkripciós faktor kötőhely tűnik el. A B2 alcsoportba tartozó referencia genom szintén nem állt rendelkezésünkre, így az ide tartozó genomunk LCR aktivitását a B1 alcsoportba tartozó LCR-ek aktivitásához hasonlítottuk; az LCR aktivitása csak a *condyloma acuminatum*-ból származó minta LCR aktivitásától tért el szignifikánsan.

Összehasonlítva a HPV6 intratípusos variánsok LCR aktivitását, az A klaszterbe tartozó LCR-ek szignifikánsan nagyobb aktivitást mutattak a B1 és B2 alcsoportba tartozó LCR-ekhez képest, mind az egyes szekvencia variánsokat, mind pedig a klaszterátlagokat összehasonlítva.

A HPV11 LCR funkcionális vizsgálatának eredményei

A HPV11 referencia plazmid újbóli szekvenálásával megerősítettük a génbankban található HPV11 referencia genomtól (GC inzerció 7719 és 7720 pozíciókban) való eltérését, melyet szekvenálási hibaként azonosítottunk és az összes LCR szekvenciánkban megtalálható. Az újonnan vizsgálatba vont mintáink esetében csak egyetlen új nukleotid polimorfizmust azonosítottunk, a JO-RRP9/11 betegtől származó HPV11 genom LCR-ében (T7331G). Irányított mutagenézissel megvizsgálva a polimorfizmus LCR aktivitásra gyakorolt hatását, megállapítottuk, hogy az SNP nem befolyásolja szignifikánsan a szabályozó régió transzkripciós aktiváló hatását.

A 15 általunk vizsgált HPV11 szekvencia LCR-ében azonosított nukleotidcserék alapján, az LCR aktivitások könnyebb összevethetősége céljából mintázatok határoztunk meg. Az egyes LCR mintázat (M1) hét szekvencia LCR-ében fordul elő, melyek között öt közepes súlyosságú JO-RRP-ből és AO-RRP-ből, egy súlyos JO-RRP-ből, egy pedig CAC mintából származott. A második LCR mintázat (M2) két szoliter gégepapillomából (JO-RRP3/11 és JO-RRP5/11) származó szekvenciában fordult elő. A harmadik LCR mintázat (M3) egy közepes súlyosságú (JO-RRP1/11) és a jelen tanulmányban bemutatott súlyos kórlefolyású JO-RRP7/11 mintából származó szekvenciában van jelen. A négyes, ötös és hatos LCR mintázatok (M4, M5 és M6) egyedi LCR szekvenciákat foglalnak magukba. Az M3 és M6 között egyetlen különbség a JO-RRP9/11 szekvenciában azonosított, az LCR aktivitást szignifikánsan nem befolyásoló T7331G nukleotid mutáció. A CA/11 szekvencia LCR-e identikus a referencia szekvencia LCR-ével, így ezt az LCR szekvenciát a referencia mintázathoz (Ref) soroltuk.

Az LCR aktivitási vizsgálatok során legmagasabb luciferáz aktivitást a referencia plazmid és a CA/11 identikus LCR-ek esetében mértük (referencia mintázat). A többi LCR, a JO-RRP6/11 (M5)

mintából származó LCR aktivitásának kivételével, szignifikánsan alacsonyabb luciferáz aktivitást mutatott a referenciához képest.

A legkisebb aktivitást a szoliter papillomákból származó (JO-RRP3/11 és JO-RRP5/11) M2 mintázatú LCR-ek mutatták; aktivitásuk szignifikánsan alacsonyabb, mint az M1 és M3-M6 LCR mintázatoké.

HPV11 E2 korai vírusfehérjék modellezése és az E2 protein variánsok funkcionális vizsgálata

Az E2/E4 ORF-ben 12 nukleotidcserét azonosítottunk, melyek közül kettő csak az E2 ORF-ben, kettő az E2/E4 ORF régióban is, további három pedig csak az E4 ORF-ben okoz aminosavcserét.

Az egyedi Q86K aminosav cserét a JO-RRP4/11 páciens mintájából kimutatott HPV11 szekvenciában azonosította korábban a munkacsoportunk, mely a fehérje transzaktivációs (E1-kötő) doménjében (TAD) található és az E2 protein felszíni töltésének változását okozza. A Q86 kötődik a szomszédos E2 monomer lánc K45 aminosavához, míg a K86 a fehérje felszínén helyezkedik el. A kötési energia különbözik a két TAD monomer esetében; a referencia E2 esetében kissé alacsonyabb, mint a mutáns E2-nél. A referencia E2 (Q86) esetében a fehérje felszíni töltése negatívabb, ezzel szemben a variáns K86 E2 felszíne a lizin jelenléte következtében pozitívabbá válik.

A JO-RRP9/11 mintából kimutatott HPV11 genomban két egyedi E2 eltérést azonosítottunk (S245F és N247T). Mindkettő a hinge-régióban található, mely részt vesz a HPV genom nukleáris transzportjának szabályozásában, azonban úgy tűnik, hogy nem befolyásolják közvetlenül ezt a folyamatot és nem változtatják meg a régió felszíni elektrosztatikus potenciálját sem. A foszforilációs hely predikció alapján valószínűsíthető, hogy a S245F csere következtében eltűnik egy foszforilációs hely a protein kináz A és B targetjének számító egyik RXXS motívumban. Ezzel szemben az N247T feltehetően létrehoz egy foszforilációs helyet, bár a predikció alapján ez gyenge affinitású foszforilációs targetnek tűnik.

Az E2 fehérje DNS-kötő és dimerizációért felelős doménjében (DBD) lokalizálódó K308R polimorfizmus a vizsgált szekvenciák jelentős részében megtalálható. A K308R polimorfizmus nem változtatja meg közvetlenül a DBD DNS-kötését; a referencia E2 (K308) illetve az R308 E2 fehérjék fehérje-DNS kötési energiája megegyezik. A fehérje dimerizációját azonban jelentősen megváltoztatja a K308 polimorfizmus. A referencia fehérje K308-t tartalmazó oldallánca hidrogén kötésekkel keresztül kapcsolódik a DNS-kötő hélix stabilizáló fehérje láncának F311 és E312 aminosavjaihoz. Az R308 esetében, a terjedelmesebb arginin a dimer másik fehérje oldalláncával áll szemben, az S322-höz kötődik. Az így létrejött hidrogén kötések jelentősen megemelik a teljes kötési energiát a két E2 monomer között.

Az 58 bp hosszúságú deléció (AO-RRP1/11) jelentős leolvasási kereteltolódást (referencia E2-ben **NCLKCFRYRLN**, deléciós mutánsban **VSSTVREV**) okoz a fehérje C-terminális régiójában, megzavarva a stabilizáló béta szál funkcióját, illetve megváltoztatva a DNS-kötő motívumot. Továbbá a deléció pozitív töltésű fehérjék kiesését eredményezi, melynek következtében a fehérje felszíne kissé negatívvá válik. Összességében ez a két változás a fehérje DNS-kötő képességének elvesztéséhez vezethet.

E2/E4 ORF-ben azonosított aminosavcserét eredményező nukleotid eltérések közül öt az E1^{E4} fúziós fehérjét is érinti. A Q46R (Q28R az E1^{E4} fúziós fehérjében) aminosavcsere megtalálható a JO-RRP1/11, JO-RRP2/11, JO-RRP3/11, JO-RRP5/11, JO-RRP7/11, JO-RRP8/11, AO-RRP2/11, AO-RRP3/11 és CAC mintákból kimutatott HPV11 szekvenciákban és a fehérje prolin gazdag régióját érinti. A G61E (G43E a fúziós fehérjében) és az S78L (S60L a fúziós fehérjében) polimorfizmusokat csak a CA/11, JO-RRP6/11, illetve az AO-RRP1/11 esetében detektáltuk és a fehérje loop és negatív töltésű prolin-gazdag régiójában lokalizálódnak. A P68S és T70P (P50S és T52P a fúziós fehérjében) aminosavcsereket csak a JO-RRP9/11-es mintában azonosítottuk és a fehérje negatív töltésű prolin gazdag régióját érintik.

Az 58 bp hosszúságú deléció (AO-RRP1/11) aminosav-vesztést okoz az E1^{E4} fúziós fehérjében a 25. és 43. aminosavak közötti régióban, amely befolyásolja a fehérje prolin-gazdag, pozitív töltésű régióját, illetve az N-terminális loop régióját, ami valószínűleg a prolin-gazdag, illetve a negatív töltésű prolin-gazdag régiók közötti kölcsönhatás által kialakított E4 folding elvesztéséhez vezet.

Az E2 fehérje és az LCR kölcsönhatását vizsgáló kotranszfekciós kísérletek elvégzése előtt az E2 fehérjék esetében is variáns csoportokat határoztunk meg a vizsgált HPV11 szekvenciák körében. Az öt variáns csoport az alábbiak szerint alakul: (i) a referencia variánst a referencia szekvencia, a CA/11 és a JO-RRR6/11 alkotja; (ii) az 1. variánshoz (V1) tartoznak azok a minták, amelyekben kizárólag csak a K308R aminosavcsere található: JO-RRP1/11, JO-RRP2/11, JO-RRP3/11, JO-RRP5/11, JO-RRP7/11, JO-RRP8/11, JO-RRP10/11, AO-RRP2/11, AO-RRP3/11, CAC/11; (iii) 2. variáns (V2) a csonka E2 fehérje, mely az 58 bp deléciót tartalmazza (AO-RRP1/11); (iv) a 3. variáns (V3) csoportba a Q86K és K308R aminosav cseréket tartalmazó szekvencia került (JO-RRP4/11); (v) a 4. variáns (V4) pedig a S245F, N247T és K308R SNP-ket tartalmazó HPV11 szekvencia (JO-RRP9/11).

A kotranszfekciós kísérletekben az LCR mintázatok és az E2 variánsok három kombinációját vizsgáltunk; (i) a referencia LCR és az egyes variáns E2 fehérjék közötti kölcsönhatást, (ii) a referencia E2 hatását az eltérő mintázatú LCR-ek aktivitására, és végül (iii) az egyedi LCR mintázatok és a hozzájuk tartozó egyedi variáns E2 fehérjék kapcsolatát.

A referencia LCR és a variáns E2-k kölcsönhatását vizsgálva a referencia E2, valamint a 3. és 4. E2 variánsok (V3, V4) szignifikánsan emelték a referencia LCR luciferáz aktivitását. Az 1. E2 variáns (V1) detektálható, de statisztikailag nem szignifikáns növekedést okozott, míg a csonka E2 (V2) nem változtatta meg az LCR alap aktivitását. A variánsokat összehasonlítva, a legnagyobb mértékben a referencia E2 emelte a referencia LCR aktivitását ($p=0,002-0,003$), ezt követte a V3 és V4, végezetül a V1.

A referencia E2 variáns minden LCR mintázat esetében fokozta a luciferáz aktivitást. Az M1 és M2 esetében statisztikailag nem szignifikáns mértékű volt az emelkedés, azonban az referencia LCR, M3, M4, M5 és M6 LCR mintázat esetében szignifikánsan megnövelte az LCR luciferáz aktivitását az alap aktivitáshoz képest. A referencia LCR aktivitáshoz viszonyítva azonban egyik mintázatnál sem volt statisztikailag szignifikáns eltérés.

A polimorfizmusokat tartalmazó eltérő mintázatú LCR-ek és hozzájuk tartozó variáns E2 fehérjék kombinációjának vizsgálta során, azon E2 variánsok (referencia variáns, V3 és V4), melyek a referencia LCR aktivitását is növelték, a saját LCR-ük luciferáz aktivitása esetében is hasonló hatást mutattak. Ahogy az várható volt, a csonka E2 (V2) nem befolyásolta a saját LCR aktivitását sem. Azonban a V1 E2, amely a leggyakoribb variáns az általunk vizsgált szekvenciák között, másképp viselkedett az eltérő LCR-ekkel. Az alacsonyabb LCR aktivitással rendelkező M1 és M2 mintázatú LCR-ek aktivitását a V1 mintázatú E2 megnövelte, azonban statisztikailag ez nem volt szignifikánsan magasabb, mint a referencia LCR alap aktivitása. Amikor erősebb LCR aktivitással rendelkező LCR mintázattal (M3) kombináltuk a V1 variáns E2-t, akkor az szignifikánsan magasabb aktivitást eredményezett, mint a referencia LCR alap aktivitása, azonban még így is szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult, mint a referencia E2 által kiváltott referencia LCR aktivitás emelkedése.

Megbeszélés

Bár az alacsony onkogén kockázatú HPV-ok által okozott megbetegedések rendszerint enyhe tünetekkel járnak, néhány esetben az életminőséget jelentősen rontó kórlefolyás, vagy akár életet veszélyeztető állapot is kialakulhat a fertőzés következtében. Míg a magas onkogén kockázatú HPV genotípusok esetében az intratípusos variancia és a kórlefolyásban megmutatkozó különbségek egyre inkább ismertté válnak, addig az alacsony onkogén kockázatú genotípusok esetében a betegségek lefolyása közötti különbségek magyarázatául szolgáló virulencia mechanizmusok nagyrészt ismeretlenek. Munkacsoportunk korábbi, HPV11-re vonatkozó vizsgálatait azt mutatták, hogy az LCR-ben előforduló nukleotid polimorfizmusok hatással lehetnek a regulátor régió transzkripciót szabályozó hatására, így előfordulásuk összefüggésben lehet az adott variáns által okozott betegség súlyosságával.

A HPV6 teljes genom szekvenciáink filogenetikai analízise során kapott eredményeink - hasonlóan Jelen és munkatársai (2014) európai szekvenciák elemzése során kapott eredményeihez – a B1 filogenetikai csoport (korábban HPV6vc) dominanciáját és a B3 alvonal (korábban HPV6a) szignifikánsan alacsonyabb előfordulási gyakoriságát mutatják. Egy dél-amerikai tanulmány esetében szintén a B1 alvonal halmozott előfordulását írták le, a második leggyakoribb alvonalnak pedig a B3 bizonyult; ezen eredmények szintén összhangban vannak Jelen és munkacsoportja által kapott, Dél-Amerikára vonatkozó megoszlási adatokkal. További hasonlóság eredményeink és a dél-amerikai eredmények esetében, hogy a kimutatott HPV6 szekvenciák jelentős része felnőttkori papillomatózisból származott. Egy japán tanulmányban a leggyakoribb filogenetikai csoportnak szintén a B1 alvonal bizonyult. A jelen tanulmány esetében az alacsony esetszám miatt nem állapítható meg a filogenetikai csoportok előfordulása és a nemek közötti összefüggés, de felnőttkori papillomatózisok esetében megfigyelhető a férfi dominancia.

Vizsgálataink során az egy betegtől származó, egymást követő recidívákból kimutatott HPV6 szekvenciák egymással identikusnak bizonyultak, ami a genomok stabilitását mutatja; ezt a jelenséget korábbi tanulmányok is leírtak. Az alacsony variabilitás az egy páciensről származó genomok szekvenciájában a HPV11 esetében is megfigyelhető, azonban a HPV16 esetében az ellenkezőjéről számoltak be kutatócsoportok. Így azt mondhatjuk, hogy az alacsony onkogén kockázatú genotípusok esetében stabil vírusgenom, míg a magas onkogén kockázatú genotípusokra a gazdaszervezeten belüli variabilitás is jellemző. A genom stabilitása alátámasztja azt a felvetést is, hogy a tünetek újbóli megjelenése nem új fertőzéshez, hanem a vírus reaktivációjához társítható.

Jelentős genomi átrendeződés ritkán történik az alacsony onkogén kockázatú genotípusok esetében, ezek azonban általában valamilyen kedvezőtlen változást, pl. malignus transzformációt okozhatnak, vagy hatásukra nagyobb számú recidíva alakulhat ki. A magas onkogén kockázatú genotípusok, mint például a HPV16 esetében, főként az E6 onkoproteinben előforduló pontmutációk lehetnek felelősek a daganatok progressziójáért. Ezzel szemben tanulmányunkban a HPV6 E6 ORF esetében aminosavcserét eredményező nukleotid polimorfizmusokat nem detektáltunk, hasonlóan a munkacsoportunk által már vizsgált HPV11 genotípushoz.

Mindez arra enged következtetni, hogy az alacsony onkogén kockázatú HPV genotípusok esetében az E6 onkoproteint kódoló ORF konzervatívabb, mint a magas onkogén kockázatú genotípusok esetében. Ezzel szemben az E7 onkoprotein konzervált jellege a két csoport közös tulajdonsága.

Eredményeink alapján a HPV6 genotípus több korai, illetve a késői ORF-je variábilisabbnak bizonyult, viszont az egyes (al)vonalak között jelentős különbség van az ORF-ek és az LCR variabilitásában. A HPV6A filogenetikai vonalba tartozó általunk vizsgált genomokban azonosított

nukleotid polimorfizmusok több mint fele (15/25) megtalálható mindhárom vizsgált genomban, a szekvenciák nagyfokú hasonlóságot mutattak. A HPV11 referencia szekvenciához hasonlóan, a HPV6A referencia és a génbanki szekvenciák alapján meghatározott konszenzus szekvencia összehasonlítása alapján felvetődött, hogy a HPV6A filogenetikai vonal referencia genomjaként megjelölt szekvencia egy egyedi variáns, és nem ez reprezentálja a HPV6A leggyakrabban előforduló, úgynevezett vad típusát. Ezzel szemben a B1 alcsoportba tartozó szekvenciák igen diverzeknek bizonyultak, valamint a dendrogramon különböző távolságban helyezkednek el a konszenzus szekvenciával nagy hasonlóságot mutató, referencia szekvenciához képest. A legtöbb nukleotid mutáció – elsősorban az aminosavcserét is eredményező - egyediek a B1 alcsoportban található HPV6 szekvenciák esetében. Ezen egyedi mutációkat tartalmazó szekvenciák enyhe vagy közepes súlyosságú (5-8 recidíva) RRP-ből vagy *condyloma acuminatum*-ból származnak. Két, egyetlen recidívát mutató felnőttkori papilloma (AO-RRP6/6 és AO-RRP7/6) esetében egyetlen egyedi nukleotid mutációt azonosítottunk az L1 ORF-ben.

Egyetlen HPV6A vonalba tartozó szekvencia (AO-RRP4/6) esetében azonosítottunk aminosavcserét eredményező nukleotid mutációt az E5a ORF-ben. Az E35D a fehérje hurok régiójában, feltételezhetően az első és második transzmembrán domén között, a fehérje extracelluláris részén lokalizálódik, míg a másik eltérés (P78S) feltételezhetően egy új foszforilációs helyet hoz létre a fehérje harmadik transzmembrán doménjében. Az extracellulárisan elhelyezkedő E35D befolyásolhatja a növekedési faktorok kötődését, így hozzájárulhatott a felnőttkori RRP esetében a mérsékelt diszplázia kialakulásához.

A HPV6 genomok a legnagyobb diverzitást az E2/E4, L1 és L2 ORF esetében mutatták. Ezek a nukleotid mutációk hatással lehetnek a fehérjék funkciójára, így módosíthatják az egyes vírusok működését, ami pedig magyarázatot adhat arra, hogy egyes páciensek esetében miért magasabb a recidívák száma; ez a megfigyelés összhangban áll a munkacsoport korábbi, HPV11 genotípus vizsgálata során kapott eredményeivel.

A HPV6B1 alvonal esetében az E2/E4, L1 és L2 régió fehérje szinten is jelentős variabilitást mutat. Az E2/E4 ORF-ben azonosított aminosavcserék közül kettő az E2 fehérje transzaktivációs doménjében helyezkedik el (T116N az AO-RRP1/6-ban és S144T a JO-RRP2/6-ban). Egy aminosav eltérés az E2 hinge-régiójában található (S246A a JO-RRP1/6-ban), mely következtében feltételezhető egy potenciális foszforilációs hely elvesztése a fehérje foszforiláció szempontjából jelentős régiójában. A negyedik aminosavcsere (E340D az AO-RRP5/6-ban) a fehérje DNS-kötő és dimerizációs doménjében lokalizálódik. Ezek a polimorfizmusok helyzetükből adódóan befolyásolhatják az E1 fehérje kötődését, illetve a DNS replikáció iniciálásának folyamatát, ezáltal a transzkripció aktivitást, intracelluláris lokalizációt, kromatin kötődést és önszabályozást, vagy az L1

kötődését, illetve az E2 LCR-hez való kötődésén keresztül az onkoproteinek expresszióját. A 3459-es nukleotid pozíciót érintő timin-guanin csere nemcsak az E2 proteinben (S246A), hanem az E1^{E4} fúziós fehérjében (S50R, közvetlen transzláció esetén S68R az E4 fehérjében) is megjelenik, és az E4 fehérje negatív töltésű prolin-gazdag régiójában lokalizálódik.

Az L1 fehérjében azonosított egyedi mutációk (F441L a CAC1/6-ban és K449E a JO-RRP1/6-ban) a fehérje C-terminális régiójában találhatóak, ami az L1 kapszomerek összekapcsolódásában vesz részt, valamint magába foglalja a kapszid összeépüléséért és az enkapszidációért felelős régiót, ezen kívül hatással lehet a virionok heparán-szulfát proteoglikánhoz (HSPG) való kapcsolódásban is. Kutatócsoportok kimutatták, hogy HPV16 esetében a 449. pozícióban lévő lizin (K449) részt vesz a HSPG-hez történő kapcsolódásban, így a lizin oldallánc cseréje (K449E) ronthatja ezt a kapcsolódást.

A bemutatott HPV6 szekvenciákban azonosított mutációk és polimorfizmusok – az érintett fehérjék funkcióinak feltételezett módosítása alapján – hatással lehetnek a virális transzkripció és/vagy replikáció szabályozására (E2), a HPV sejtől való kiszabadulására (E4), a kapszid összeépülésére és a genom enkapszidációjára (L1, L2), valamint befolyásolhatják a vírus és a gazdaszervezet kölcsönhatását is (E5a, L1, L2), ezáltal hatással lehetnek az általuk okozott megbetegedések kórlefolyására, így akár prognosztikai jelentőséggel bírhatnak.

A HPV6 LCR esetében az ORF-ekhez hasonló variabilitást lehetett megfigyelni. Míg a HPV6B1 (korábban HPB6vc) alcsoportban összesen két szekvenciában, mindössze három mutációt azonosítottunk, addig az A filogenetikai vonalba (korábban HPV6b) tartozó három szekvenciában az azonosított nukleotid polimorfizmusok - egy kivételével (G7815C) - minden esetben megtalálhatóak voltak. Ezzel összhangban, az A filogenetikai vonalba tartozó LCR szekvenciák transzaktiváló potenciálja nagyon hasonló volt, nem térnek el szignifikánsan sem egymástól, sem pedig a referencia LCR transzkripció aktiváló hatásától. A B1 alvonal esetében a hat recidívával manifesztálódó *condylomá*-ból származó (CAC1/6), a referenciától két nukleotidban eltérő (A7342G, T7909G) LCR szignifikánsan magasabb aktivitást mutatott, mint a többi HPV6B1 alvonalba tartozó LCR. A HPV6 LCR variabilitását vizsgálva Measso do Bonfim munkacsoportjának (2015) öt variánst sikerült azonosítaniuk. Az egyetlen B3 variáns esetében a referencia HPV6B3 LCR aktivitásától szignifikánsan magasabb transzaktiváló hatást mértek. A B1 alvonal esetében a referencia LCR és két B1 variáns aktivitása közel azonos volt, míg egy variáns esetében szignifikánsan alacsonyabb értéket detektáltak. Az általunk kapott LCR aktivitási mintázat tükrözi Measso do Bonfim és munkatársai (2015) által is leírt kapcsolatot az LCR szekvenciabeli különbségei és transzaktivációs potenciál között. Emellett kimutatták, hogy a részben duplikálódott LCR-rel rendelkező HPV6 és HPV11 variánsok jelentősen magasabb transzkripció aktiváló hatással rendelkeznek, amely

hozzájárulhat az általuk okozott megbetegedések súlyosabb kórlefolrásához. Ezzel szemben Grassmann és munkatársai (1996) nem találtak különbséget az LCR aktivitásában a szekvencia variánsok között. A JO-RRP2/6 LCR-ében azonosított egyetlen mutáció (A7332C) nem befolyásolta szignifikánsan a szabályozó régió aktivitását, ennek a variánsnak az aktivitása nem mutatott jelentős különbséget a referencia LCR aktivitáshoz képest.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy hasonlóan a HPV11 variánsokhoz, a HPV6 variánsok esetében kimutatott egyes polimorfizmusok szintén befolyásolhatják az LCR aktivitását, azonban vannak olyan nukleotid eltérések is, amelyek nincsenek hatással a regulátor szakasz transzaktivációs potenciáljára.

Measso do Bonfim és munkatársai (2015) az egy filogenetikai vonalba tartozó LCR-ek aktivitásbeli különbségei mellett megfigyelték, hogy jelentős különbség mutatkozik a HPV6 filogenetikai csoportjainak LCR aktivitásában is. Saját szekvenciáink esetében az HPV6A (HPV6b) vonalra jellemző LCR szignifikánsan magasabb aktivitást mutatott, mint a HPV6B1 és B2 alvonalakba tartozó LCR-ek, kivéve a B1 alcsoportba sorolható CAC1/6 mintából származó LCR-t, melynek aktivitása megközelítette a HPV6A csoportban mért LCR aktivitásokat.

Mindezek alapján elmondható, hogy a különböző HPV6 variánsok LCR aktivitása gradiens-szerűen sorba állítható; legmagasabb a HPV6A vonal transzkripciót aktiváló képessége, melyet a B1 és végül a B3 filogenetikai alcsoport LCR aktivitása követ.

Ezek együttesen arra utalnak, hogy különbség van az egyes HPV6 (al)csoportok (HPV6A, valamint a HPV6B1 és B2) sejtprolifrációt moduláló hatása között. Úgy tűnik, hogy szemben a B1 alcsoporttal, a HPV6A filogenetikai vonal esetében inkább az LCR transzkripciót aktiváló hatása érvényesül; az LCR szabályozó hatásának nagyobb szerepét támaszthatja alá a transzkripció faktor köthelyek nagyobb variabilitása az A vonalban, szemben a B1 alcsoport LCR-ével. Hasonló különbségek körvonalazódtak a HPV11 filogenetikai csoportjai esetében is.

A HPV6B1 alvonal szintén mutat néhány hasonlóságot a HPV11 genotípussal, melynek előfordulása szignifikánsan gyakoribb a súlyosabb lefolyású, elsősorban juvenilis RRP-kben. Míg a HPV6A vonalba tartozó szekvenciák kivétel nélkül AO-RRP-ből származtak, addig a JO-RRP-kből azonosított szekvenciák a B1 alvonalhoz sorolhatóak. Hasonlóan a HPV11-hez a HPV6B1 genomokban több egyedi nukleotid mutáció fordult elő az E2/E4, L1 és L2 ORF-ek területén. Egy genom esetében egy olyan egyedi LCR-t azonosítottunk, amely magasabb aktivitással rendelkezik, mint a referencia LCR. Ugyanakkor amiatt, hogy eredményeink egyelőre csak kis méretű betegcsoporton végzett vizsgálatokból származnak, a különböző HPV6 variánsok által okozott kórképek esetében a betegség lefolyásában/súlyosságában mutató különbségek kevésbé szembetűnők, mint a HPV11-asszociált megbetegedések esetében.

A HPV11 szekvenciák filogenetikai vizsgálataink eredményei összhangban vannak munkacsoportunk korábbi eredményeivel, illetve az irodalomban fellelhető kutatási eredményekkel. Munkacsoportunk korábbi HPV11 szekvenciái és a jelen tanulmányban bemutatott HPV11 szekvenciák is az A2 filogenetikai alvonalba tartoznak. Sichero és munkatársai (2021) HPV11 szekvenciák földrajzi elterjedését vizsgálva megállapították, hogy Dél-Amerikában is az A2 alvonál dominanciája figyelhető meg. Az általuk és általunk kapott filogenetikai eredmények összhangban vannak Jelen és munkatársai 2016-os vizsgálati eredményeivel, miszerint földrészenként és globálisan is az A2 alvonál dominanciája a jellemző.

A HPV11 szekvenciák fiatalkori, illetve felnőttkori papillomatózisban történő eloszlását tekintve a vizsgált szekvenciáink jórészt juvenilis papillomatózisból származnak. A dél-amerikai tanulmány esetében szintén ez a tendencia volt megfigyelhető.

Az újonnan vizsgálatba vont HPV11 genomok LCR-ében megtalálhatóak voltak már korábban leírt mutációk; az új szekvenciák LCR-ében egyetlen új nukleotid eltérést azonosítottunk (T7331G, JO-RRP/11-ben), amely azonban nem befolyásolta az LCR transzaktiváló hatását a referencia aktivitáshoz képest. Hasonlóképpen, számos, a korábbi vizsgálataink során azonosított, aminosavcserét nem eredményező nukleotid polimorfizmust azonosítottunk a kódoló régiókban, melyek közül több további génbankban található HPV11 genomokban is előfordul. Ezek mellett még új, aminosavcserét eredményező egyedi mutációkat is detektáltunk az új HPV11 szekvenciákban, melyek hatással lehetnek a vírus fiziológiára.

Jó példa erre az AO-RRP1/11 HPV11 szekvencia E2 ORF-ében azonosított 58 bp hosszúságú deléción, mely leolvasási kereteltolódást, korai stop kodon kialakulását és így csonka E2 fehérje képződését eredményezi. A funkcionális vizsgálatok során igazolódott, hogy a csonka E2 fehérje nem képes az LCR aktivitásának fokozására. A transzaktiváló potenciálja hasonló volt, mint az 1. mintázatú LCR (két attenuátor hatású polimorfizmust tartalmaz) és 2. E2 variáns (leggyakoribb E2 variáns, K308R cserét tartalmazza) kölcsönhatása esetén mért aktivitás. Ezen páciens esetén a diszplázia kialakulásának hátterében az állhat, hogy a csonka E2 fehérje nem képes az onkoproteinek expressziójának szabályozására. A deléción hátterében állhat a HPV11 gazdasejt genomjába történő integrációja. Korábban két munkacsoport is kimutatta HPV11-asszociált rákos elváltozásokban a vírus DNS gazdasejt genomba történő integrációját, de vizsgálataik nem terjedtek ki az integráció E2 fehérjére gyakorolt hatásának elemzésére. A magas onkogén kockázatú HPV genotípusok esetében ismert, hogy a karcinogenezis folyamata során megtörténhet a vírus DNS gazdasejt genomba történő beépülése, amely során a HPV genom az E1-E2 ORF területén nyílik fel. A genom felnyílása a fehérje szintézisének zavarát eredményezi, amely a regulátor funkció kieséséhez vezet.

Az egyedi Q86K aminosavcsere (JO-RRP4/11) az E2 fehérje transzaktiváló doménjének felületi töltésében okoz változást, valamint kis mértékben segíti a fehérje dimerizációját. Az E2 fehérje dimerként aktív, így a könnyebb dimerizáció hozzájárulhat a kissé emelkedett LCR aktivitáshoz; erre utalhat, hogy ezt az aminosavcserét nem hordozó E2 variáns nem rendelkezik ilyen hatással. Mivel azonban az E2 variánshoz tartozó LCR mintázat (alap)aktivitása alacsonyabb, ez kompenzálja az E2 nagyobb aktivitását, amelynek eredményképpen egy közepes súlyosságú papillomatózis alakulhatott ki.

Az S245F és N247T aminosavcserek az E2 fehérje foszforilációs mintázatát változtathatják meg a hinge-régióban. A foszforilációs helyek elvesztése vagy újak létrejötte módosíthatja az E2 fehérje aktivitását és funkcióját, valamint a foszforilációs mintázatok befolyásolhatják a celluláris proteinek és az E2 fehérje közötti kölcsönhatásokat. Az E2 fehérje foszforilációjában számos protein kináz vesz részt; az S245F aminosavcsere következtében megszűnhet egy magas affinitású protein kináz A/B target foszforilációs hely, míg az N247T csere egy potenciális új foszforilációs helyet hozhat létre glikogén-szintáz kináz számára. A HPV11 genomban azonosított S245 foszforilációs helynek megfelelő, HPV8 genomban jelenlévő S253 és a HPV16 DNS-ben jelenlévő S243 aminosav oldalláncok vizsgálatai során kimutatták, hogy a szerin oldalláncot hordozó foszforilált E2 fehérje hosszabb felezési idővel rendelkezik, valamint az E2 253/243. pozícióban foszforilált szerin oldallánca részt vesz a vírus genom gazdasejt kromatin állományához való kötődésben. A mutáns F245 E2 fehérje nem foszforilálódik a protein kináz A és B által, ennek következtében módosulhat a kromatin kötődés és a foszforilációs hely elvesztése rövidebb E2 felezési időt is eredményezhet. Emiatt csökkenhet a HPV genom utódsejtekbe történő átvitele, így mérséklődhet a vírus gazdaszervezeten belüli terjedése. Bár az N247T egy lehetséges új foszforilációs helyet hoz létre a S245F közelében, az a hinge-régió hélixének belső részében helyezkedik el, így kevésbé valószínű, hogy valóban foszforilációs helyként szolgál. Másrészt mivel egy másik kináz célpontja lehet, így más celluláris szabályozási utakhoz kapcsolódhat, így ennek a foszforilációs helyek a megjelenése nem tekinthető egyenértékűnek a megszűnő S245F foszforilációs hellyel. Azonban ezek az aminosavcserek nincsenek hatással az LCR és az E2 protein kölcsönhatására; a kotranszfekciós kísérleteink azt mutatták, hogy az aminosavcsereket hordozó E2 variáns (S245F, N247T, K308R) LCR aktivitásra gyakorolt hatása nem különbözött a mutációkat nem hordozó, vad típusúnak tekinthető E2 variáns (csak K308R) hatásától.

A HPV11 LCR-ben található polimorfizmusok meglepte is azt támasztja alá, hogy a referencia genom egy különösen agresszív egyedi variánst képvisel és a vad típusú HPV11 szekvencia közelebb állhat a JO-RRP8/11 és CAC/11 által alkotott szekvencia variáns csoporthoz. Így a prototípus szekvencia számos egyedi polimorfizmussal rendelkezik, mint pl. az attenuátor mutáció (T7547C) az

LCR-ben, amely esetében feltehetően a C7547 képviseli a vad típust, ezzel szemben a súlyos papillomatózisból származó referencia genomban megjelenő egyedinek tűnő mutáció (T7547) fokozza az LCR aktivitását. A referencia LCR szekvenciát egyetlen általunk vizsgált mintában tudtuk kimutatni (CA/11), amely hasonlóan magas LCR alap aktivitással rendelkezett. Ez magyarázhatja az okozott betegség fokozott súlyosságát is.

Hasonlóan, az E7 fehérjében jelenlévő polimorfizmus (A45S) inkább képviseli a vad típust, az A45 szintén egy feltételezett foszforilációs hely elvesztéséhez vezet a referencia szekvenciában, míg a feltételezett vad típusú HPV11-ben, illetve a HPV6 esetében ugyanezen pozícióban található szerin foszforilációs helyként szolgál. Érdekes módon, a HPV16 esetében az ezen aminosavnak megfelelő helyen alanin található.

Az E5a fehérjében azonosított két aminosavcsere (I28F és V41L) – amely szintén minden szekvenciánkban megtalálható – ugyancsak arra utalhat, hogy a referencia szekvencia (a CA/11-gyel együtt) egy nem túl gyakori változat és a polimorfizmus módosíthatja a vírusvariáns által okozott betegség súlyosságát, mivel korábbi vizsgálatok már kimutatták, hogy az E5a fehérje – szemben a magas onkogén kockázatú genotípusokkal - fontos szerepet játszó onkoprotein az alacsony onkogenitású genotípusok által okozott elváltozások patogenezisében.

Hasonlóan, egy általunk vizsgált mintát kivéve, az E2 ORF-ben megjelenő K308R aminosavcsere képviselheti a vad típust, amely esetében a vad típusú arginin az E2 dimerben erős kötést alakít ki a stabilizáló láncok között, míg a referencia szekvenciában megtalálható lizin inkább a DNS-hez (LCR-hez) való kötődést segíti elő. Ez a feltételezett erős DNS-hez való kötődés állhat a referencia E2 fehérje LCR aktiváló hatásának jelentős növekedése mögött; a referencia E2 a luciferáz tesztben minden LCR mintázat esetében szignifikánsan fokozta az LCR transzkripciót aktiváló hatását. Ennek megfelelően ez az E2 variáns hozzájárulhat az okozott betegség súlyosabb manifesztációjához (referencia szekvencia, CA/11, JO-RRP6/11).

Minden HPV11 szekvenciánk LCR-ében megtalálható attenuátor polimorfizmus (T7547C), valamint a JO-RRP3/11 és JO-RRP5/11-ben megtalálható további attenuátor polimorfizmus (T7509Δ) hozzájárulhatnak a csökkent LCR aktivitáshoz. Az ugyanezen mintákból származó E2 variánsok is alacsony LCR aktiváló hatással rendelkeznek, aminek következtében a kombinációjuk a legalacsonyabb LCR aktivitást eredményezi, és magyarázhatja, hogy ezek a papillomák mostanáig szoliterek maradtak.

Amikor a legkevésbé hatékony LCR és a közepes hatékonyságú E2 fehérje kölcsönhatását vizsgáltuk, az eredmény hasonló volt, mint a közepes hatékonyságú LCR és a hibás működésű E2 kombinációjaként kapott LCR aktivitás; az ezen LCR-E2 kombinációkat hordozó HPV11 variánsokkal történt fertőzés mérsékelt súlyosságú papillomatózist eredményezett. Ez megerősíti,

hogy az LCR egyéni transzaktiváló hatása és az E2 enhanszer hatására történő LCR aktivitás fokozódása együttesen alakítják ki az LCR bruttó hatását. A legmagasabb LCR aktivitást az önmagában is legmagasabb aktivitást mutató referencia LCR mintázat és E2 variáns kölcsönhatása eredményezte. Egy kevésbé erős LCR (JO-RRP6/11) magas aktivitást mutatott a referencia E2 fehérjével kölcsönhatásban; ezen HPV11 genom jelenléte egy több mint 60 recidívával jelentkező, súlyos lefolyású papillomatózis megjelenésével párosult. Számos közepes súlyosságú esetből (2-10 recidíva) származó HPV11 genom a legtöbb szekvenciát magába foglaló, közepes egyéni transzaktiváló hatással rendelkező mintázathoz sorolható LCR és az ugyancsak leggyakoribb E2 variáns kombinált hatásának eredőjeként, mérsékelt transzaktiváló aktivitással rendelkezik.

Jelen tanulmány eredményeit összegezve elmondható, hogy az alacsony onkogén kockázatú HPV6 és 11 esetében is valószínűsíthető, hogy az egyes variánsok közötti különbségek és az általuk okozott kórképek súlyossága között összefüggés van. Továbbá eredményeink megerősítik azokat a korábban már publikált eredményeket, melyek szerint a felnőttkori papillomatózisok (AO-RRP) esetében gyakrabban mutatható ki HPV6 genotípus, míg a fiatalkori papillomatózis (JO-RRP) esetén a HPV11 genotípus gyakoribb, kivéve egy amerikai tanulmányt mely esetében a vizsgált JO-RRP-ben szenvedő páciensek mintáiból kimutatott HPV szekvenciák között nagyobb arányban fordult elő HPV6. Azonban a korábbi tanulmányokhoz hasonlóan Amiling és munkacsoportja (2021) is arról számolt be, hogy a HPV11-asszociált fiatalkori papillomatózisok magasabb agresszivitást mutatnak. Labedz és munkatársai (2020) szintén erre a következtetésre jutottak vizsgálataik során, továbbá megállapították, hogy kapcsolat van az extralaringeális terjedés, a tracheosztóma használata és a diagnózis ideje között (az 5 éves kor alatt diagnosztizált eseteknél gyakoribb az extralaringeális terjedés előfordulása), valamint szignifikáns összefüggést találtak az extralaringeális terjedés és a HPV11 fertőzöttség között.

A filogenetikai vizsgálataink eredményeit összefoglalva elmondható, hogy – más kutatócsoportok eredményeivel összehangban - az általunk vizsgált HPV6 szekvenciák esetében a B1 alvonal, míg HPV11 esetében az A2 alvonal a domináns, illetve ezen alvonalak globális dominanciája is jellemző. A HPV6 teljes genom szekvenciáink vizsgálata számos hasonlóságot és különbséget tárt fel az alvonalak tekintetében, így i.) az A vonalban és B1 alvonalban közel azonos számú nukleotid mutációt azonosítottunk; ii.) de míg a B1 alvonal esetében jórészt egyedi mutációk voltak jelen, addig az A vonal esetében a legtöbb polimorfizmus a vizsgált minták jelenős hányadában jelen volt; iii.) míg az A vonal esetén a polimorfizmusok szinte csak a DNS szintjén jelentek meg, addig a B1 alvonal esetében több olyan nukleotid mutációt is azonosítottunk, amelyek hatása fehérje szinten is érvényesült, aminosavcserét okozva a referenciákhoz viszonyítva; iv.) az A vonal LCR-ében több nukleotid polimorfizmust azonosítottunk, mint a B1 alvonalban; v.) az A

vonalba tartozó HPV6 szekvenciákat csak AO-RRP páciensek mintájából sikerült kimutatni, míg a B1 alvonalba tartozó szekvenciák heterogénebb mintacsoportból (AO-RRP, JO-RRP, CAC, LP, CA) származtak. Mindezeket figyelembe véve úgy tűnik, hogy a magas onkogén kockázatú típusokhoz hasonlóan a HPV6 filogenetikai (al)csoportjai esetében detektált különbségek hatással lehetnek a variánsok különböző betegségeken/betegcsoportokban való előfordulására, bár ennek megerősítésére nagyobb mintaszámon kivitelezett további vizsgálatokra van szükség.

Az eddig megismert HPV6 és 11 genotípus variánsok szekvencia analízise alapján megállapítható, hogy az E6 és E7 onkoproteinek erősen konzerváltak a HPV11, illetve a HPV6 esetében is, ami arra enged következtetni, hogy az onkoproteinek szerepe nagyon szigorúan szabályozott és funkciójuk fenntartásához csak minimális szerkezeti változást képesek tolerálni. Ez összhangban áll azzal a ténnyel, hogy az alacsony és a magas onkogén kockázatú HPV genotípusok replikációja és transzkripciója jelentős különbséget mutat. A magas onkogenitású HPV-k E6 és E7 onkoproteinje kulcsfontosságú szerepet tölt be a sejt transzformációban, valamint ezen fehérjék variabilitása határozza meg a genotípusok és szubtípusok onkogenitási kockázatát. Ezzel szemben úgy tűnik, hogy az alacsony onkogén kockázatú genotípusok patogenitásbeli különbségének hátterében, nem ezen onkoproteinek, hanem az E1, E2/E4 és E5a, valamint a kapszid proteinek és az LCR variabilitása állhat.

Összefoglalás

Az alacsony onkogén kockázatú HPV6 és 11 etiológiai szerepe már bizonyított számos benignus megbetegedés, köztük a rekurrens légúti papillomatózisok kialakulásában, azonban a kórképek súlyossága és a vírus genetikai jellemzői közötti összefüggések még kevésbé ismertek. Azonban egyre inkább ismert az, hogy a magas és alacsony onkogén kockázatú HPV genotípusok alapvető különbségeket mutatnak az okozott betegség kórlefolyásában és az annak hátterében álló genetikai variabilitás tekintetében.

A munkánk során célunk új páciensektől, valamint már ismert betegek új recidívájából származó HPV6 és HPV11 szekvenciák teljes genom analízise volt. *In silico* protein modellezéssel vizsgáltuk az aminosavcserék potenciális hatását a vírusfehérjék szerkezetére és a fehérjék funkciójára. Transziens transzfekciós kísérletekben elvégeztük a különböző LCR mintázatok funkcionális vizsgálatát, valamint elemeztük az E2 fehérje variánsainak hatását az LCR aktivitására.

A HPV6 genomjaink a filogenetikai elemzés alapján az A fő-, valamint a B1 és B3 alvonalba tartoztak, leggyakoribbnak a B1 alvonalt bizonyult. A szekvencia elemzések eredményei alapján a HPV6B1 alcsoportba tartozó szekvenciák ORF-jei esetében a nukleotidcserék többször

eredményeztek aminosavcserét is, mint az A vonalba sorolható HPV6 genomok esetén. Ezzel szemben a LCR-t tekintve az HPV6A szekvenciái bizonyultak variábilisabbnak.

Az HPV6 LCR funkcionális vizsgálata során a variánsok LCR aktivitásának gradiens-szerűen csökkenését tapasztaltuk; legmagasabb a HPV6A vonal transzkripciót aktiváló képessége, melyet a B1 és végül a B3 filogenetikai alcsoport LCR aktivitása követ. Ez alátámasztja azt a hipotézist, hogy különbség van az egyes HPV6 (al)csoportok sejtproliferációt moduláló hatása között. A B1 alcsoporttal szemben a HPV6A filogenetikai vonal esetében inkább az LCR transzkripciót aktiváló hatása érvényesül. A HPV6A vonalban azonosított transzkripció faktor kötőhelyek nagyobb variabilitása is ezt támaszthatja alá.

A HPV11 esetében az ORF-ek és az LCR is számos polimorfizmust tartalmaz a referencia szekvenciához viszonyítva. A filogenetikai vizsgálatok alapján az A2 alvonallal dominanciája volt megfigyelhető. A szekvencia vizsgálatok alapján az E1, E2/E4 és E5a, valamint a kapszid proteinek kódoló régiók és az LCR esetében nagyobb variabilitás figyelhető meg.

Az E2 ORF-ben azonosított K308R aminosavcsere E2 dimerben erős kötést alakít ki a stabilizáló láncok között, de nem befolyásolja a DNS-kötést, amely következtében ez az E2 variáns kevésbé hatékony enhanszer aktivitással rendelkezik, mint a referencia E2. Az egyedi Q86K aminosavcsere a fehérje felszíni töltését változtatja meg. A két, a fehérje hinge-régiójában található szintén egyedi aminosaveltérés (S245F és N247T) a foszforilációs mintázatban okoz változást. Az E2/E4 ORF régióban azonosított 58 bp deléció leolvasási kereteltolódást és korai stop kodon kialakulását eredményezi, amely valószínűleg működésképtelen E2 fehérjét hoz létre; az E2 funkció kiesése pedig hozzájárulhatott a diszpláziával járó papillomatózis kialakulásához.

Az LCR és E2 kotranszfekciós vizsgálata megerősíti, hogy az LCR valódi transzaktiváló hatása és az E2 enhanszer hatására történő LCR aktivitás fokozódása együttesen befolyásolják az LCR nettó hatását.

Eredményeink alapján tehát úgy tűnik, hogy az alacsony onkogén kockázatú genotípusok intratípusos variánsainak esetében is - hasonlóan a magas onkogén kockázatú genotípusokhoz – azonosíthatóak olyan vírusgenetikai különbségek, amelyek eltéréseket okoznak a vírusvariáns patogenitásban/virulenciájában a referenciához képest, de ezen eltérések hátterében nem a fő onkoproteinek, hanem sokkal inkább az E1, E2/E4 és E5a, valamint a kapszid proteinek és az LCR variabilitása állhat.



Nyilvántartási szám: DEENK/85/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Nagy Zsófia

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10053201

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Nagy, Z.**, Pethő, Z., Kardos, G., Major, T., Szűcs, A., Szarka, K.: Effect of E2 and long control region polymorphisms on disease severity in human papillomavirus type 11 mediated mucosal disease: protein modelling and functional analysis.
Infect. Genet. Evol. 93, 1-13, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104948>
IF: 3.342 (2020)
2. Szinai, M., **Nagy, Z.**, Máté, P., Kovács, D., Laczkó, L., Kardos, G., Sápy, T., Szűcs, A., Szarka, K.: Comparative analysis of human papillomavirus type 6 complete genomes originated from head and neck and anogenital disorders.
Infect. Genet. Evol. 71, 140-150, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2019.03.019>
IF: 2.773





További közlemények

3. Major, T., Szarka, K., **Nagy, Z.**, Kovács, I., Balog, C., Karosi, T.: Gyulladás vagy daganat?: egy hirtelen jelentkező lateralis cysticus nyaki terime tanulságai.
Orv. hetil. 162 (15), 595-600, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2021.32087>
IF: 0.54 (2020)
4. Király, R., Thangaraju, K., **Nagy, Z.**, Collighan, R., Nemes, Z., Griffin, M., Fésüs, L.: Isopeptidase activity of human transglutaminase 2: disconnection from transamidation and characterization by kinetic parameters.
Amino Acids. 48 (1), 31-40, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-015-2063-5>
IF: 3.173

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,828

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,115

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

Debrecen, 2022.02.17.

