

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Rekurrens légúti papillomatózisok prognosztikai tényezőinek vizsgálata

Nagy Zsófia

Témavezető: Dr. Szarka Krisztina



**DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2022.

1. Tartalomjegyzék

1.	Tartalomjegyzék	1
2.	Rövidítések jegyzéke	3
3.	Bevezetés	4
4.	Irodalmi áttekintés	5
4.1	Papillomavírusok rendszertana	5
4.2	Humán papillomavírusok felépítése	7
4.3	Virális fehérjék	8
4.3.1	<i>E1 fehérje</i>	8
4.3.2	<i>E2 fehérje</i>	9
4.3.3	<i>E4 fehérje</i>	10
4.3.4	<i>E5 fehérje</i>	11
4.3.5	<i>E6 fehérje</i>	12
4.3.6	<i>E7 fehérje</i>	13
4.3.7	<i>L1 és L2 fehérje</i>	13
4.4	Hosszú szabályozó régió – long control region	14
4.5	A humán papillomavírusok szaporodási ciklusa.....	16
4.6	Humán papillomavírusok által okozott megbetegedések	17
4.6.1	<i>Az alacsony onkogén kockázatú humán papillomavírus infekcióval asszociált anogenitális kórképek</i>	18
4.6.1.1	Condyloma acuminatum	18
4.6.1.2	Leukoplakia penis	19
4.6.1.3	Ismeretlen jelentőségű atípiás laphámsejtek és enyhe fokú laphámsejtes intraepiteliális lézió.....	19
4.6.2	<i>Rekurrens légúti papillomatózis</i>	19
4.7	Diagnosztika	21
4.8	Megelőzés és terápia	22
4.9	Humán papillomavírus 6 és 11 intratípusos varianciája	27
5.	Célkitűzések	30
6.	Anyagok és módszerek	31
6.1	Betegek adatai	31
6.2	Nukleinsav izolálása és a vírusok jelenlétének kimutatása	31
6.3	Teljes genom amplifikáció és egyedi nukleotid polimorfizmusok meghatározása ...	33
6.4	Filogenetikai analízis	34
6.5	Transzkripció faktor kötőhelyek vizsgálata HPV6 genotípus esetében	35
6.6	HPV11 E2 fehérjéjének in silico modellezése.....	35
6.7	Klónozási folyamatok	36
6.8	Irányított mutagenézis.....	38
6.9	A hosszú szabályozó régió (LCR) transzkripciót szabályozó aktivitásának vizsgálata, valamint az E2 virális fehérjék hatásának vizsgálata az LCR aktivitására.....	39
7.	Eredmények	40
7.1	Teljes genom szekvenciák elemzése és filogenetikai besorolásuk	40
7.1.1	<i>A HPV6 teljes genom szekvenciák vizsgálatának eredményei</i>	40
7.1.2	<i>A HPV11 teljes genom szekvenciák vizsgálatának eredményei</i>	43
7.2	A hosszú szabályozó régió (LCR) funkcionális vizsgálata	49
7.2.1	<i>A HPV6 LCR funkcionális vizsgálatának eredményei</i>	49
7.2.2	<i>A HPV11 LCR funkcionális vizsgálatának eredményei</i>	51
7.3	HPV11 E2 korai vírusfehérje modellezése és az E2 protein variánsok funkcionális vizsgálata	55
8.	Megbeszélés.....	64
8.1	Konklúziók.....	75
9.	Összefoglalás	76

10.	Summary.....	78
11.	Irodalomjegyzék	80
11.1	Hivatkozott közlemények jegyzéke	80
11.2	Internetes források	88
11.3	Saját közlemények jegyzéke	89
12.	Tárgyszavak.....	91
12.1	Magyar tárgyszavak:.....	91
12.2	English keywords:.....	91
13.	Köszönetnyilvánítás	92
14.	Mellékletek	93
14.1	melléklet: Aminosavak rövidítései	93
14.2	melléklet: HPV6 pozitív páciensek adatai	94
14.3	melléklet: HPV11 pozitív páciensek adatai	95
14.4	melléklet: HPV6 teljes genom PCR reakcióhoz használt primerek szekvenciái és anellációs hőmérsékletek	96
14.5	melléklet: HPV11 teljes genom PCR reakcióhoz használt primerek szekvenciái és anellációs hőmérsékletek	97
14.6	melléklet: Az egyedi nukleotid polimorfizmusok azonosításához használt HPV6 és HPV11 referencia genomok	97
14.7	melléklet: A filogenetikai elemzésekhez használt génbankban található további HPV6 és HPV11 szekvenciák összesítése.....	98
14.8	melléklet: Humán papillomavírus 6 filogenetikai analízisének dendrogramja	99
14.9	melléklet: Humán papillomavírus 11 filogenetikai analízisének dendrogramja.....	100
15.	Függelék	101

2. Rövidítések jegyzéke

μL – mikroliter

ASCUS – nem tisztázott jelentőségű atípusos laphámsejtek (atypical squamous cells of undetermined significance)

b - bázis

BPV1 – Bovin papillomavírus 1 (szarvasmarha papillomavírus 1)

CAC – condyloma acuminatum

CDV – cidofovir

CIN – cervikális intraepiteliális neoplázia (cervical intraepithelial neoplasia)

DBD – DNS-kötő domén (DNA-binding domain)

DNS – dezoxiribonukleinsav (deoxyribonucleic acid)

HPV – humán papillomavírus

kb – kilobázis

LCR – hosszú szabályozó régió (long control region)

LP – leukoplakia penis

LSIL – alacsony fokú laphámsejtes intraepiteliális lézió (low-grade squamous intraepithelial lesion)

mRNS – messenger RNS (ribonukleinsav)

ORF – nyitott leolvasási keret (open reading frame)

pmól - pikomól

RRP – rekurrens légúti papillomatózis (recurrent respiratory papillomatosis)

PV – papillomavírus

SNP – egy pontos nukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)

TAD – transzaktivációs domén (transactivation domain)

U – egység (unit)

3. 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 (Derkay, 2001; Dickens és mtsai., 1991). Ezen elváltozások kialakításában az alacsony onkogén kockázatú humán papillomavírus (HPV) 6 és 11 genotípusok etiológiai szerepe már bizonyított, további klinikai vizsgálatok pedig igazolták, hogy a papillomatózisok agresszívebb lefolyású eseteiben a HPV11 genotípus mutatható ki gyakrabban (Major és mtsai., 2005; Larson és Derkay., 2010). Az elsődleges terápiás lehetőség a papillomák sebészi úton történő eltávolítása, azonban az esetek 20%-ában valamilyen adjuváns kezelés alkalmazása is szükségessé válhat (Ivancic és mtsai., 2018).

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 azonosított nukleotid polimorfizmusok magyarázhatják a papillomatózisok manifesztációjában tapasztalható különbségeket (Gáll és mtsai., 2013).

Kutatások kimutatták, hogy számos akut és krónikus betegség kialakulása és progressziója összefüggésbe hozható a páciensek egyedi tulajdonságaival (Kinkorová, 2016). 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 varianciája, a variánsok patogenitása, az okozott betegségek kórlefolyása közötti kapcsolat feltárásához szolgáltatnak újabb adatokat, amelyek megkönnyíthetik a HPV6- és HPV11-asszociált betegségek prognózisának megítélését, illetve akár segítséget nyújthatnak a személyre szabott terápia kidolgozásához.

4. Irodalmi áttekintés

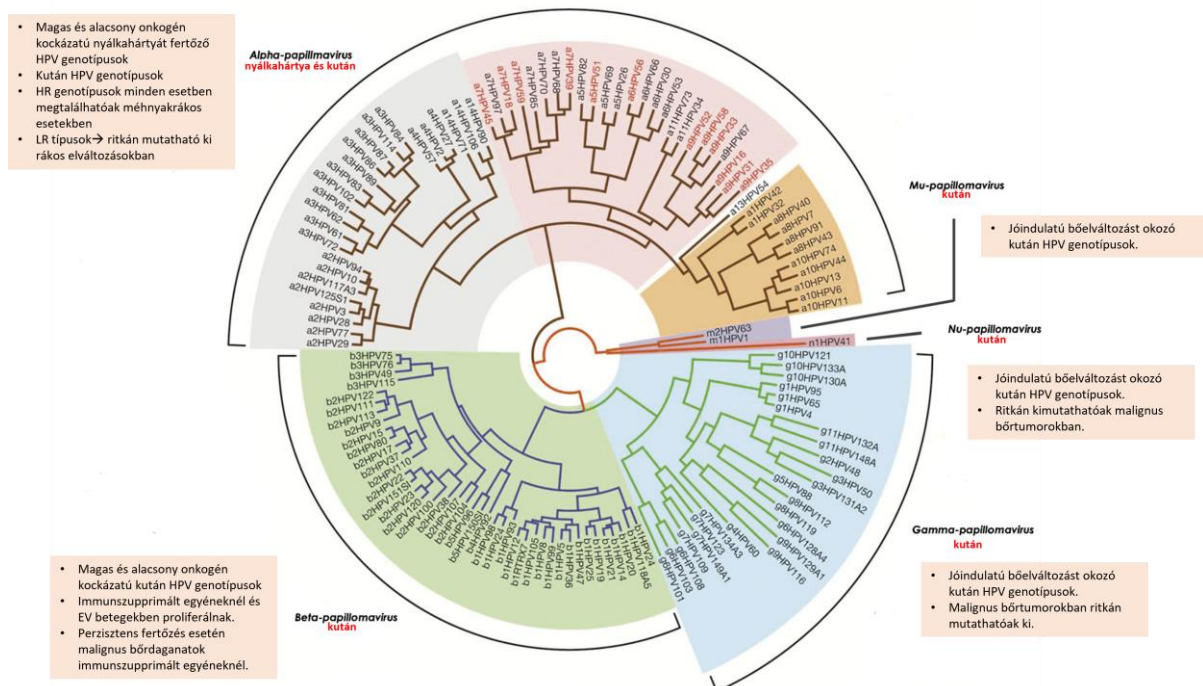
4.1 Papillomavírusok rendszertana

Korábban a papillomavírusokat (PV) a polyomavírusokkal együtt a *Papovaviridae* családba sorolták. Ez elsősorban a két vírus hasonló morfológiai tulajdonságai alapján történt, mivel mindkét víruscsalád cirkuláris dupla-szálú DNS genommal és burok nélküli, ikozahedrális kapsziddal rendelkezik. A virális genomok különbségeinek megismerése után (polyomavírusok genom mérete 5 kilobázis [kb], míg a PV-oké általában 8 kb; a korai és késői gének ellentétes orientációban fejeződnek ki a polyomavírusok esetében, nincs homológ gén a két víruscsalád között) azonban a vírusokat a Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) két családba osztotta, a *Papillomaviridae* és a *Polyomaviridae* víruscsaládba. Egyetlen hasonlóságot mutattak ki a korábban egy víruscsaládba sorolt vírusok között: a PV-ok E1 fehérjéjének és a polyomavírusok nagy T-antigénjének is van egy körülbelül 200 aminosavból álló DNS-helikáz doménje (de Villiers és mtsai., 2004).

A PV-ok klasszifikációja a vírus L1 fő kapszidfehérjéjét kódoló nyitott leolvasási keret (open reading frame, ORF) szekvenciája alapján történik. Az L1 ORF a legkonzervatívabb gén a vírusgenomban. 1995-ben Québec-ben tartott Nemzetközi Papillomavírus Workshop-on (International Papillomavirus Workshop) határozták meg a kutatók, hogy az újonnan izolált PV-ok esetében mikor beszélhetünk új genotípusról, szubtípusról, illetve intratípusos variánsról. Ha az L1 ORF DNS szekvenciája több mint 10 %-ban eltér a legközelebbi ismert PV szekvenciájától, új genotípusról beszélünk. Abban az esetben, ha az eltérés 2-10% közötti, szubtípusról, ha pedig a kevesebb mint 2%, akkor intratípusos variánsról van szó (de Villiers és mtsai., 2004).

A humán papillomavírusokat (HPV) DNS szekvenciájuk alapján öt (*Alpha*, *Beta*, *Gamma*, *Mu* és *Nupapillomavirus*) nemzetségbe sorolhatjuk (1. ábra); az eltérő típusok különböző életciklussal, illetve eltérő hozzájuk asszociált kórképekkel jellemezhetők. Az *Alphapapillomavirus* nemzetségbe főként a nyálkahártyákat fertőző, a méhnyakrák kialakításában is részt vevő magas és a jóindulatú nyálkahártya elváltozásokat okozó alacsony onkogén kockázatú HPV genotípusok sorolhatóak, illetve ide tartozik még néhány, a bőrön szemölcsös elváltozást okozó kután genotípus is. Néhány genotípus képes nyálkahártya- és bőrelváltozásokat is kialakítani, azonban a preferencia általában nyilvánvaló. Az alacsony onkogén kockázatú HPV-k DNS-e ritkán mutatható ki rákos elváltozásokban, míg a magas onkogén kockázatú HPV genotípusok örökítőanyaga majdnem minden esetben megtalálható a malignus megbetegedésekben. A *Beta*- és *Gammapapillomavirus* nemzetségekbe főként kután elváltozásokat okozó HPV genotípusok sorolhatóak. A *Betapapillomavirus*-ok csoportjában

magas és alacsony onkogén kockázatú HPV típusok egyaránt előfordulnak, míg a *Gammapapillomavirus*-ok közé inkább a jóindulatú bőrelváltozásokat kialakító HPV genotípusok tartoznak. Az elmúlt néhány év vizsgálatai alapján a *Beta*- és *Gammapapillomavirus* nemzetségbe tartozó HPV genotípusok egészséges immunrendszerrel rendelkező egyéneknél nem okoznak látható elváltozást, azonban immunszupprimált egyéneknél, illetve *epidermodysplasia verruciformis*-ban (EV) szenvedő betegekben képesek bőrelváltozások kialakítására. A *Mu*- és *Nu*-papillomavirus nemzetségbe jóindulatú bőrelváltozást okozó HPV genotípusok sorolhatóak (Doorbar és mtsai., 2012).



1. ábra: A HPV-ok öt nemzetségébe tartozó genotípusok és a nemzetségek főbb jellemzői (Doorbar és mtsai., 2012)

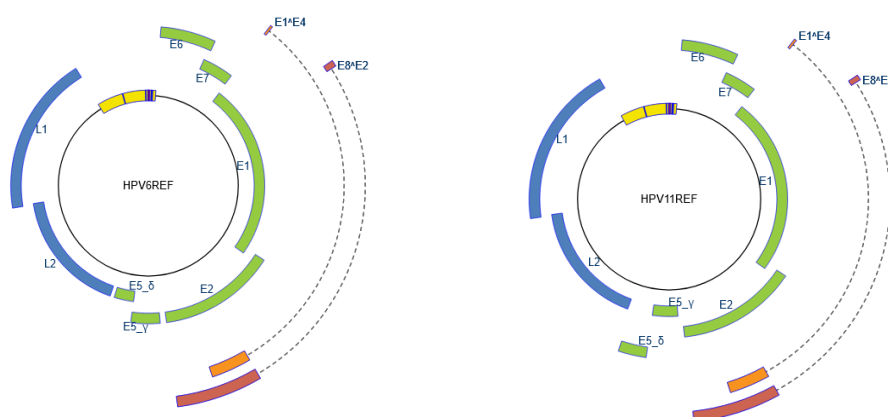
A HPV-k genomi diverzitását, valamint a földrajzi elterjedését főként a magas onkogén kockázatú genotípusok esetében tanulmányozták. A kutatások alapján a magas onkogén kockázatú HPV16, illetve HPV18 esetében főként az E6 onkoproteinben azonosított nukleotid, illetve aminosav eltérések játszanak szerepet az eltérő agresszivitású kórképek kialakításában (Tornesello és mtsai., 2000; Villa és mtsai., 2000; Zehbe és mtsai., 1998 és 2009). A HPV16 filogenetikai analízise során azonosított négy fő filogenetikai vonal elnevezése utal az intratípusos variánsok földrajzi elterjedésére; a variánsok európai-ázsiai, 1-es és 2-es afrikai, valamint észak-amerikai/ázsiai-amerikai variáns-csoportokba sorolhatók. Több vizsgálat is kimutatta, hogy az egyes variánsok gyakorisága eltérő a különböző súlyosságú kórképekben. A HPV16-asszociált méhnyakrákos esetekben gyakrabban mutatható ki az ázsiai-amerikai HPV16 variáns (AA1-es), mint az európai (Berumen és mtsai., 2001, Cornet és mtsai., 2012; Smith és mtsai., 2011). Az alacsony onkogén kockázatú

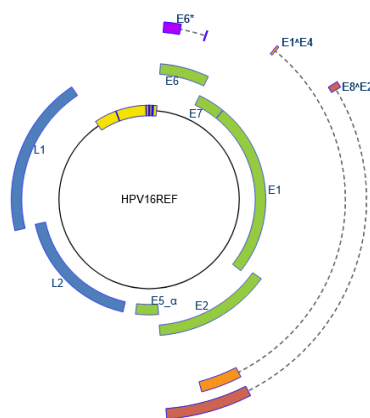
HPV genotípusok genomi diverzitásáról kevés információ áll rendelkezésünkre, az általunk részletesen vizsgált két genotípus (HPV6 és HPV11) intratípusos varianciájáról és földrajzi elterjedéséről szóló információkat külön alfejezetben részletezem.

4.2 Humán papillomavírusok felépítése

A PV-ok burok nélküli, ikozahedrális kapsziddal rendelkező vírusok, körülbelül 8 kb hosszúságú cirkuláris dupla-szálú DNS genommal rendelkeznek. Genomjuk nyolc gént kódol. Három onkoproteinjük (E6, E7 és E5) a gazdasejtek transzformációért felelős, két szabályozó fehérjéjük (E1 és E2) a vírusreplikációt és transzkripciót szabályozza, az E4 protein pedig – melynek kódoló régiója az E2 ORF-en belül található – a vírus kiszabadulásában játszik szerepet. Két kapszid fehérjével rendelkeznek; az L1 a fő kapszidprotein, az L2 pedig a minor kapszid fehérje. A replikáció 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 (de Villiers és mtsai., 2004).

Az alacsony és a magas onkogén kockázatú HPV genotípusok genomjának szerveződésében több különbség is megfigyelhető (2. ábra). Az egyik eltérés az E5 onkoprotein esetében figyelhető meg; míg a magas onkogén kockázatú HPV genotípusok esetében egy E5 fehérjéről beszélhetünk, addig az alacsony onkogén kockázatú HPV genotípusok esetében E5a és E5b (illetve E5 γ és E5 δ) fehérjéket különböztetünk meg. Az E5a és E5b virális fehérjék az alacsony onkogén kockázatú HPV genotípusokra jellemzőek, az E5a expressziója és funkciója esetében készültek tanulmányok, melyek alapján a magas onkogén kockázatú E5 fehérjéhez hasonló gyenge transzformáló hatással rendelkezik. Az E5b expressziójáról, illetve funkciójáról jelenleg nem állnak rendelkezésünkre irodalmi adatok (DiMaio és Petti, 2013).





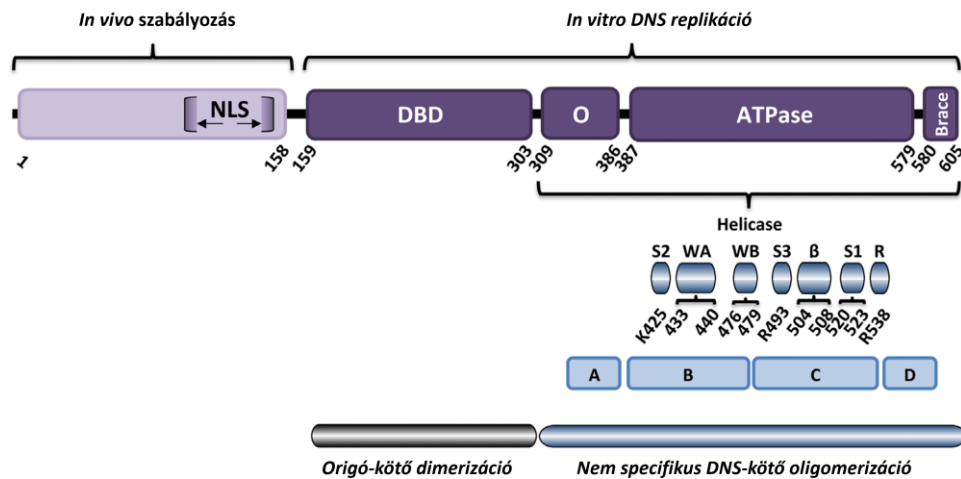
2. ábra: A humán papillomavírus 6, a HPV11 és a HPV16 genom szerveződése (Forrás: <https://pave.niaid.nih.gov/>)

Ugyancsak különbség van a két csoport E6 és E7 onkoprotein expressziójának szabályozásában. A magas onkogén kockázatú HPV genotípusok E6/E7 virális fehérjéknek közös promótere van (pl. HPV16 esetében a p97), míg az alacsony onkogén kockázatú vírusok esetében két külön promóter szabályozza az onkoproteinek expresszióját. A HPV11 esetében az E6 fehérje expressziójáért felelős promóter az LCR-en belül, a 90. nukleotid pozíciónál található, míg az E7 fehérje expressziót szabályozó promóter régió a 264. nukleotid pozíciótól indul (Smotkin és mtsai., 1989).

4.3 Virális fehérjék

4.3.1 E1 fehérje

Az E1 fehérje egy ATP-függő DNS helikáz, a PV-ok egyetlen enzimaktivitású fehérjéje. A legnagyobb vírusfehérje, mérete 600-650 aminosav között mozog. Fontos szerepet tölt be a fertőzött sejtek magjában zajló episzomális virális replikációban és az amplifikációban. N-terminális doménje felelős az *in vivo* replikáció szabályozásért és tartalmazza a nukleáris lokalizációért felelős szignált (nuclear localization signal, NLS). A DNS-kötő domén (DNA binding domain, DBD), illetve a C-terminális helikáz domén alkotják a DNS replikációért felelős régiót (3. ábra). A DBD specifikus helyeket ismer fel a replikációs origóban, míg a C-terminális enzimatis domén ATP-áz aktivitással rendelkezik és képes rövid DNS duplexek széttekerésére. A DBD és a helikáz domén *in vitro* elegendőek az ori-függő DNS replikációhoz, valamint a virális DNS replikáció molekuláris motorjának magját képezik (Bergvall és mtsai., 2013).

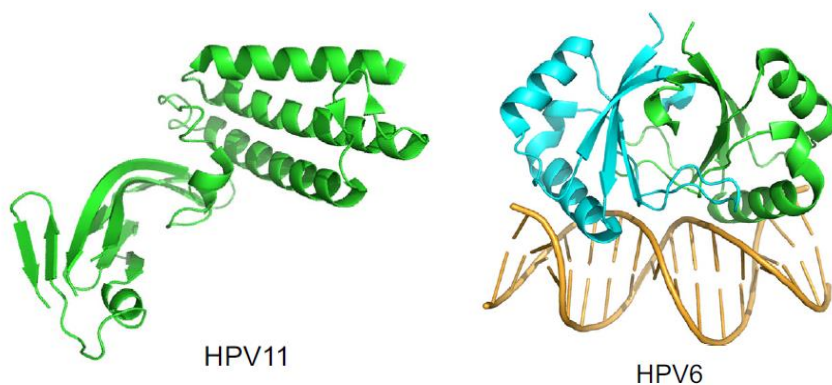


3. ábra: Szarvasmarha papillomavírus 1 genotípus (Bovine papillomavirus 1, BPV1) E1 proteinjének felépítése (Bergvall és mtsai., 2013).

4.3.2 E2 fehérje

Az E2 fehérje a PV-ok által kódolt szabályozó fehérje, mely az E1 proteinnel együtt részt vesz a DNS replikáció iniciálásában, a transzkripció szabályozásában, a virális genom megoszlásának szabályozásában, a vegetatív virális DNS replikációban és a poszttranszkripció folyamatokban. A vírus szaporodási ciklusának korai és középső szakaszában expresszálódik (McBride, 2013).

A fehérje N-terminális transzaktivációs doménje körülbelül 200 aminosav hosszúságú, amelyet a kapocs (hinge) régió köt a körülbelül 100 aminosav hosszúságú C-terminális DNS-kötő/dimerizációs doménhez. A hinge régió hosszúsága eltérő és a szekvenciája is változó a különböző PV genotípusokban. A Papillomavirus Episteme (PaVe) adatbázis honlapján (<https://pave.niaid.nih.gov>) ma már 15 HPV genotípus DNS-kötő doménjének homológ modellje érhető el, melyeket megvizsgálva azt tapasztaljuk, hogy az E2 DNS-kötő domének nagyon hasonló szerkezeti tulajdonsággal rendelkeznek, csak az egyes alegységek relatív orientációjában vannak különbségek (McBride, 2013). A 4. ábrán a HPV11 transzaktivációs doménjének és a HPV6 DNS-kötő doménjének molekuláris szerkezeti modellje látható.



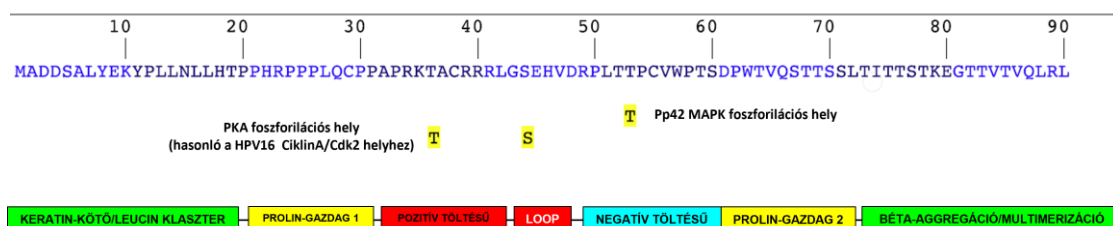
4. ábra: HPV11 transzaktivációs és a HPV6 DNS-kötő doménjének szerkezete (A HPV6 DNS-kötő doménje esetében sárga színnel a DNS jelöltük, kék és zöld színnel pedig a dimerizálódott DNS-kötő doméneket) (McBride, 2013).

Az E2 a PV-ok legfőbb transzkripciót szabályozó fehérjéje. Az E2 olyan celluláris faktorok szabályozásában vesz részt, melyek részt vesznek egyes transzkripciós folyamatok aktiválásában vagy represszáálásában. Az E2 fehérje hatással van a két fő onkoprotein (E6 és E7) expressziójára is, amellyel befolyásolhatja az egyes magas onkogén kockázatú PV-ok esetében a rosszindulatú elváltozások kialakulásának kockázatát. Az E2 fehérje segíti az E1 helikázt doménjének a replikációs origóhoz való kötődését, ezáltal részt vesz a virális DNS replikációjának elindításában (McBride, 2013).

4.3.3 E4 fehérje

Az E4 ORF az E2 ORF-en belül helyezkedik el és méretét tekintve eltérő az egyes PV-okban. A HPV-ok esetében az elsődleges E4 géntermék egy fúziós mRNS-ről fejeződik ki, melynek iniciációs kodonja és első néhány aminosavja az E1 ORF-ről származik; így jön létre az E1^{E4} mRNS. Az E1^{E4} transzkriptum megnövekedett mennyiségét figyelték meg HPV-ok által okozott kórképekben, ezáltal az E4 fehérje magas szintje akár biomarkerként is szolgálhat az aktív fertőzések detektálására. A HPV11 E1^{E4} fúziós fehérje aminosav sorrendjét, lehetséges foszforilációs helyeit, illetve moduláris szerkezeti felépítését mutatja be az 5. ábra (Doorbar, 2013).

Az alacsony onkogén kockázatú HPV genotípusok közül a HPV11 E1^{E4} fúziós fehérjéje a legjobban tanulmányozott. Hámeredetű sejt kultúrák, valamint HPV-asszociált elváltozásokból származó szövetminták vizsgálata során kimutatták a celluláris citokeratin hálózat E1^{E4}-mediált összeomlását. Az E1^{E4} protein képes közvetlenül kötődni az 1-es típusú keratinhoz, azonban nem kötődik a 2-es típusúhoz, illetve a vimentinhez. Emellett *in vitro* és *in vivo* kísérletekben is kimutatták, hogy sejtes stresszválaszt vált ki egyes stressz-asszociált kinázok (p38 és pJNK) aktiválásával. A kölcsönhatás következtében átszerveződés és hiperfoszforiláció következik be a citokeratin intermedier filamentum hálózatában; azt feltételezik, hogy ez a kölcsönhatás hozzájárulhat a vírusok kiszabadulásához, valamint a sejtek pusztulásához a felső hámrétegekben (Doorbar, 2013).



5. ábra: HPV11 E1^{E4} fúziós fehérje aminosav sorrendje, lehetséges foszforilációs helyei és a moduláris szerkezete (Doorbar, 2013).

A HPV11 E1^{E4} fúziós fehérje C-terminális régiója fontos szerepet tölt be a multimerizáció (oldhatatlan fehérje komplex kialakulása) folyamatában. A fehérje C-terminális régió béta-aggregációért/multimerizációért felelős doménje befolyással van a citoskeleton összeomlására azáltal, hogy ezen részek eltávolítása a fehérjéből megváltoztatja az intermediér filamentumokkal való kölcsönhatását a fehérjének (Roberts és mtsai., 1997). A fúziós fehérje MAP kináz foszforilációs helye a 53. pozícióban található treonin (5. ábra), melynek mutációja, ezáltal a foszforilációs hely elvesztése veszélyezteti a fehérje sejten belüli normál eloszlását. Ezen felül az E4 fehérje szerepet játszik a HPV11 fertőzött sejtek sejtciklusba való belépésének elősegítésében, azonban nem képes a szuprabazális sejtproliferáció elindításában. Ezen tulajdonsága miatt lehetséges, hogy ha a HPV11 elveszíti az E4 fehérjét, az csak minimális hatással van a vegetatív vírusgenom amplifikációjára (Doorbar, 2013).

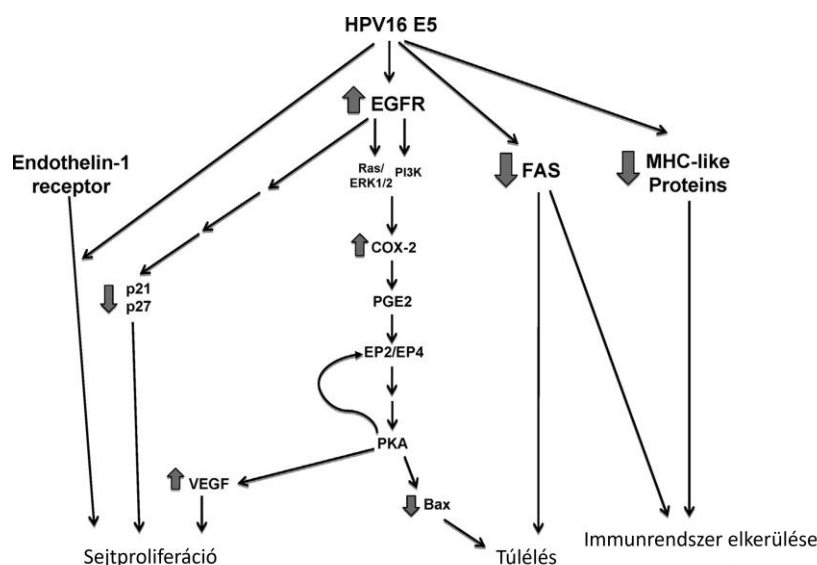
4.3.4 E5 fehérje

Az E5 fehérje egy rövid transzmembrán fehérje, melyet humán és állat PV-ok is kódolnak. Sejtkultúrákon, illetve állatokon végzett vizsgálatok igazolták transzformáló aktivitását, valamint, hogy a fehérje aktív szerepet játszik a vírus produktív életciklusban. A E5 fehérje expressziója során az E2 fehérje felől képződik egy fúziós mRNS, és erről a szekvenciáról fog kifejeződni az E5 fehérje. Általában 40-85 aminosav hosszúságú, hidrofób aminosavakban gazdag és egy vagy több transzmembrán doménbe rendeződik. Nincs belső enzimatis aktivitása, azonban képes különféle sejtférfék aktivitásának modulálására (DiMaio és Petti, 2013).

A HPV-ok E5 fehérjéje eltér az állati PV-ok E5 fehérjéjétől; a BPV1 E5 fehérjének aminosav szekvenciája nem hasonlít a HPV genotípusok E5 fehérjéjére. Emellett a magas onkogén kockázatú HPV genotípusok E5 fehérjének mérete kétszerese (kb. 80 aminosav) a BPV1 E5 fehérje méretének. A HPV esetében szintén különbség van a magas és alacsony onkogén kockázatú típusok E5 fehérjének felépítésében, melyet a HPV-ok felépítését tárgyaló alfejezetben részleteztem (DiMaio és Petti, 2013).

Kísérletek kimutatták, hogy az E5 protein jóval gyengébb transzformáló aktivitással rendelkezik, mint a két fő onkoprotein, az E6 és az E7, azonban valamilyen módon mégis hatással van a transzformációra. A HPV16 E5 fehérje képes stimulálni az epidermális növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor, EGFR) jelátviteli útvonalat, mellyel a sejtproliferációt befolyásolja. Továbbá kapcsolódik az MHC-I (major histocompatibility complex) antigén nehéz láncához, mellyel megakadályozza, hogy az a sejtfelszínre jusson, így interferálva az immunrendszer normál működésével. Hatással van a sejtek apoptózisára is; gátolja az apoptózis folyamatát egyrészt az EGFR jelátviteli rendszeren

keresztül, valamint a Fas receptor sejtfelszíni kifejeződésének csökkentésével (DiMaio és Petti, 2013) (6. ábra).



6. ábra: A HPV16 E5-mediált transzformáció esetében történő különböző jelátviteli útvonalak sematikus ábrája (DiMaio és Petti, 2013).

4.3.5 E6 fehérje

Az E6 onkoprotein szükséges a fertőzött sejtek malignus transzformálásához. Számos fehérjével képes komplexet alkotni, amelyek részt vesznek a celluláris transzkripciós folyamatokban, a gazdasejt differenciálódásában, a DNS károsodásra adott válaszreakciókban és a sejtek túlélésének modulálásban (Vande Pol és Klingelhutz, 2013).

A magas onkogén kockázatú HPV-k E6 fehérjéje képes az E6-asszociált protein (E6AP) közreműködésével kapcsolódni a p53 tumorsuppresszor proteinhez, mely a fehérje degradációjához vezet; ezáltal a p53 nem képes ellátni funkcióját, ami szintén hozzájárulhat a malignus elváltozások kialakulásához a genetikai hibák konzerválódása révén (Vande Pol és Klingelhutz, 2013). A magas onkogenitású genotípusok HPV E6 fehérjéje a PDZ-domén kötő motívumon keresztül kölcsönhatásba tud lépni a sejt jelátviteli folyamataiban és a sejtproliferáció regulációjában résztvevő PDZ-targetekkel is, így szabályozva azok működését (Doorbar és mtsai., 2012).

Az alacsony és magas onkogén kockázatú HPV genotípusok E6 fehérjéjének funkciója eltér. Az alacsony onkogén kockázatú genotípusok E6 fehérjéje képes kölcsönhatásba lépni proteoszóma alegységeivel, az E6AP-val (ubikvitin-ligáz domént tartalmazó celluláris enzim, amely képes az E6 proteinhez és p53-hoz is kötődni, ezáltal hozzájárul a p53 degradációjához; Vande Pol és Klingelhutz, 2013), zyxinnel (az alfa-aktinint és a CRP fehérjét kötő fokális adhézios molekula, amely a HPV6 E6 fehérjével való kölcsönhatás következtében felhalmozódik a sejtmagban és ott transzkripciós aktivátor szerepet tölt be;

Degenhardt és Silverstein, 2001a), GPS2-vel (G-fehérje jelátvitel szuppresszor 2; E6 fehérjével való kölcsönhatás következtében az E6 fehérje a Gps2 lebomlását indukálja, ezáltal a fehérje transzkripciót aktiváló hatását elnyomja, amely következtében csökken a sejtprolifерáció szabályozása; Degenhardt és Silverstein, 2001b), valamint MCM7-tel (szerepet játszik a DNS replikáció szabályozásában; E6 kötődése következtében kromoszóma-rendellenességeket okozhat, fontos szerepet tölt be a sejt növekedés és/vagy proliferáció szabályozásában; Kühn és Banks, 1998; Kukimoto és mtsai., 1998). Az alacsony onkogén kockázatú HPV-ok E6 fehérjéje is képes kötődni a p53 tumorsuppresszor fehérjéhez, azonban nem okozza annak teljes degradációját (Vande Pol és Klingelhutz, 2013). HEK293 és MCF7 sejtkultúrákban történt vizsgálatok azt mutatták, hogy az alacsony onkogén kockázatú E6-GFP fúzionált fehérje kötődik a citoplazmában a p53-hoz és ott tartja (Sun és mtsai., 2010), valamint p53-függő apoptózist indukált. Ezzel szemben alacsony kockázatú HPV genotípusokhoz társuló *condylomák*-ban magas p53 expressziót detektáltak a sejtmagban. Ezek alapján az alacsony onkogén kockázatú HPV-k E6 fehérjéjének a p53 tumorsuppresszor protein működését moduláló hatása nem teljesen tisztázott (Vande Pol és Klingelhutz, 2013).

4.3.6 E7 fehérje

A körülbelül 100 aminosavból álló E7 fehérje N-terminális része két hasonló konzervált régiót tartalmaz (CR1 és CR2), melyek nagy hasonlóságot mutatnak az adenovírus E1A fehérjével és az SV40 T-antigénjével. Az E7 C-terminális része cink-kötő motívumokból épül fel, amely nagy hasonlóságot mutat az E6 fehérje hasonló motívumaival. Az E7 onkoprotein a HPV-ok életciklusának központi regulátora; átprogramozza a gazdasejtet, lehetővé téve ezzel a vírusszaporodást. Az E7 fehérje a retinoblasztóma fehérjéhez (pRb) kötődve stimulálja a sejtprolifерációt, valamint fokozza a gazdasejt genomjának instabilitását. A tumor-asszociált *alpha*-HPV-ok által kódolt E7 fehérjék erős transzformáló aktivitással rendelkeznek, amelyek az E6 fehérjével együtt szükségesek, de nem elegendőek ahhoz, hogy a gazdaszervezet laphámsejtjeit daganatképzővé tegyék (Roman és Munger, 2013).

4.3.7 L1 és L2 fehérje

A PV vironok ikozahedrális kapsziddal rendelkeznek, melyet az L1 fő kapszid fehérje és L2 minor kapszid protein hoz létre. Minden virion 360 L1 fehérjét tartalmaz, amelyek 72 kapszomerré rendeződve találhatóak meg a vírus fehérjeburkában. A kapszomerek centrális régiójába illeszkedhetnek az L2 proteinek, de nem minden kapszomer tartalmazza az L2 fehérjét, így egy komplett virion 72, vagy attól kevesebb számú L2 fehérjét tartalmaz (Buck és mtsai., 2013, Wang és Roden, 2013).

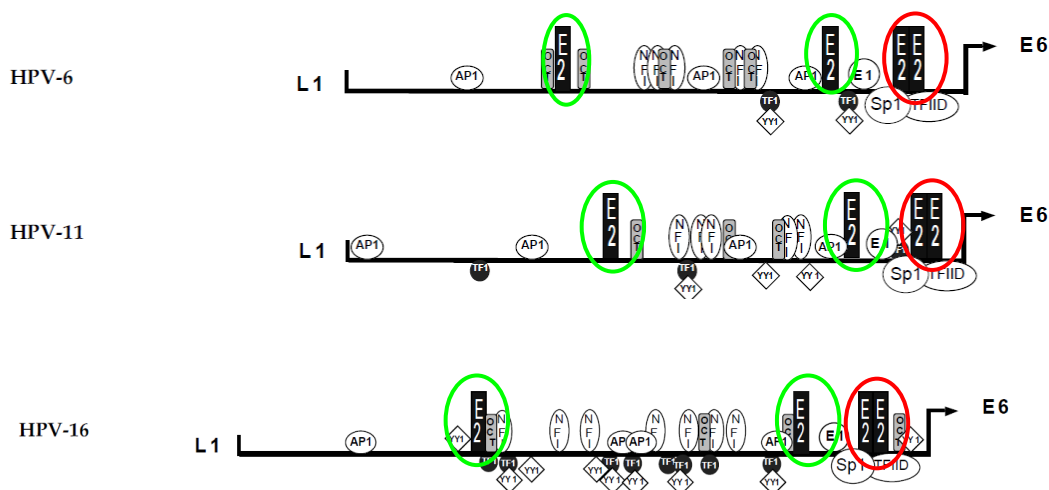
Az L1 fehérje körülbelül 55 kDa molekulatömegű, mely képes önállóan összeállni és ezáltal vírus-szerű részecskéket (virus-like particle, VLP) létrehozni. A fehérjének ezen képességét használják ki a kereskedelmi forgalomban is kapható vakcinák készítésénél. A HPV-k életciklusa során a kapszid konformációs változáson megy keresztül, amely lépés kulcsfontosságú a virális genom enkapszidációjához, fontos szerepe van a gazdák közötti átadás során a vírus túlélésében, az új gazdaszervezetek sejtjeihez való kötődésben, valamint az újonnan képződött vírusok sejtből való kiszabadulásában (Buck és mtsai., 2013).

Az L2 fehérje fontos szerepet tölt be a PV virionok összeszerelésében, illetve a fertőzési folyamatban. Az L2 kevesebb mint 500 aminosav hosszúságú, körülbelül 55 kDa molekulatömegű fehérje, egyes tanulmányok viszont 64-78 kDa közötti molekulatömegűnek mutatták; a méretkülönbség hátterében a fehérje poszttranszlációs módosítása állhat. Az L2 fehérje C-terminális régiójában található az L1 kötőhely; a homológ PxxP motívumok viszonylag konzerváltak L1-kötőhelynek bizonyultak az eltérő PV genotípusokban (Wang és Roden, 2013).

4.4 Hosszú szabályozó régió – long control region

A PV-ok hosszú szabályozó régiója (long control region, LCR) olyan genomi szakasz, mely nem kódol fehérjét, azonban a vírus replikációjának szabályozásában fontos szerepet tölt be, mivel számos celluláris transzkripciós faktor kötőhellyel, valamint a virális E1 és több E2 fehérje kötőhellyel rendelkezik. Hossza eltér az egyes PV genotípusok között, általában a genom 7-11%-át teszi ki; a genitális elváltozásokat okozó HPV-ok esetében nagyjából 850 bp hosszúságú. A cirkuláris vírus genomban az L1 és az E6 ORF-ek között helyezkedik el (O'Connor és mtsai., 1995).

Az általunk vizsgált két alacsony onkogén kockázatú HPV és a HPV16 E1, E2 és transzkripciós faktor kötőhelyeinek elhelyezkedését mutatja be a 7. ábra. A genitális HPV típusok LCR-ének 5' régiója körülbelül 300 bp hosszúságú, itt található az L1 régió stop kodonja és egy E2 kötőhely, továbbá ez a régió tartalmazza a transzkripció terminációs és poliadenilációs régiókat, valamint negatív szabályozó elemet is, mely a késői mRNS stabil szintjéért felelősek (O'Connor és mtsai., 1995).



7. ábra: A HPV6, HPV11 és HPV16 hosszú szabályozó régiójának (long control region, LCR) E2 és transzkripció faktor kötőhelyeinek megoszlása (O'Connor és mtsai., 1995)

Az LCR középső, körülbelül 400 bp hosszúságú szakasza két E2 kötőhely között helyezkedik el (7. ábra). A HPV11, HPV16 és HPV18 LCR vizsgálatai kimutatták, hogy ez a szakasz fokozza az epitélium specifikus transzkripciót. Számos transzkripció faktor kötőhely található itt. Az általunk vizsgált HPV típusok transzkripció faktor kötőhelyeinek számát az 1. táblázat foglalja össze (O'Connor és mtsai., 1995).

Az LCR-ben elhelyezkedő E2 kötőhelyek annak függvényében, hogy hol helyezkednek el, aktivátor illetve represszor funkciót tölthetnek be a virális gének transzkripciójának szabályozásában, úgymint az E6 és E7 onkoproteinek expressziójára. A korai promóterhez közeli két E2 kötőhely (7. ábrán pirossal jelölve) represszorként hat, míg a másik két E2 kötőhely, melyek távolabb helyezkednek el a korai transzkripció iniciációs startjától, transzkripció aktivátorként funkcionálnak (7. ábrán zölddel jelölve) (Muller és Demeret, 2012).

1. táblázat: A gyakori transzkripció faktor kötőhelyek száma a HPV6 és HPV11 hosszú szabályozó régiójában (O'Connor és mtsai., 1995).

HPV típus	E2	NFI	YYI	TEF-1	AP-1	Oct-1
HPV6	4	5	2	2	3	5*
HPV11	4	5	5	3	4	3*

* az egyik oktamer motívum az oct/NFI kompozit elem része

A régió 3' szakasza körülbelül 140 bp hosszúságú és két E2 kötőhelyet foglal magába, illetve itt található az E6 ORF promótere és itt helyezkedik el az E1 kötőhely is. Itt található a transzkripció starthelye, amely 5 bp-ra helyezkedik el az E6 start kodonjától (ATG), valamint körülbelül 90 bp-ra az E1 kötőhelytől. Ezeken kívül 90 bp-on belül egy SP1 transzkripció faktor kötőhely és a TATA boks lokalizálódik. Ez a két elem, valamint az itt lévő két E2 kötőhely szabályozza az E6/E7 promóter aktivitását a magas onkogén kockázatú HPV genotípusok esetében; ezzel szemben az alacsony onkogén kockázatú HPV genotípusok

esetében két eltérő promóterről indul az onkoproteinek expressziója (O'Connor és mtsai., 1995).

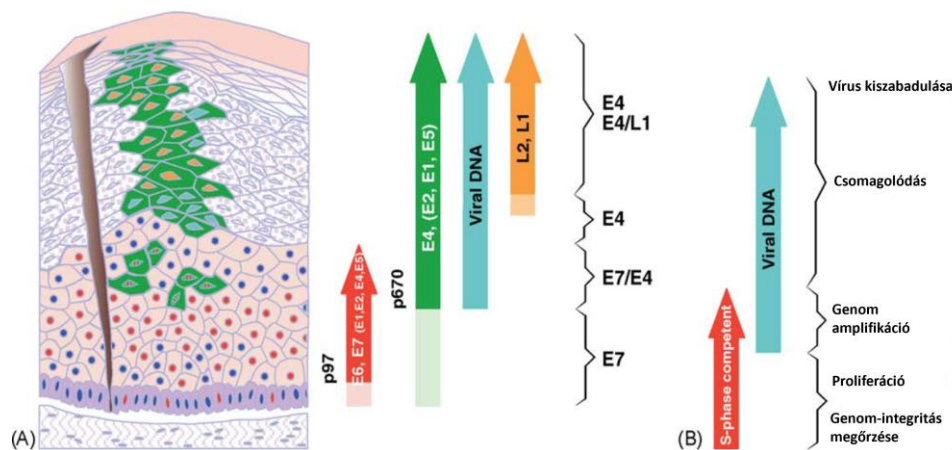
4.5 A humán papillomavírusok szaporodási ciklusa

Minden HPV genotípus a hámréteg sejtjeit fertőzi, azonban az alapján, hogy az elszarusodó vagy az el nem szarusodó hámot alkotó keratinociták fertőzésére képesek, két csoportba sorolhatjuk őket: nyálkahártya, illetve bőrelváltozásokat okozó HPV genotípusokat különböztethetünk meg (Doorbar és mtsai., 2012).

A HPV-k életciklusa szorosan kapcsolódik a keratinocita sejtek differenciálódási folyamatához, amely során az érett virionok megjelenése a terminálisan differenciálódott szuprabazális rétegben lévő sejtekre korlátozódik. A bőr hámrétegének sérülése következtében a bőr által biztosított mechanikai védelmi vonal megszakad és ez lehetőséget nyújt a HPV virionoknak, hogy hozzáférjenek a többrétegű laphámot határoló *membrana basalis* sejtjeihez; a fertőzött bazális sejtek osztódása a vírusgenom leánysejtekbe juttatását 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. $\alpha 6\beta 4$, integrin, annexin A2) való kapcsolódását. Ezt követi a vírus sejtbe jutása és az endoszomális vezikulumon keresztül történő internalizáció. Ha a HPV elérte a target sejtet, az L2 fehérje segíti a vírusgenom endoszomális eljutását a sejtmaghoz (Conway és Meyers, 2009; Wang és mtsai., 2020).

A HPV nem rendelkezik saját DNS polimerázzal, így kizárólag csak a gazdasejt DNS polimerázát felhasználva képes replikálódni, ugyanakkor az E1 és E2 korai vírus fehérjék, segítve a replikációs komplex kialakulását, hozzájárulnak a vírusszaporodás iniciálásához. Ezek a proteinek expresszálódnak először és úgy szabályozzák a gazdasejt életciklusát, hogy az S-fázisban maradjon és meginduljon a vírus replikáció folyamata. A három HPV onkoprotein (E5, E6 és E7) számos gazdasejt eredetű replikációért felelős faktorhoz képes kapcsolódni és ezáltal a sejtet az S-fázisba juttatni. Az E6 fehérje támogatja a p53 - hibajavítást és apoptózist szabályozó - fehérje ubikvitin-függő proteoszomális degradációját, valamint aktiválja a MYC expressziót és a telomerázt, ami a sejt túléléséhez és hosszabb életciklushoz vezet. Az E7 fehérje a hipofoszrolilált állapotban lévő pRB tumorszuppresszor

proteinhez képes kötődni, és ezáltal a pRB foszforilációját, és így a sejt életciklusának meghosszabbítását eredményezi, ami a vírus DNS szintéziséhez és folyamatos sejtproliferációhoz vezet. Az E6 és E7 fehérje módosítja az apoptózis szabályozását és a sejt életciklusát, ami a gazdasejt genom instabilitásához és esetlegesen malignus traszformációhoz vezethet. A transzmembrán E5 fehérje modulálja a sejt ion háztartását, a virionok termelődését, a vírus genom gazdasejtbe történő belépését. Emellett képes stimulálni az epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor, EGF) által mediált sejtproliferációt, gátolni az apoptotikus sejtpusztulást és számos jelátviteli útvonal modulálásában részt vesz. A késői fehérjék (L1 és L2) kifejeződése sejtdifferenciálódástól függő módon szabályozódik, de csak a már terminálisan differenciálódott laphámsejtekben expresszálódnak (Wang és mtsai., 2020) (8. ábra).



8. ábra: Humán papillomavírusok életciklusa (sematikus ábra) (Doorbar, 2005)

Ikegami és munkatársai (2021) laringeális papillomatózisokból kimutatott HPV6 és HPV11 fehérjéinek mRNS expressziós vizsgálata során kimutatták, hogy a korai fehérjék közül az E4, E5a és E5b mRNS expressziója a legmagasabb a középső és legfelső epitélium rétegekben, amely arra enged következtetni, hogy ezen fehérjék expressziója koordináltan történik, mindezzel segítve a virális replikációt, a vírus kiszabadulását, illetve az immunrendszer kikerülését (Ikegami és mtsai., 2021a; Ikegami és mtsai., 2021b).

4.6 Humán papillomavírusok által okozott megbetegedések

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* (CAC), 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 megbetegedéseket foglalja magába (Arney és Bennett, 2010; Burd és Dean, 2016; Doorbar és mtsai., 2015). A méhnyakrák a harmadik leggyakoribb daganatos elváltozás a nők körében világszerte. A fejlett országokban az előfordulása, illetve a mortalitás csökkenő tendenciát mutat az egyre szélesebb körben alkalmazott profilaktikus vakcináknak és a citológiai szűrőprogramoknak köszönhetően (Tsikouras és mtsai., 2016). Magyarországon a 2020-as adatok alapján 1251 új esetet azonosítottak és 482 halálozás történt (Global Cancer Observatory, <https://gco.iarc.fr>). A méhnyakrák az első daganatos megbetegedés, amely megelőzése céljából vakcinát fejlesztettek ki, ma már három kereskedelmi forgalomban kapható vakcina is segíti a kórkép primer prevencióját. Azonban továbbra is fontos a megfelelő szűrővizsgálatokon való részvétel, hiszen a vakcina önmagában nem elegendő a méhnyakrák kialakulásának megelőzése céljából (Tsikouras és mtsai., 2016).

4.6.1 Az alacsony onkogén kockázatú humán papillomavírus infekcióval asszociált anogenitális kórképek

4.6.1.1 Condyloma acuminatum

Az anogenitális HPV infekció a leggyakoribb szexuális úton terjedő fertőzés. A genitális papillomák leggyakoribb megjelenési formája a *condyloma acuminatum* (CAC), amely nők esetében elsősorban a méhnyak és a szeméremajak területén, míg a férfiaknál a pénisz és a végbélnyílás tájékán fordul elő (Larson és Derkay, 2010).

Molekuláris biológiai módszerekkel az esetek 90%-ban a HPV6 és HPV11 genotípust mutatták ki az elváltozásokból; a HPV6 a leggyakoribb kórokozó, a HPV11 genotípus az esetek negyedében fordult elő (Leonard és mtsai., 2014).

Vizsgálatok kimutatták, hogy a CAC kialakulásának számos rizikófaktora lehet, ilyen pl. a dohányzás, a hormonális fogamzásgátlók használata, a több szexuális partner, valamint a korán kezdett szexuális élet. A páciensek általában fájdalommentes kitüremkedésekről számolnak be, ritkábban viszketés, váladékozás, esetleg vérzés is előfordulhat. Terhesség vagy immunszuppresszió hatására az akár évekig látens formában jelen lévő HPV6 vagy HPV11 fertőzés (re)aktiválódhat és ennek eredményeként CAC alakulhat ki (Leonard és mtsai., 2014).

4.6.1.2 Leukoplakia penis

A *leukoplakia penis* (LP) rákmegelőző állapot, amely kialakulhat HPV-fertőzés következtében, rossz higiénés szokások miatt, de a dohányzás is rizikófaktornak számít. A péniszt érintő laphámsejtes karcinóma gyakran *leukoplakia* talaján alakul ki. A kialakulásának megelőzésében fontos a megfelelő személyi higiéné, a nemi betegségek elleni védekezés, valamint a HPV elleni profilaktikus vakcinázás is (Minhas és mtsai., 2010).

4.6.1.3 Ismeretlen jelentőségű atípiás laphámsejtek és enyhe fokú laphámsejtes intraepiteliális lézió

Az ismeretlen jelentőségű atípusos laphámsejtek (atypical squamous 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 utókövetéseket összefoglaló tanulmányok alapján az esetek 5,2%-8,7%-ából alakul ki HSIL.

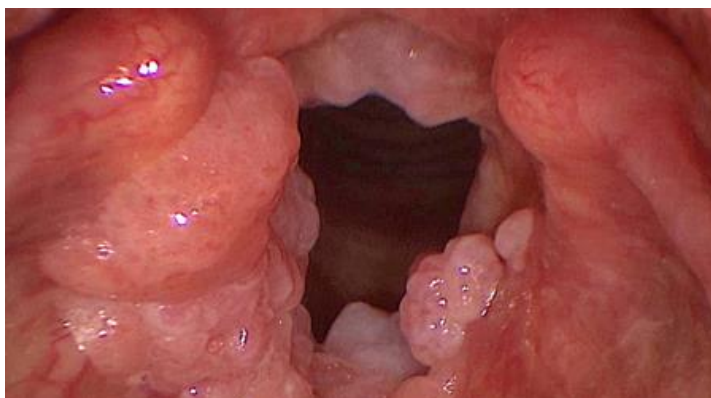
Különböző biomarker vizsgálatokat használva előre jelezhető az ASCUS/LSIL progressziója; például a p16 promóter hipermetilációja összefüggésbe hozható az egyes HPV-asszociált tumoros elváltozások kialakulásával. A cervikális intraepiteliális neopláziák 1 fokozatában (cervical intraepithelial neoplasia 1, CIN1) az esetek 17,6%-ában, a CIN2 esetek 42,1%-ában, míg CIN3-ban és invazív tumorokban 55,0% és 65,0%-ban fordul elő a p16 promótere hipermetilált állapotban (Lee és Lee, 2016).

4.6.2 Rekurrens légúti papillomatózis

A rekurrens légúti papillomatózis (recurrent respiratory papillomatosis, RRP) egy ritka, jóindulatú elváltozás (9. ábra), melynek kialakításában az alacsony onkogén kockázatú HPV6 és 11 genotípusok etiológiai szerepe már bizonyított. A papillómák a légzőrendszer nyálkahártyáján alakulnak ki és rosszindulatú elfajulásuk kockázata kevesebb, mint 1% (Ivancic és mtsai., 2018; Larson és Derkey, 2010).

Jelenleg a betegek kora alapján a 12 éves kor alatt diagnosztizált fiataalkori (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 (Derkey és Bluher, 2019; Larson és Derkey, 2010; Seedat, 2020). Más kutatócsoportok 14 éves kor alatt diagnosztizált papillómák esetében beszélnek fiataalkori, míg 14 éves fölött felnőttkori papillomatózisról (Xiao és mtsai., 2021). A JO-RRP-t legtöbbször 2-6 éves kor között diagnosztizálják (Seedat,

2020). Továbbá kimutatták, hogy a HPV11 az agresszívebb genotípus a kettő közül, és fiatal életkorban történő diagnózis esetén az általa okozott infekció súlyosabb lefolyású kórképpel járhat (Rabah és mtsai., 2001).



9. ábra: Rekurrens légúti papillomatózis (Forrás: <https://voicesurgeon.net/voice-disorders/recurrent-respiratory-papillomatosis-rp/>)

Az RRP előfordulásának gyakorisága eltér az egyes országok esetében. Kanadában 1994-2007 közötti időszakban a JO-RRP incidenciája 0,24 eset/100.000 lakos, míg a prevalenciája 1,11 eset/100.000 lakos volt (Campisi és mtsai., 2010). Egy Dániában végzett tanulmány szerint, amelyben a lakosság 50%-a vett részt, az RRP előfordulása 3,94 eset/100.000 lakos volt (Lindeberg és Elbrond, 1990). Az Amerikai Egyesült Államokban az RRP előfordulása gyerek populációban 4,3 eset/100.000 lakosnak, míg felnőtt populációban 1,8 eset/100.000 lakosnak bizonyult (Derkay, 1995).

Az RRP-ben a HPV átadásának módja valószínűleg befolyásolja a betegség kialakulásának időpontját. A JO-RRP kialakulása összefüggésbe hozható az anya aktív genitális HPV fertőzésével a szülés időpontjában; számos tanulmány igazolta a vertikális terjedés lehetőségét anyáról gyermekre (Larson és Derkay, 2010). Silverberg és munkatársai (2003) vizsgálatait azt mutatták, hogy azon gyermekeknél, akik aktív *condyloma acuminatum*-ban szenvedő anyától születtek, 231-szeresére nő az RRP kialakulásának valószínűsége, továbbá, az elhúzódó szülés (10 óra >) szintén kétszeresére növelte az RRP kialakulásának kockázatát (Silverberg és mtsai., 2003). Egyes tanulmányok azt mutatták, hogy az anya látens HPV fertőzése esetén alacsonyabb a transzmisszió kockázata, valamint megállapították, hogy a fertőzött újszülöttek több hónappal a szülés után is üríthetik a vírust (Tenti és mtsai., 1999). Azonban az, hogy a papillomatózis kialakul-e az újszülötteknél vagy sem, több tényező is befolyásolhatja; ilyen a páciens immunitása, a vírusürítés ideje, hossza és az ürített vírus mennyisége, valamint az esetleges helyi traumák (intubálás, nyelőcső reflux) (Shah és mtsai., 1998).

Az AO-RRP esetében a vírusfertőzés nagy valószínűséggel orális-genitális kontaktus révén valósul meg. Nagyobb valószínűséggel alakul ki a papillomatózis azoknál, akinek több szexuális partnerük van/volt és gyakoribb az orális szexuális kontaktus. Emellett az AO-RRP megjelenhet annak következtében, hogy egy esetleges születés során szerzett látens HPV fertőzés – akár évtizedek múltán is – (re)aktiválódik (Larson és Derkay, 2010).

4.7 Diagnosztika

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 target amplifikáció során felsokszorozódik a keresett génszekvencia DNS szakasza. A legjobban ismert technika az amplifikációs módszerek közül a polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction, PCR). A szignál amplifikációs technikák jelamplifikáción, illetve nukleinsav hibridizáción alapulnak. Vannak hagyományos, nem-amplifikáción alapuló módszerek is, melyek DNS detektálására is alkalmasak. Ilyen például az *in situ* hibridizáció, a dot blot, a Southern blot hibridizáció, azonban ezeket a rutin diagnosztikában manapság már nem használják, csak a kutatások során alkalmazzák (Arney és Bennett, 2010).

Az RRP helyes diagnosztizálásához elengedhetetlen az etiológiai szempontok, a klinikai jellemzők, valamint a bronchoszkópos és képalkotó eszközzel 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. A sebészi beavatkozásokat követően a szöveteket hisztopatológiai vizsgálatoknak vetik alá. A papillomatózis súlyosságának meghatározására az úgynevezett Derkay-Coltrera minősítő rendszert vezették be (Fortes és mtsai., 2017; Wilcox és mtsai., 2014).

A méhnyakrák diagnosztikája során elengedhetetlen a rendszeres citológiai szűrővizsgálat, amely során már a korai kóros elváltozásokat is detektálhatják, ezzel segítve a megfelelő terápiás lehetőség kiválasztását, illetve, a rákos állapot kialakulásának megelőzését. A citológiai vizsgálat során kimutatott kóros elváltozás esetében további vizsgálatok következnek; egyik ezek közül valamelyik a HPV DNS detektálására szolgáló molekuláris diagnosztikai módszer alkalmazása, míg a másik a specifikus biomarkerek (pl. p16/Ki67) vizsgálatán alapul (Gradissimo és Burk, 2017).

A HPV genotípusok által okozott különböző anogenitális és fej-nyaki régió jó- és rosszindulatú daganatos megbetegedéseinek diagnosztizálásához elengedhetetlen képalkotó

eljárások (CT- komputer tomográfia; PET-CT – pozitron emissziós tomográfia-komputer tomográfia; MRI – mágneses rezonancia képalkotás) alkalmazása, ezek segítségével mérhető fel pontosan az elváltozás kiterjedtsége, a környező szövetek érintettsége, a malignus kórképeknél a lokális és távoli áttétek jelenléte, illetve ezek az eljárások - elsősorban az MRI - lehetővé teszik az esetleges neoadjuváns kezelés hatékonyságának a monitorozását (Fortes és mtsai., 2017; Balcacer és mtsai., 2019).

4.8 Megelőzés és terápia

Jelenleg három, az USA Élelmiszer és Gyógyszerfelügyelete (Food and Drug Administration, FDA) által engedélyezett profilaktikus HPV vakcina érhető el kereskedelmi forgalomban. A bivalens Cervarix vakcina 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 leggyakoribb magas onkogén kockázatú genotípus mellett az RRP-ben és CAC-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 (Wang és mtsai., 2020). Az egyes profilaktikus vakcinák fontosabb tulajdonságait foglalja össze a 2. táblázat.

2. táblázat: A profilaktikus humán papillomavírus elleni vakcinák tulajdonságai (WHO, 2014; Petrosky és mtsai., 2015; Wang és mtsai., 2020; www.merck.com.)

<i>Jellemzők</i>	Bivalens	Tetravalens	Nonavalens
<i>Kereskedelmi neve</i>	Cervarix	Gardasil	Gardasil 9
<i>HPV típusok</i>	HPV16 és 18	HPV6, 11, 16 és 18	HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 és 58
<i>Adjuváns</i>	500 µg alumínium-hidroxid, 50 µg 3-O-dezacilezett-4-monofoszfóril-lipid A (MPLA)	225 µg alumínium-hidroxi-szulfát (ASO ₄)	500 µg alumínium-hidroxi-szulfát (ASO ₄)
<i>VLP dózis</i>	L1 dózis 20/20 µg	L1 dózis 20/40/40/20 µg	L1 dózis 30/40/60/40/20/20/20/20 µg
<i>VLP termelő rendszer</i>	Baculovírus expressziós rendszer	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Az oltások ütemezése</i>	9-25 év: 0., 6. hónap	9-26 év: 0, 6 hónap	9-45 év: 0., 2., 6. hónap
	14 év < 0., 1., 6. hónap	13 év < 0., 2., 6. hónap	

A kereskedelmi forgalomban kapható HPV vakcinák közül a tetravalens (Gardasil), valamint a nonavalens (Gardasil 9), melyek HPV6 és HPV11 genotípusok VLP-it is tartalmaznak, alkalmasak lehetnek az általuk okozott AO-RRP, valamint az anogenitális elváltozások kialakulásának megelőzésére (Nyirjesy és mtsai., 2020).

Számos kutatócsoport vizsgálta, hogy a RRP-ben szenvedő pácienseknél lehet-e terápiás haszna a tetravalens HPV vakcinának (Gardasil). Förster és munkatársai (2008) tanulmányában egy agresszív gége papillomatózisban szenvedő beteg állapota a vakcina

beadását követően sebészi beavatkozás nélkül stabilizálódott (Förster és mtsai., 2008). Murdy és munkatársai (2011) 17 hónappal a tetravalens vakcina beadását követően remissziót figyeltek meg egy betegnél (Murdy és mtsai., 2011). Egy magyar tanulmányban egy kétéves JO-RRP-ben szenvedő kisfiú esetén vizsgálták a vakcina hatékonyságát, aki addig már túl volt 11 sebészi beavatkozáson, melyekre 4-6 hetente került sor. A vakcina beadását követően a léziók eltűntek mind a gége, mind a nyelöcső területéről, valamint a 2 éves nyomon követési periódus alatt recidívát nem mutattak ki (Meszner és mtsai., 2015). Hocevar-Boltezar és munkatársai (2014) arról számoltak be, hogy a vakcina beadását követően az RRP-s betegeknél növekedett az idő intervallum az egyes sebészi beavatkozások között, valamint csökkent a beavatkozások száma (Hocevar-Boltezar és mtsai., 2014).

Az RRP kezelésére jelenleg nincs 100%-osan hatásos gyógymód; a kezelés főként a légutak szabadon tartására és a hangszalagok épségének megőrzésére fókuszál. A terápiás lehetőségeket két nagy csoportra oszthatjuk: vannak a sebészi beavatkozások és a különböző adjuváns terápiák (Ivancic és mtsai., 2018).

A papillómák sebészeti eltávolítása során a különböző lézerek, valamint a mikrodebriderek használata vált elterjedté. A lézeres sebészeti beavatkozások előnye a jobb vérzéscsillapító hatásuk, azonban alkalmazásuk nagyobb szakértelmet igényel, valamint az eszközök karbantartási és fenntartási költségei is nagyobbak. Fontos azonban, hogy a lézeres kezelést ugyanazon a szöveti területen tartósan nem ajánlatos használni, mert a tartós alkalmazás súlyos szöveti károsodáshoz vezethet. Több lézertípus közül lehet választani, vannak pl. CO₂ lézerek, fotoangiolitikus lézerek. A mikrodebriderek használata hamar elterjedt, miután a lézereknél gyorsabban és nagyobb biztonsággal távolítják el a nagyobb méretű elváltozásokat. Gyakori a két módszer kombinált alkalmazása; először eltávolítják a mikrodebriderekkel a papillóma nagy részét, majd lézerrel csillapítják a vérzést (Ivancic és mtsai., 2018).

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 bevacizumab, a celecoxib, az acyclovir, a ribavirin és az indol-3-karbinol hatását vizsgálták az RRP terápiás lehetőségeként (Ivancic és mtsai., 2018). Az adjuváns terápiában használt szereket és azok jellemzőit a 3. táblázat foglalja össze.

Munkacsoportunk korábban szintén vizsgálta egy HPV11-asszociált agresszív JO-RRP-ben szenvedő páciens esetében az off-label szerként használható cidofovir hatását a klinikai tünetekre és a HPV11 kópiaszámára a betegség lefolyása során. A szer hatékonyságának monitorozása során a HPV11 kópiaszámának csökkenése volt megfigyelhető a teljes remisszió eléréséig, de a terápia lezárását követően a vírus kópiaszáma ismét emelkedni

kezdett és a kezelés előtti szintre tért vissza, ugyanakkor bár a klinikai tünetek visszatértek, azok jelentős mérséklődése volt megfigyelhető a követés időszakában (Major és mtsai., 2008).

A CAC leggyakoribb kezelési formái fájdalmasak és nem specifikusak; a tünetet kezelik, nem a vírusfertőzést. Két típusba sorolhatjuk a *condyloma* terápiás lehetőségeit: amikor valamilyen kemotoxikus szert vagy immunmodulátor terápiát alkalmaznak; a másik lehetőség, amikor valamilyen beavatkozást végzünk pl. krioterápia, elektrokauter vagy lézer használata, vagy egyéb műtéti beavatkozások (Leonard és mtsai., 2014).

3. táblázat: RRP terápiában használt adjuváns szerek jellemzői (Ivancic és mtsai., 2018 közleménye alapján)

Adjuváns	Hatásmechanizmus	Betegszám	Eredmény	Következtetés	Referencia
Interferon-alfa	Az interferon-alfa leukocitákból különböző ingerek (pl. vírusfertőzés) hatására szabadul fel. Antivirális hatásmechanizmusa pontosan ismert. Az interferonok génexpressziós szinten aktiválják az immunrendszert, valamint a fertőzés környezetében lévő sejtek védekező mechanizmusait.	100 <	Egy tanulmányban 117/160 esetben az recidívák száma jelentősen csökkent. Egy másik vizsgálatban a kezelés következtében az első 6 hónapban a papillómák növekedési üteme csökkent, azonban a második hat hónapban már nem volt jelentősége a kezelésnek. Peg-IFN-alfa 2a és GM-CSF kombinációját alkalmazva 11/11 AO-RRP esetben nem jelentkezett újabb relapszus.	Hatékonyasága az RRP kezelésében vitatott, melyet az eredmények is alátámasztanak.	Healy és mtsai., 1988; Nodarse-Cuni és mtsai., 2004; Suter-Montano és mtsai., 2013
Cidofovir	Citozin analóg, mely a virális DNS polimeráz szelektív gátlószere és az örökítőanyagba beépülve gátolja a vírus DNS replikációját. Hatásmechanizmusát a HPV-vel szemben - tekintettel arra, hogy az nem rendelkezik saját DNS polimerázzal - még nem ismerjük.	> 100	Hét tanulmány esetében komplett remissziót figyeltek meg a betegeknél, egy vizsgálatban pedig minden páciensnél csökkent az RRP Derkay-skála szerinti a súlyossága.	A cidofovir jó terápiás lehetőség lehet helyi és szisztémás hatékonysága miatt, valamint sebészi beavatkozással kombinálva növelhető a remisszió esélye.	Snoeck és mtsai.,1998; Bielamowicz és mtsai., 2002; Akst és mtsai., 2003; Lee és mtsai., 2004; Naiman és mtsai., 2003, 2006a, 2006b; Coulombeau és mtsai., 2002
Bevacizumab	Rekombináns monoklonális humanizált ellenanyag, mely blokkolja az angiogenezist (gátolja a VEGF-A-t). Általában 532 nm-es kálium-titanil-foszfát lézeres kezeléssel együtt alkalmazzák.	> 90	A tanulmányok eredményeit összegezve, minden esetben csökkent a papillomák Derkay-skála szerinti súlyossága.	A kálium-titanil-foszfát lézer és a bevacizumab együttes használata hatékonynak bizonyult az RRP kezelésében, minimális komplikációkkal.	Best és mtsai., 2012; Maturo és Hartnick, 2010; Rahbar és mtsai., 2005; Rogers és mtsai., 2013; Sidell és mtsai., 2014; Zeitels és mtsai, 2011
Celecoxib-2	Szelektív nem szteroid gyulladáscsökkentő.	Egy felnőtt, nincs pontos adat	Celecoxib és erlotinib együttes alkalmazását követően 3 hónappal nem volt jele recidívának.		Limsukon és mtsai., 2009
Ribavirin	Antivirális szer, főként gyerekeknél RSV okozta tüdőgyulladás, valamint agresszív RRP kezelésénél használják.	Négy beteg (1 gyermek és 3 felnőtt)	Két felnőtt esetében minimálisan csökkent a recidívák száma, egy felnőtt és a gyermek esetében pedig a műtétek közötti időintervallum növekedését tapasztalták.	Hatékony lehet lézeres műtétek során alkalmazott adjuvánsként, azonban a hatékonyság értékeléséhez további klinikai vizsgálatok szükségesek.	McGlennen és mtsai., 1993

Indol-3-karbinol	Az RRP léziók fokozott ösztrogén kötődést mutatnak. Egér kísérletekben kimutatták, hogy az indol-3-karbinol gátolta az ösztrogén anyagcserét és ezáltal 75%-kal csökkent a HPV-indukált papillómák tumorra alakulásának gyakorisága.	33 beteg (9 gyerek, 24 felnőtt)	11 esetben a papillómák növekedése abbamaradt és nem volt szükség műtéti beavatkozásra, 10 esetben csökkent a papillómák növekedési üteme, 12 esetben nem tapasztaltak semmilyen hatást	Műtétek során alkalmazható, mint adjuváns, de további szigorúan ellenőrzött vizsgálatokra van szükség a tényleges hatékonyság megállapítására.	Newfield és mtsai., 1993; Rosen és Bryson, 2004
------------------	--	---------------------------------	---	--	---

RRP – rekurrens légúti papillomatózis (recurrent respiratory papillomatosis); JO-RRP – juvenilis légúti papillomatózis (juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis), AO-RRP – felnőttkori légúti papillomatózis (adult onset recurrent respiratory papillomatosis); peg-IFN-2a – pegilált (polietilén-glikollal konjugált) interferon alfa 2a (Pegylated-interferon-alpha-2a); VEGF-A – humán vaszkuláris növekedési faktor A (human vascular growth factor-A); RSV – Respiratory Syncytial vírus (Respiratory Syncytial virus); GM-CSF-granulocita-monocita-kolónia stimuláló faktor (Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor)

4.9 Humán papillomavírus 6 és 11 intratípusos varianciája

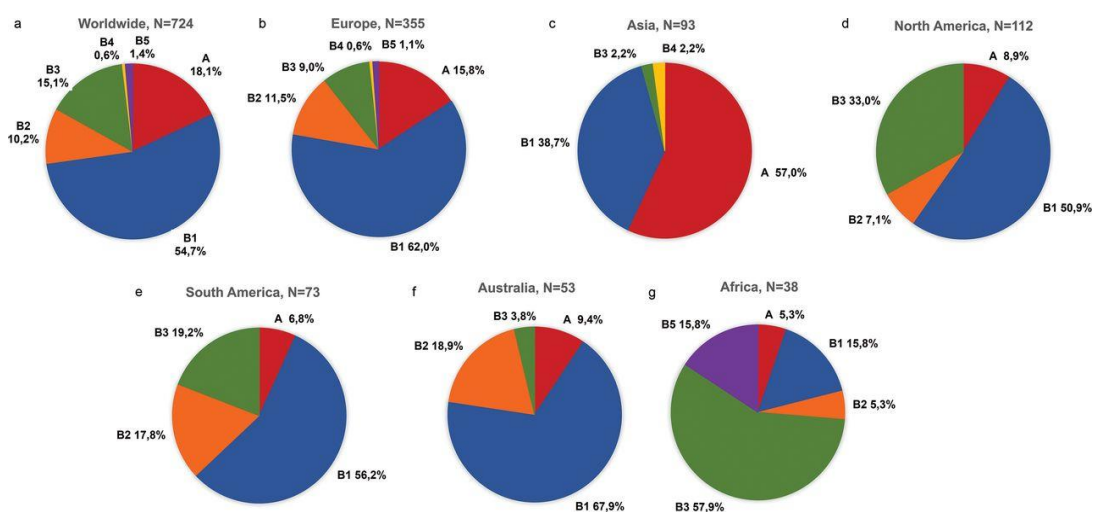
A HPV6 és 11 genotípusok az *Alphapapillomavirus* nemzetség *Alpha* 10 típusfajába sorolhatóak, nyálkahártya-tropizmust mutatnak, alacsony onkogén kockázatú PV-ok. Mindkét típus esetében vizsgálták az intratípusos variancia jelenlétét.

A HPV11 genotípus teljes genomjának szekvenciáját először 1986-ban Dartmann és munkatársai határozták meg, mely azóta is HPV11 referencia genomként szolgál (génbanki azonosító: M14119) (Dartmann és mtsai., 1986). Munkacsoportunk vizsgálta 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 fehérjét kódoló régió variabilitása szerepet játszhat az eltérő súlyosságú kórképek kialakulásában (Gáll és mtsai., 2013). A génbankban található HPV11 szekvenciák filogenetikai analízise során korábban két nagy filogenetikai vonalat (A1 és A2) azonosítottak (Burk és mtsai., 2011; Maver és mtsai., 2011).

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 5 alcsoportot különítettek el (Burk és mtsai., 2011).

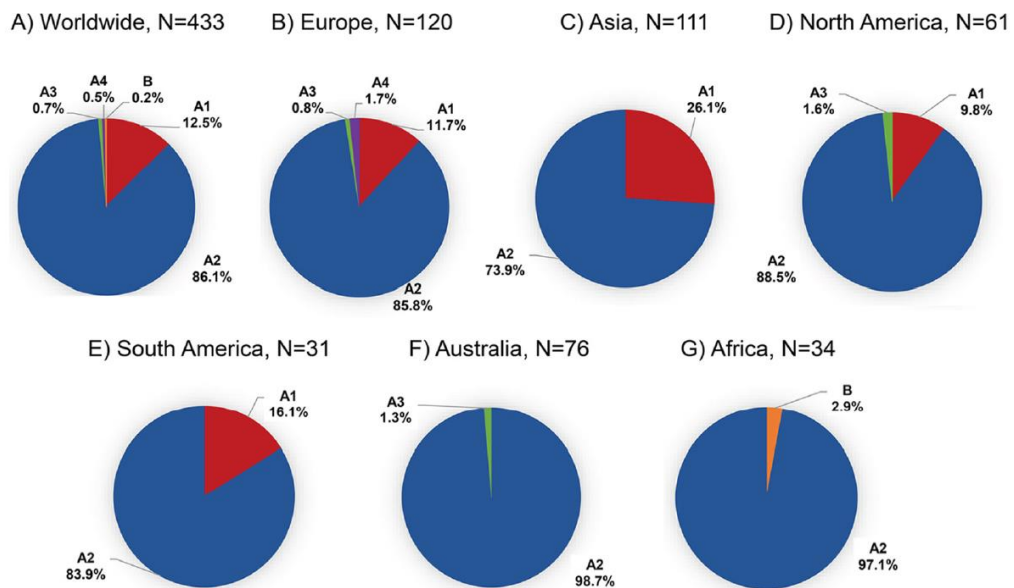
Jelen és munkatársai 2014-ben a HPV6 esetében végeztek variáns analízist, míg a HPV11 kapcsán 2016-ban született egy tanulmányuk. A HPV6 esetében 724 mintát és 190 teljes genomszekvenciát vizsgáltak. A 724 minta közül 530 esetben detektáltak HPV6 pozitivitást, melyek közül 130 minta esetében találtak legalább egy nukleotid polimorfizmust. A nukleotid polimorfizmusokat vizsgálva legkonzervatívabb régiónak az E7 ORF bizonyult, míg a legvariábilisabbnak az E5b ORF. A szekvenciákban összesen 471 nukleotid polimorfizmust azonosítottak, melyek közül 165 okozott aminosavcserét. Az aminosavcserék tekintetében a legvariábilisabbnak szintén az E5b ORF bizonyult, a legkonzervatívabb az E6 ORF volt. A filogenetikai analízis során megerősítették Burk és munkatársai (2011) által korábban meghatározott két fő vonal meglétét (A és B klaszter), valamint az öt B alcsoport jelenlétét is (Burk és mtsai., 2011). Az A klaszterbe tartozik a HPV6b szubtípus, a B1 alcsoportba a HPV6vc, a B3 alcsoportba pedig a HPV6a szubtípus. Vizsgálták továbbá, hogy az egyes fő- illetve alcsoportoknak van-e földrajzi eloszlásbeli különbsége. Az elemzésüket a 10. ábra mutatja be, mely alapján látható, hogy a B klaszterbe tartozó HPV6 genomvariánsok globálisan előfordulnak, főleg a B1 alcsoportba tartozók. A B2 alcsoport Ázsiát kivéve minden kontinensen jelen van, míg Afrikában, Észak- és Dél-Amerikában szignifikánsan gyakrabban észlelték a B3 alcsoport jelenlétét. A B4 alcsoportba tartozó szekvenciákat Európában és Ázsiában, a B5 alcsoportba tartozókat pedig csak Afrikában és Európában

azonosították. Az A vonalat szintén minden kontinensen azonosították, de szignifikánsan gyakrabban fordult elő Ázsiában (Jelen és mtsai., 2014).



10. ábra: Humán papillomavírus 6 variánsok globális és kontinens szintű elterjedése (Jelen és mtsai., 2014)

Jelen és munkatársai 2016-os tanulmányukban a HPV11 földrajzi elterjedésének vizsgálatához összesen 433 HPV11 szekvenciát használtak föl. A teljes genomok filogenetikai elemzéséhez 78 HPV11 genomot használtak, melyek közül 30 az új tanulmányból származó, 48 pedig már a génbankban található szekvencia volt. Az analízis során a korábban említett filogenetikai besorolást átalakították és két fő vonalat különítettek el: az A és B klasztert, az A klaszteren belül pedig további négy alcsoportba sorolták a szekvenciákat (A1-A4). A referencia HPV11 szekvencia (génbanki azonosító: M14119) az A1 alcsoportba tartozik, az A2 alcsoportba tartoznak azok a HPV11 variánsok, melyek CAC86 (génbanki azonosító: FN907962) genomvariánshoz állnak közel. Az A2 alcsoportba összesen 68 genom tartozott, az A1 alcsoportba 6 darab, míg az újonnan leírt al-, illetve főcsoportokba (A3, A4 és B) 2, 1 és 1 genom illeszkedett. A földrajzi eloszlást tekintve, az A2 alcsoport világszerte megjelenik (373/433), majd ezt követi az A1 alcsoport (54/433). Az A3 alcsoportot (3/433) csak Ausztráliában, Észak-Amerikában, illetve Európában mutatták ki, az A4 alcsoportot (2/433) egyedül Európában, míg végül a B főcsoportot, melybe egyetlen szekvenciát soroltak, egyedül Afrika területén sikerült detektálni (11. ábra). A HPV11 intratípusos diverzitása és a globális migrációs mintázat közötti kapcsolatot vizsgálva, nem találtak korrelációt, szemben a magas onkogén kockázatú HPV16 és HPV18 genotípusokkal (Jelen és mtsai., 2016).



11. ábra: Humán papillomavírus 11 variánsok globális és kontinens szintű elterjedése (Jelen és mtsai., 2016)

5. Célkitűzések

Míg a magas onkogén kockázatú HPV genotípusok esetében az intratípusos variancia és az általuk okozott megbetegedések – elsősorban a méhnyakrák – kórlefolyása közötti összefüggés széles körben tanulmányozott és ismert, addig az alacsony onkogenitású vírus típusok esetében kevés adat áll rendelkezésre a genomi variabilitásuk és a megbetegedések súlyosságának összefüggéseiről. Bár a génbankban egyre több teljes genom szekvencia hozzáférhető az alacsony onkogén kockázatú HPV6 és HPV11 esetében, a különböző súlyosságú kórképek és a virológiai státusz közötti összefüggések vizsgálatát nehezíti, hogy kevés releváns klinikai adat áll rendelkezésünkre a szekvenciák kapcsán. Jelenlegi tanulmányunk keretein belül - munkacsoportunk korábbi vizsgálatait folytatva – célunk a további adatok gyűjtése a vírusgenetikai tényezők és a kialakult elváltozás súlyossága közötti kapcsolat feltárására az alacsony onkogén kockázatú genotípusok esetében is, melyek segíthetnek a páciensek hatékony, akár személyre-szabott, kezelésének kidolgozásában.

A kutatásunk során az alábbi célokat tűztük ki:

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. HPV11 esetében fehérje modellezés segítségével vizsgáljuk, hogy az aminosav-cserék hogyan befolyásolhatják az E2 vírusfehérje funkcióját.
3. HPV11 esetében irányított mutagenezissel 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.

6. Anyagok és módszerek

6.1 *Betegek adatai*

Munkacsoportunk az elmúlt húsz év alatt 34 rekurrens légúti papillomatózisban szenvedő páciens mintáit vizsgálta (papillómákból származó szövetminták, valamint egészséges nyálkahártya területéről vett exfoliatív sejtminták), melyek közül kilenc páciens mintáiban azonosított HPV6 és tizenhárom beteg mintáiban azonosított HPV11 esetében volt lehetőség a vírusgenomok teljes genom szekvenciájának vizsgálatára. Öt minta esetében nem detektáltunk HPV-specifikus szekvenciát, ezen minták mind felnőttkori papillomatózisból származtak. Három HPV6 és négy HPV11 pozitív esetben vagy a vírusok alacsony kópiaszáma vagy pedig a kis mennyiségű klinikai minta nem tette lehetővé a teljes genom analízis elvégzését. A már korábban vizsgált HPV11 pozitív 5-ös és a 6-os páciens esetében lehetőségünk volt új recidívákból származó szövetminták, valamint a szájnálkahártyáról származó exfoliált sejtek HPV státuszának vizsgálatára is. A Mellékletek 14.2. és 14.3. melléklete foglalja össze az RRP páciensek részletes adatait (nem, diagnózis kora, lokalizáció, beavatkozások száma, történt-e tracheosztómia, extralaringeális terjedés és adjuváns terápia). A HPV11 pozitív páciensek esetében a táblázatban a munkacsoport által korábban vizsgált (Gáll és mtsai., 2013) és az új betegek adatait is feltüntettük.

A légúti papillomatózisban szenvedő betegek mellett lehetőségünk volt genitális megbetegedésekben szenvedő páciensek mintáinak a feldolgozására is; vizsgálhattuk a HPV6 és 11 teljes genom szekvenciáját CAC-ból, cervikális atípiákból és egy *leukoplakia penis*-ből származó mintában is; ezek közül négy mintában HPV6-ot, kettőben pedig HPV11-et azonosítottunk (Mellékletek 14.2. és 14.3. melléklet). A tanulmány megkapta az intézményi etikai bizottság jóváhagyását (engedélyezési száma: 4169-2014).

6.2 *Nukleinsav izolálása és a vírusok jelenlétének kimutatása*

A szövetek, illetve az exfoliált sejt mintákból a nukleinsav izolálás az InnuPrep Viral DNA/RNA Kit-tel (Analytic Jena, Jena, Németország) történt, a gyártó ajánlása szerint. Az exfoliált sejt minták esetében a minta előkészítése során az 1 ml PBS (foszfát pufferelt sóoldat; phosphate-buffered saline) transzport közegben lévő sejteket lecentrifugáltuk (5000 g, 10 perc, szobahő), majd a pelletet 200 µl PBS-ben szuszpendáltuk; a további lépések a gyártó utasításai szerint történtek.

A DNS extrakciót követően 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 reakcióelegy egy mintára vonatkoztatva a következőket tartalmazta 20 µl végtérfogatban: 0,1-0,3 µg templát DNS, 1x töménységű

DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, USA), 12,5-12,5 pmól PC03 (5'-ACACAAGTGTGTTCACTAGC-3') és PC04 primer (5'-CAACTTCATCCACGTTCACC-3'), valamint desztillált víz. A PCR paramétereit a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat: A β -globin PCR hőmérsékleti profilja

Hőmérséklet	Időtartam	Fázis	Ciklusszám
94°C	2 perc	denaturáció	1
94°C	0,5 perc	denaturáció	35
55°C	0,5 perc	anelláció	
72°C	1 perc	extenzió	
72°C	2 perc	végző extenzió	1

A HPV-specifikus szekvenciák kimutatása MY/GP nested PCR-rel történt. Az MY PCR során a primerek a HPV-k L1 ORF-ében amplifikálnak egy körülbelül 450 bázispárnyi szakaszt. A reakcióelegy egy mintára vonatkoztatva 25 μ l végtérfogóban a következőket tartalmazta: 0,1-0,3 μ g templát DNS, 1x töménységű DreamTaq Green Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, USA), 25-25 pmól MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') és MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') primer, valamint desztillált víz. Az PCR lépéseit a 5. táblázat mutatja be.

5. táblázat: Az MY PCR hőmérsékleti profilja

Hőmérséklet	Időtartam	Fázis	Ciklusszám
95°C	2 perc	denaturáció	1
96°C	20 mp	denaturáció	40
55°C	5 mp	anelláció	
52°C	15 mp	anelláció	
72°C	1 perc	extenzió	
72°C	2 perc	végző extenzió	1

Az MY PCR érzékenysége körülbelül 1000 HPV DNS kópia/reakcióelegy, így ez a primerpár önmagában nem elég érzékeny az alacsonyabb kópiaszámú jelen lévő vírusgenomok kimutatására. A GP5+/GP6+ PCR során a primerpár az MY PCR amplimerén belül amplifikál egy körülbelül 150 bp hosszúságú szakaszt és ezáltal a reakció érzékenységét 2-5 kópia vírusgenomnyira növeli. A reakcióelegy egy mintára vonatkoztatva 25 μ l végtérfogóban: 2 μ l mennyiségű MY PCR-ből származó templát, 1x töménységű DreamTaq Green Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, USA), 25-25 pmól GP5+ (5'-TTTGTACTGTGGTAGATACTAC-3') és GP6+ (5'-GAAAAATAAAGTGTAAATCATATTC-3') primer, valamint desztillált víz. A PCR lépéseit az 6. táblázat foglalja össze.

6. táblázat: A GP+/6+ PCR hőmérsékleti profilja

Hőmérséklet	Időtartam	Fázis	Ciklusszám
94°C	2 perc	denaturáció	1
94°C	1 perc	denaturáció	35
48°C	1,5 perc	anelláció	
72°C	1,5 perc	extenzió	
72°C	4 perc	végző extenzió	1

A PCR-eket követően az amplimerek jelenlétét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (1% agaróz gél [SeaKem LE Agarose, Lonza, Rockland, USA], 120 V, 45 perc).

A HPV genotípusok meghatározása restrikciós fragmenthossz polimorfizmus analízissel (restriction fragment length polymorphism, RFLP) történt, mely során hat restrikciós endonukleázzal (AluI, BamHI, DdeI, HaeIII, HinfI és PstI; Promega, Madison, USA) az MY PCR során kapott amplimereket külön-külön reakcióelegyekben emésztettük 3 órán keresztül, 37°C-on. A reakcióelegy a következőket tartalmazta 20 µl végtérfogatra vonatkoztatva: 10 µl amplimer, 1x töménységű restrikciós enzim puffer, 4 U restrikciós enzim, valamint desztillált víz. Ezután a PCR termékeket agaróz gélben 100 V feszültség mellett 90 percen keresztül elektroforetizáltuk és az így kapott futási mintázatot értékeltük; a genotípusok azonosítása a Kónya és munkatársai által kidolgozott kódrendszer alapján történt (Kónya és mtsai., 2000).

6.3 Teljes genom amplifikáció és egyedi nukleotid polimorfizmusok meghatározása

A genotípusok meghatározása után a munkacsoport által tervezett primerekkel teljes genom amplifikációt végeztünk. A reakcióelegy tartalma 25 µl végtérfogatban a következő volt: 0,1-0,3 µg templát DNS, 1x töménységű Phusion High-Fidelity reakció puffer (Thermo Scientific, Waltham, USA), 25-25 pmól szensz és antiszensz primer, 0,5 U Phusion High-Fidelity DNS polimeráz (Thermo Scientific, Waltham, USA), valamint desztillált víz. A primerek szekvenciáit és a reakciók anellációs hőmérsékletét a Mellékletek 14.4. és 14.5. melléklete, az amplifikáció során használt hőmérsékleti profilokat a 7. és 8. táblázat tartalmazza.

7. táblázat: HPV11 szekvenciák genomi régiójának amplifikációs paraméterei

Hőmérséklet	Időtartam	Fázis	Ciklusszám
98°C	1 perc	denaturáció	1
98°C	15 mp	denaturáció	35
Változó	15 mp	anelláció	
72°C	30 mp	extenzió	
72°C	2 perc	végző extenzió	1

8. táblázat: HPV6 szekvenciák genomi régiójának amplifikációs paraméterei

Hőmérséklet	Időtartam	Fázis	Ciklusszám
98°C	1 perc	denaturáció	1
98°C	30 mp	denaturáció	40
Változó	30 mp	anelláció	
72°C	1 perc	extenzió	
72°C	2 perc	végso extenzió	1

A PCR-t követően az amplimereket 1%-os alacsony olvadáspontú preparatív agaróz gélben (SeaPlaque Agarose, Lonza, Rockland, USA) elektroforetizáltuk 60-90 percig, 90V-100V feszültség mellett, majd a megfelelő termékeket gélből tisztítottuk QIAquick Gel Extraction Kit segítségével (Qiagen, Hilden, Németország), a gyártó utasításait követve. A tisztított mintákat agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (1% agaróz gél [SeaKem LE Agarose, Lonza, Rockland, USA], 120 V, 45 perc). Ezt követően a genomi régiókat lefedő, két független PCR-ből származó amplimereket mindkét irányból szekvenáltattuk (Macrogen, Amsterdam, Hollandia). A teljes genomok szekvenálása „primer walking” módszerrel történt, az egyes amplitonok vége átfednek egymással.

A teljes genomok összeállítását, a referencia genomokhoz történő illesztését és a szekvencia adatok elemzését a CLC Main Workbench 7.9.1 szoftverrel (Qiagen, Aarhus, Dánia) végeztük. A referencia genomokat és génbanki azonosítójukat a Mellékletek 14.6. melléklete tartalmazza.

A teljes genom analízis során meghatároztuk az egyes HPV6 variánsok és a HPV11 genotípus konszenzus szekvenciái, amelyhez - hasonlóan a filogenetikai analízishez – az azonos HPV6 és HPV11 szekvenciák közül csak egy szekvenciát szerepeltettünk, elkerülve ezzel a különböző szekvenciák eltérő előfordulási gyakoriságából adódó nukleotid gyakoriságokban is megmutatkozó eltolódásokat. Az analízis szintén a CLC Main Workbench 7.9.1 szoftver használatával történt. Az azonos filogenetikai csoportban tartozó szekvencia haplotípusok kiválasztását követően, azokat illesztettük és meghatároztuk a konszenzus szekvenciákat. A teljes genom analízisek során megvizsgáltuk az aminosav eltéréseket is, az aminosav kódokat a Mellékletek 14.1. melléklete tartalmazza.

6.4 Filogenetikai analízis

A génbankban található, összesen 197 HPV6 és 88 HPV11 teljes genom szekvenciát (magába foglalja a munkacsoport által korábban vizsgált hat szekvenciát; Gáll és mtsai., 2013), 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

(Qiagen, Aarhus, Dánia) használtuk, az elemzéshez neighbour-joining módszert, 1000-szeres bootstrapping-et állítottunk be. Outgroup-ként a HPV6 szekvenciák filogenetikai elemzéséhez a HPV11 referencia szekvenciát (génbanki azonosító: M14119), a HPV11 esetében pedig a HPV6A1 (korábban HPV6b) referencia szekvenciát (génbanki azonosító: X00203) (Schwarz és mtsai., 1983) használtuk. A filogenetikai analízis vizsgálatok során a scale bar értéke a következő volt: a HPV6 filogenetikai vizsgálatok során a scale bar értéke 0,005; míg a HPV11 filogenetikai vizsgálata során 0,020 értéket mutatott (amely a genetikai távolságot jelöli a nukleotid szubsztitúciók száma/hely alapján).

A filogenetikai analízisekhez használt génbankban található HPV6 és HPV11 teljes genom szekvenciák adatait a 14.7. mellékletben foglaltuk össze.

6.5 Transzkripció faktor kötőhelyek vizsgálata HPV6 genotípus esetében

A feltételezett transzkripció faktor kötőhelyek meghatározása során maximális 10%-os szekvencia különbséget engedélyeztünk, a kötőhelyek keresését a PROMO szoftver segítségével az ALGGEN szerveren végeztük (Farré és mtsai., 2003). Az egyes LCR-ekben a feltételezett transzkripció faktor kötőhelyek elvesztését vagy megjelenését az adott csoport referencia szekvenciájához viszonyítottuk.

6.6 HPV11 E2 fehérjéjének *in silico* modellezése

Az egyedi nukleotid mutációk meghatározását követően vizsgáltuk, hogy az egyes ORF-ek esetében mely nukleotid eltérések 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 virális replikáció szabályozásában, valamint képes kötődni a vírus hosszú szabályozó régiójával, mely kölcsönhatásra funkcionális vizsgálataink is kiterjedtek.

A referencia HPV11 szekvencia (génbanki azonosító M14119) (Dartmann és mtsai., 1986) 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 kristály szerkezetet (PDB azonosító: 1R6K, felbontás 2,5 Å) a szintén elérhető HPV16 E2 fehérje dimer transzaktivációs doménjének kristályszerkezetével (PDB azonosító: 1DTO, felbontás 1.9 Å) az UCSF Chimera szoftvert használva (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>; Pettersen és mtsai., 2004), majd a modellt szerkezetileg optimalizáltuk. A HPV11 DNS-kötő

domén (DBD) homológ modelljének előállítását a HPV6 B3 alcsoport E2 DBD-DNS komplex kristályszerkezete (PDB azonosító: 2AYG, felbontás 3.1 Å) alapján a SWISS-MODEL szerver (<https://swissmodel.expasy.org>; Waterhouse és mtsai., 2018) segítségével történt. A DNS komplementert a HPV11 E2 DBD-hez a SCF BIO DNA Sequence to Structure Tool webszerverrel terveztük (<http://www.scfbio-iitd.res.in>; Arnott és mtsai., 1976). A HPV11 E2 DBD variánsaihoz a komplementer DNS-t a NPDock szerverrel dokkoltuk (Tuszynska és mtsai., 2015); a fehérje és DNS felület kapcsolódása korlátozott a konzervált DNS-kötő helyek miatt, melyet korábban leírt Rogers és munkatársai (2011), valamint McBride (2013). Végezetül a hinge-régió (193-270 aminosav közötti régió) *de novo* modellezése az I-Tasser szerver (zhanglab.ccmb.med.umich.edu; Yang és Zhang, 2015) 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 fehérje felszíni töltésváltozásait, a lehetséges foszforilációs helyek elvesztését és megjelenését, valamint az aminosavak közötti interakciókat a fehérjeláncon belül, illetve természetes ligandjukkal. Emellett az Autodock Vina (Trott és Olson, 2010), valamint a PreDBA szerver (<http://predba.denglab.org>; Yang és Deng, 2020) használatával megbecsültük és összehasonlítottuk a szabad entalpia változásokat. A ligand kölcsönhatásokat a LigPlot+ szerverrel elemeztük (Laskowski és Swindells, 2011), a modellek végső ábrázolásához pedig az UCSF Chimera X szoftvert (Pettersen és mtsai., 2021) használtuk. Végezetül a fehérje modell geometriáját a SAVES Ramachandran Plot használatával hitelesítettük (servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/Ramachandran; Colovos és Yeates, 1993) és a modelleket feltöltöttük a Protein Model Adatbázisba (<http://srv00.recas.ba.infn.it/PMDB/>, PMDB azonosító: PM0083528; Castrignano és mtsai., 2006).

A lehetséges foszforilációs helyeket az E2 fehérje variánsokban a NetPhos 3.1. szerver segítségével vizsgáltuk (Blom és mtsai., 2004).

A fehérje modellek elkészítésében Dr. Pethő Zoltán volt segítségemre.

6.7 Klónozási folyamatok

Az egyedi HPV11 és HPV6 LCR szekvenciákat pALuc riporter vektorban klónoztuk, melyhez a teljes LCR szekvenciákat a restriktációs endonukleáz hasítási helyeket is tartalmazó primerekkel amplifikáltuk. A reakcióelegy egy mintára vonatkozó végtérfogata 25 µl volt, mely az alábbiakat tartalmazta: 1 µl templát DNS, 1x töménységű PCR puffer, 25-25 pmól

BamHI és KpnI primer (a primerek tulajdonságait a 9. táblázat tartalmazza), 200-200 μ M dNTP, 0,3 μ l Phusion High-Fidelity DNS polimeráz (2U/ μ l) (Thermo Scientific, Waltham, USA), illetve kiegészítésként desztillált víz. Az LCR PCR-ek hőmérsékleti profilját a 10. és 11. táblázat tartalmazza.

A referencia és az egyedi E2 szekvenciákat CMV promótert tartalmazó pCDNA3.1+ emlős expressziós vektorba klónoztuk a KpnI és az XbaI restrikciós hasítási helyekre. A klónozó primerek tulajdonságait a 9. táblázat tartalmazza, a PCR hőmérsékleti profilját pedig a 12. táblázat foglalja össze. A PCR reakcióelegy összetétele megegyezett az LCR PCR során leírt elegy összetételével.

9. táblázat: Klónozó primerek (az egyes restrikciós enzimek hasítóhelye félkövéren szedve)

Primer neve	Lokalizáció	Primer szekvencia	Anelláció
HPV6 LCR BamHI	7171-7191	5'-ccgggatccgcaagttttgttataaaagt-3'	50°C
HPV6 LCR KpnI	148-168	5'-gccggtaccatagattaaacgtcttgac-3'	50°C
HPV11 LCR BamHI	7155-7175	5'-ccgggatccgtaagttttattgcaaagt-3'	50°C
HPV11 LCR KpnI	148-168	5'-gccggtaccaaagattaaacgtcttgac-3'	50°C
HPV11 E2 KpnI	2597-2614	5'- gccggtaccttccaaatccattcccct -3'	50°C
HPV11 E2 XbaI	3867-3884	5'- gcctctagaggcactacctccatacac -3'	50°C

10. táblázat: HPV6 LCR klónozó PCR hőmérsékleti profilja

Hőmérséklet	Időtartam	Fázis	Ciklusszám
98°C	3 perc	denaturáció	1
98°C	30 mp	denaturáció	40
50°C	30 mp	anelláció	
72°C	30 mp	extenzió	
72°C	5 perc	végző extenzió	1

11. táblázat: HPV11 LCR klónozó PCR hőmérsékleti profilja

Hőmérséklet	Időtartam	Fázis	Ciklusszám
98°C	3 perc	denaturáció	1
98°C	30 mp	denaturáció	40
50°C	1 perc	anelláció	
72°C	1 perc	extenzió	
72°C	5 perc	végző extenzió	1

12. táblázat: HPV11 E2 klónozó PCR hőmérsékleti profilja

Hőmérséklet	Időtartam	Fázis	Ciklusszám
98°C	3 perc	denaturáció	1
98°C	30 mp	denaturáció	40
50°C	30 mp	anelláció	
72°C	30 mp	extenzió	
72°C	5 perc	végző extenzió	1

Ezt követően a különböző klónozási folyamatok lépési megegyeztek. Az amplimereket gélből Gel Extraction Kit-tel (Qiagen, Aarhus, Denmark) tisztítottuk a gyártó utasításai szerint, majd megfelelő restrikciós enzimekkel (LCR szekvenciákat BamHI és KpnI, az E2

szekvenciákat KpnI és XbaI) (Promega, Madison, WI, USA) 6 órán át, 37 °C-on emésztették. Az emésztés ellenőrzése (agaróz gélelektorforézissel, 1% gélen, 90 perc, 90 V feszültség) után a ligálást T4 ligázzal (Thermo Scientific, Waltham, USA) végeztük 30 percen át szobahőmérsékleten, majd ezt követően a reakcióelegyet 65°C-on inkubáltuk a ligáz inaktiválásának céljából. A kész konstruktokat *Escherichia coli* XL-1 baktériumtörzsbe transzformáltuk Transformaid Bacterial Transformation Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA) használatával, a gyártó utasításai szerint.

A klónokat ezután Zymo Pure Plasmid Mini Prep Kit (Zymo Research, Irvine, USA) segítségével a gyártó utasításai szerint tisztítottuk, majd a tisztított plazmidokat restrikciós emésztéssel (LCR: BamHI és KpnI, E2: KpnI és XbaI; Thermo Scientific, Waltham, USA) ellenőriztük. A megfelelő klónokból nagyobb mennyiséget tisztítottunk a PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA) segítségével a gyártó utasításait követve. Az így kapott variáns klónokat szekvenálással ellenőriztük (Macrogen, Amsterdam, Hollandia).

6.8 Irányított mutagenézis

Munkacsoportunk a HPV11 LCR szekvenciákban korábban azonosított mutációkon és nukleotid polimorfizmusokon kívül egyetlen új mutációt azonosított (9-es páciens szövetmintáiból kimutatott HPV11 szekvenciában, T7331G). A mutáció hatását az LCR transzkripciót aktiváló hatására irányított mutagenézissel vizsgáltuk. Ehhez a nukleotid cserét tartalmazó szensz és antiszensz primerpár (5'-GTAGTGTGTATATGTGTCTTGTATTGTGTATATG – 3' és 5' – CATATACACAATACAAGACACATATACACACTAC – 3', a mutagenizált nukleotidot aláhúzással jelöltük) segítségével amplifikáltuk a teljes hosszúságú, referencia LCR-t tartalmazó pALuc riportert tartalmazó plazmidot, beépítve ezzel az LCR-be a nukleotidcserét. A mutagenézishez 15 ng plazmidot használtunk templákként, az amplifikációt a Velocity DNS polimeráz enzimmal (Bioline, London, UK) végeztük a gyártó utasításai szerint. A reakcióelegy 0,4-0,4 µM szensz és antiszensz primert, 1x gyári összeállítású enzimspecifikus puffert, 250-250 µM dNTP-t, 3%-os DMSO-t és 1 U DNS polimerázt, valamint 15 ng templát DNS-t tartalmazott. Az amplifikációt követően a termékeket 20 U DpnI enzimmal (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 37°C-on egy éjszakán át emésztettük. A DpnI metiláció szenzitív restrikciós enzim, mely képes felismerni és hasítani a metilált adenint tartalmazó, eredeti DNS szálát, míg a PCR során amplifikált, a mutációt már hordozó új plazmidot nem hasítja; ezzel tudjuk kiválasztani és amplifikálni a mutagenizált szálát.

A transzformálástól a transzfekcióig történő lépéseket előző fejezet tartalmazza. A kész konstruktot szekvenálással ellenőriztük (Macrogen, Amsterdam, Hollandia)

13. táblázat: Az irányított mutagenézis PCR hőmérsékleti profilja

Hőmérséklet	Időtartam	Fázis	Ciklusszám
98°C	3 perc	denaturáció	1
98°C	30 mp	denaturáció	20
61°C	40 mp	anelláció	
72°C	3 perc	extenzió	
72°C	7 perc	végző extenzió	1

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

Transzfekciós és kotranszfekciós kísérleteket HEp-2 (ATCC szám: CCL-23) gége karcinómából származó sejtvonalon végeztük. A HEp-2 sejteket 10% magzati borjú savót (fetal bovin serum, FBS) tartalmazó DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) médiumban, 37°C-on, 5% CO₂ tenzió mellett tenyésztettük. A sejtek tranziens transzfekcióját Lipofectamine 2000 reagenssel (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) végeztük, a gyártó utasításai szerint. A transzfekciók során 2 µg, a referencia és az egyedi LCR-eket hordozó pALuc riporter vektort, 2 µg referencia és az egyedi E2 ORF-eket hordozó pCDNA 3.1+ emlős expressziós vektort, valamint 1 µg RSV-β-Gal plazmidot használtuk. A sejteket transzfekciót követően 48 óra múlva Reporter Lysis Buffer-rel (Promega, Madison, WI, USA) kezeltük, majd fagyasztásos-olvasztásos módszerrel lizáltuk. A luciferáz aktivitás méréshez a Lucifase Assay System rendszert (Promega, Madison, WI, USA) használtuk, a gyártó utasításai szerint. A luciferáz teszt standardizálásához β-galaktozidáz tesztet használtunk, kromogén szubsztrátként 1 mg/ml OMPG (*ortho*-nitrofenil-β-galaktozid) hozzáadva a sejtlyázathoz. A teszt normalizálása protein koncentrációra történt, amelyet Bradford reagenssel, 620 nm hullámhosszon történő méréssel határoztunk meg. Minden transzfekciós kísérletet legalább három független ismétlésben végeztünk, a kísérletekből származó luciferáz-aktivitást ANOVA (Turkey's utóteszt) teszttel hasonlítottuk össze, megfelelő Bonferroni -korrekciót alkalmazva (PaSt2.17c; Hammer és mtsai., 2001).

7. Eredmények

7.1 Teljes genom szekvenciák elemzése és filogenetikai besorolásuk

7.1.1 A HPV6 teljes genom szekvenciák vizsgálatának eredményei

A szekvencia analízis során ugyanazon betegek különböző recidíváiból (AO-RRP1/6, AO-RRP3/6, AO-RRP5/6, JO-RRP1/6 és a JO-RRP2/6) kimutatott HPV6 szekvenciák identikusnak bizonyultak. A 13 teljes genom szekvencia közül három (AO-RRP2/6, AO-RRP3/6, AO-RRP4/6) a HPV6 A klaszterbe (korábban HPV6b), 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 alcsoportba (korábban HPV6vc), egy (ASCUS1/6) pedig a B2 alcsoportba sorolható a szekvencia analízis alapján. A mintáink között B3 (korábban HPV6a), B4 és B5 alcsoportba tartozó szekvenciát nem azonosítottunk. A HPV6 filogenetikai analízise során kapott dendrogramot a Mellékletek 14.8. melléklete mutatja be.

A HPV6 A klaszter és a B1 alcsoport esetében az azonosított szekvenciák mérete megegyezett a referencia genomok méretével (7902 bp és 8012 bp), ezzel szemben a B2 alcsoportba tartozó szekvenciában azonosítottunk egy 19 bázispár hosszúságú deléciót, mely megtalálható további 19 génbanki, B2 alcsoportba tartozó teljes genomban is. A 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. Az A klaszterbe tartozó HPV6 szekvenciákban azonosított nukleotid eltéréseket a 14., a B1 és B2 alcsoportba tartozó szekvenciákban azonosított nukleotid cseréket a 15. és 16. táblázat tartalmazza.

HPV6A vonal esetén a referencia és a konszenzus szekvencia 13 nukleotid pozícióban tért el egymástól, ezeken felül egy 94 bp inzerció volt jelen a konszenzus szekvencia LCR-ében (7250 és 7251 nukleotid pozíció között), ami viszont nem fordul elő sem a referencia szekvenciában (génbanki azonosító: NC_001355), sem pedig a saját szekvenciáinkban. A deléció a génbankban megtalálható HPV6A szekvenciák közül de Oliveira és munkatársai által 2017-ben született brazil tanulmányában leírt három cervikális mintából kimutatott HPV6 szekvenciában detektálható (génbanki azonosítók: KX514423, KX514427, KX514429; (de Oliveira és mtsai., 2017)). Ezzel szemben a B1 alvonal referencia és konszenzus szekvenciája csak egyetlen nukleotid pozícióban tért el egymástól. A B2 alvonal vizsgálata során hat nukleotid pozícióban azonosítottunk különbséget a referencia és a konszenzus szekvencia között.

Az A filogenetikai vonalban 25 nukleotid mutációt azonosítottunk a referencia genomhoz (génbanki azonosító: AF092932) történő illesztés követően; a mutációk 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 aminosav cserét, mindkettő az AO-RRP4/6 páciens mintájának E5a régiójában lokalizálódik (14. táblázat).

14. táblázat: A HPV6A (korábban HPV6b) klaszterbe tartozó teljes genom szekvenciákban azonosított nukleotid mutációk

ORF	Nt pozíció	Referencia (NC_001355)	Konszenzus	AO-RRP2/6	AO-RRP3/6 ¹	AO-RRP4/6	Aminosav változás Megjegyzés
E6 (nt 102-554)	221	A	T	T	T	T	nem
	473	G	A	A	A	A	nem
E1 (nt 832-2781)	1554	G	A	A	A	A	nem
	1926	G	A	A	A	A	nem
	1938	C	C	T			nem
	2518	C	C			T	nem
	2709	T	A	A	A	A	nem
E5a (nt 3887-4162)	4003	G	G			C	E39D
	4118	C	C			T	P78S
Nem kódoló szekvencia	4308	A	A		G		
L2 (nt 4423-5802)	4731	T	C	C	C	C	nem
	4740	T	T			C	nem
	4755	G	G	T	A	T	nem
	5406	G	A	A	A	A	nem
	5637	T	T		G		nem
L1 (nt 5789-7291)	6073	A	A			G	nem
	6166	T	T		G		nem
	6598	A	T	T	T	T	nem
	7099	G	A	A	A	A	nem
LCR ² (nt 7292-7902, 1-101)	7373	G	T	T	T	T	feltételezett FOXP3 kötőhely elvesztése, új feltételezett GR-β kötőhely megjelenése
	7585	A	C	C	C	C	feltételezett C/EBP-β, GR-β kötőhely elvesztése, új feltételezett LEF-1, SRY kötőhely megjelenése
	7653	G	G	C	C	C	feltételezett C/EBP-β kötőhely elvesztése; új feltételezett GR-β, C/EBP-α kötőhely megjelenése
	7654	C	A	A	A	A	feltételezett C/EBP-β, NF-κötőhely elvesztése; új feltételezett GR-β kötőhely megjelenése
	7815	G	G	C		C	feltételezett C/EBP-β kötőhely megjelenése
	7860	G	A	A	A	A	közvetlenül a virális E2 regulátor kötőhelye mellett; új feltételezett C/EBP-β kötőhely megjelenése

ORF nyitott leolvasási keret (open reading frame); E korai (early); L késői (late); LCR hosszú szabályozó régió (long control region); nt nukleotid; AO-RRP felnőttkori rekurrens légúti papillomatózis (adult onset recurrent respiratory papillomatosis)

¹Több minta vizsgálata

²Konszenzus HPV6 A (Az A fővonal tartalmaz egy 94 bázispár hosszúságú inzerciót az 7250 és 7251 nukleotid pozíció között).

15. táblázat: A HPV6B1 (korábban HPV6vc) alcsoportba tartozó teljes genom szekvenciákban azonosított nukleotid mutációk

ORF	Nt pozíció	Referencia (AF092932)	Konszenzus	JO-RRP1/6 ¹	JO-RRP2/6 ¹	AO-RRP1/6 ¹	AO-RRP5/6 ¹	AO-RRP6/6	AO-RRP7/6	CAC1/6	LSIL1/6	LP1/6	Aminosav változás Megjegyzés
E6 (nt 103-555)	399	C	C	T									nem
	507	T	T				C						nem
E1 (nt 832-2781)	1831	T	T		G								nem
	2146	A	A						C				
	2170	T	T			C	C	C			C	C	nem
	2278	T	T		G								nem
E2 (nt 2724-3830) E4 (nt 3256-3585)	2814	C	C	T									nem
	3070	C	C			A							T116N
	3153	T	T		A								S144T E2-ben
	3459	T	T	G									S246A E2-ben S68R E4-ben
	3743	G	G				C						E340D E2-ben
E5a (nt 3887-4162)	4100	T	T	C									nem
	4101	T	T	C	C				C	C			nem
Nem-kódoló régió	4385	A	A				C						
L2 (nt 4424-5803)	4441	C	C					T					nem
	4786	T	T							C			nem
	5546	A	A							G			T375A
L1 (nt 5790-7292)	5930	T	T		G								nem
	6065	A	A							G			nem
	6323	T	T	C									nem
	6444	T	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	Y219D
	7112	T	T							G			F441L
	7134	A	A	G									K449E
LCR (nt 7293-8012, 1-102)	7332	A	A		C								
	7342	A	A							G			
	7909	T	T							G			C/EBP-β és GR feltételezett kötőhelye

ORF nyitott leolvasási keret (open reading frame); E korai (early); L késői (late); LCR hosszú szabályozó régió (long control region); nt nukleotid; JO-RRP fiatalkori rekurrens légúti papillomatózis (juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis), AO-RRP felnőttkori rekurrens légúti papillomatózis (adult onset recurrent respiratory papillomatosis); CAC condyloma acuminatum; LSIL enyhe fokú laphámsejtes intraepiteliális lézió (low grade squamous intraepithelial lesion); LP: leukoplakia penis; ¹Több recidívából kimutatott HPV6 genomot is vizsgáltunk.

16. táblázat: A HPV6B2 alcsoportba tartozó teljes genom szekvenciában azonosított nukleotid mutációk

ORF	Nt pozíció	Referencia (FR751328)	Konszenzus	ASCUS1/6	Aminosav változás Megjegyzés
E1 (nt 833-2782)	1072	A	G	A	nem
	2407	C	A	A	nem
E5a (nt 3888-4163)	4159	C	A	A	nem
L2 (nt 4424-5803)	4892	C	A	A	H157N
L1 (nt 5790-7292)	5978	A	A	T	nem
LCR (nt 7293-8031, nt 1-102)	7368-7386			19 bp hosszú deléción*	C/EBP- β , FOXP3, PR A, PR B feltételezett kötőhely elvesztése
	7623	G	T	T	GR feltételezett kötőhely elvesztése
	7645	T	T	C	HOXD9, HOXD10 feltételezett kötőhely elvesztése; GR- β , TFIID esetében feltételezett kötőhely elvesztése

ORF nyitott leolvasási keret (open reading frame); E korai (early); L késői (late); LCR hosszú szabályozó régió (long control region); nt nukleotid; ASCUS ismeretlen jelentőségű atípiás sejtek (atypical squamous cells of undetermined significance); *ATGTGTGTTGTATATATGT

A HPV6B1 alvonalon összesen 26, a B2 alvonalon pedig 8 nukleotidcserét azonosítottunk. A HPV6B1 alvonál esetében a fiatalkori papillomatózisból és CAC-ból kimutatott szekvenciák esetében magasabb volt a genom variabilitása, mint a felnőttkori papillomatózisokból származó szekvenciák esetében (0,87-1,00 vs. 0,25-0,62 mutáció/1000 bp). A B1 alvonál 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-ben három aminosavcserét detektáltunk. Az összes aminosav eltérés egyedi volt, kivéve az L1 fehérjében lévő Y219D-t (T6444G), amely minden általunk vizsgált B1 alvonalba tartozó szekvenciában megtalálható. Így, míg az A vonal esetében csak egyetlen szekvencia különbözött fehérje szinten is a referenciától, addig a B1 alvonál minden szekvenciájában legalább egy SNP aminosav változást eredményezett a referencia genomhoz képest (15. táblázat).

A B2 alvonalba sorolt egyetlen szekvencia az E1, E5a, L1 és L2 ORF-ek, valamint az LCR esetében különbözött a referencia genomtól és csak egyetlen SNP okozott aminosav eltérést az L2 ORF területén (16. táblázat).

7.1.2 A HPV11 teljes genom szekvenciák vizsgálatának eredményei

Az 5-ös beteg (JO-RRP5/11) új recidívájából kimutatott HPV11 szekvencia identikus a munkacsoport által korábban meghatározott szekvenciával (génbanki azonosító: HE574702) (Gáll és mtsai., 2013). A 6-os páciens (JO-RRP6/11) esetében a 2015-ben és 2016-ban

kialakult recidívák, valamint egészséges nyálkahártya felszínéről származó exfoliatív sejt mintákból származó HPV11 szekvenciák szintén megegyeznek a korábban vizsgált genomokkal (génbanki azonosító: FR872717) (Gáll és mtsai., 2011; Gáll és mtsai., 2013). A JO-RRP8/11, illetve a JO-RRP9/11 esetében is több minta vizsgálatára volt lehetőség, az ezekben kimutatott HPV11 szekvenciák is identikusak voltak. A JO-RRP7/11 páciensről három lokalizációból (szupraglottis, szubglottis és sztóma) érkezett szövetminta; 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.

Az újonnan vizsgálatba vont HPV11 pozitív páciensek (7-15. betegek) mintáiban kimutatott teljes genomok szekvencia analízise során 19 új nukleotidcserét azonosítottunk, melyek közül 17 egyedinek bizonyult (17. táblázat). Ezek közül egy (T4380G) található az E5b és L2 ORF közötti nem kódoló régióban (nt 4371-4416); valamint egyet (T7331G) azonosítottunk az LCR területén. A kódoló régióban detektált 17 új mutáció közül hét eredményezett aminosavcserét az egyes fehérjekódoló régiókban (E1, E2/E4, E5a és L2 ORF). Az AO-RRP1/11-es páciens mintájából származó HPV11 genomban egy 58 bp hosszúságú deléciót azonosítottunk az E2/E4 ORF területén, amely leolvasási kereteltolódást és korai stop kodon kialakulását eredményezte. A csonka E2 fehérje 266 aminosav hosszúságú szemben a 367 aminosav hosszúságú referencia E2 fehérjével (<https://pave.niaid.nih.gov>), amely csonka dimerizációs és DNS-kötő doménnel rendelkezik, valamint a leolvasási kereteltolódás több aminosavcserét is eredményezett. A deléció érinti az E4 ORF-et is, ami a prolin-gazdag régió, valamint a komplett E1^{E4} fúziós fehérje pozitív töltésű régiójának eltűnését eredményezi.

Munkacsoportunk és más munkacsoportok korábban két szekvenálási hibát is leírtak a génbankban található HPV11 referencia genomban (génbanki azonosító: M14119; Dartmann és mtsai., 1986) (Gáll és mtsai., 2013; Heinzl és mtsai., 1995). A referencia HPV11 szekvenciát hordozó plazmid több független ismétlésben végzett újbóli szekvenálása igazolta, hogy a génbanki referencia szekvenciával szemben referencia HPV11 genomot hordozó plazmid E1 ORF-ében az 1783-1784 nukleotid pozícióban nem citozin és guanin, hanem guanin és citozin található. A második szekvenálási hiba az LCR-ben található és hasonlóan az E1 ORF-hez két egymás mellett álló nukleotid pozíciót érint; a 7719-7720 pozícióban egy GC inzerció azonosítható.

A HPV11 szekvencia analízis során kapott eredményeit foglalja össze a 17. táblázat, a filogenetikai analízise során kapott dendrogramot a Mellékletek 14.9. melléklete mutatja be.

A CA/11-es páciens mintájából származó genom a filogenetikai analízis alapján a referencia genommal egy klaszterbe tartozik (A1 alcsoport), míg a többi általunk vizsgált HPV11 szekvencia az A2 alcsoportba sorolható. A JO-RRP6/11, valamint a JO-RRP7/11 (Gáll és mtsai., 2013) a súlyosabb kórlefolyású esetekből azonosított genomokkal csoportosul az A2 alcsoporton belül.

Az E1 fehérje esetében három egyedi aminosavcserét azonosítottunk, melyből kettő a fehérje N-terminális *in vivo* regulációért felelős régiójában található eltérés (A72E-JO-RRP4/11 [Gáll és mtsai., 2013], valamint N100T-JO-RRP9/11). Ugyancsak egyedi mutáció az 1870. nukleotid pozícióban jelenlévő A-T csere eredményeként létrejövő I347F aminosavcsere az E1 protein oligomerizációs doménjének területén a JO-RRP10/11 beteg mintájában. Mivel a fehérje szerkezeti modellje hiányos, így ezen eltérések modellezése nem volt lehetséges.

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 megállapítottuk, hogy az arginin erősebb másodlagos kötést hoz létre a szomszédos monomerben lévő 322. pozícióban lévő triptofánnal, a 323. pozícióban lévő fenil-alaninnal, valamint a 327. helyen lévő izoleucinnal. Ezzel szemben az alanin nem alakít ki interakciót a szomszédos aminosavakkal.

Az E5a fehérjét kódoló régióban három aminosavcserét eredményező polimorfizmust azonosítottunk, melyek közül kettőt már korábban leírt a munkacsoport (I28F és V41L; Gáll és mtsai., 2013) 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 eltérést szintén a fehérje első két transzmembrán régiója között lokalizálódik.

Az E6 ORF-ben aminosavcserét eredményező nukleotidcserét nem azonosítottunk. Az E7 ORF-ben egyetlen aminosavcserét (A45S) eredményező eltérést 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). Az E5a és az E7 ORF-ben azonosított aminosav eltéréseket ismert teljes 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 a CA/11 szekvencia

kivételével minden általunk vizsgálat korábbi (Gáll és mtsai., 2013) és új HPV11 szekvenciában megtalálható. 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). A C6607T aminosavcserét ugyancsak nem eredményező mutáció, melyet a JO-RRP7/11 beteg mintájából mutattuk ki. Munkacsoportunk korábban leírt két aminosavcserét (A476V, S486F) eredményező mutációt (7197T és C7227T) a fő kapszidproteint kódoló L1 ORF-ben; az eltéréseket egyetlen beteg (JO-RRP2/11) szövetmintáiból tudtuk kimutatni (génbanki azonosító: HE574702) (Gáll és mtsai., 2013). 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 mutáció hiányzik L1 ORF-ből.

L2 ORF-ben azonosított aminosavcsere (E35D) a fehérje N-terminális régiójában elhelyezkedő aktin-kötő doménben lokalizálódik (Wang és Roden, 2013) és csak a CA/11 mintában található. A kizárólag az AO-RRP2/11 beteg mintájában kimutatott nukleotid eltérés (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) (Wang és Roden, 2013). Az L1 és L2 ORF-ben azonosított aminosav eltérések *in silico* fehérje modellezése, illetve funkcionális vizsgálata folyamatban van.

Az E2 *in silico* protein modellezési eredményeit a funkcionális vizsgálat eredményeivel együtt a „HPV11 E2 korai vírusfehérjék modellezése és az E2 protein funkcionális vizsgálata” alfejezetben mutatom be.

17. táblázat: A HPV11 szekvenciákban azonosított nukleotid mutációk

ORF	Nt pozíció	Referencia (M14119)	JO-RRP2/11*	JO-RRP7/11	JO-RRP8/11*	JO-RRP9/11*	JO-RRP10/11	AO-RRP1/11	AO-RRP2/11	AO-RRP3/11	CAC/11	CA/11	Aminosav változás/megjegyzés
E6 (nt 102-554)	137	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	nem
	323	T										C	nem
	380	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T		nem
E7 (nt 530-826)	662	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T		A45S
E1 (nt 832-2781)	1107	A	C		C		C	C	C	C	C		nem
	1130	A				C							N100T
	1623	T				C							nem
	1713	A	T						T				nem
	1870	A					T						I347F
	2358	C	T		T		T	T	T	T	T		nem
	2580	A		G	G	G	G	G	G	G	G		nem
E2 (nt 2723-3826) E4 (nt 3255-3581)	2884	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T		nem
	2888	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C		nem
	3211	A		G									nem
	3381												
	3391	A	G		G		G	deléció	G	G	G		E2-ben nem Q46R E4-ben
	3436	G	A	A	A	A	A		A	A	A		E2-ben nem G61E E4-ben
	3438												
	3456	C				T							S245F E2-ben P68S E4-ben (P50S E1^E4 fúziós fehérjében)
	3462	A				C							N247T E2-ben T70P E4-ben (T52P E1^E4 fúziós fehérjében)
	3487	C	T	T	T	T	T	T (a deléció miatt már nem eredményez kereteltolódást)	T	T	T		E2-ben nem okoz S78L E4-ben (S60L E1^E4 fúzió fehérjében)
	3626	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C		nem
	3645	A	G	G	G	G	G	G (a deléció miatt már nem eredményez kereteltolódást)	G	G	G		K308R E2-ben
	3727	A		C									nem
Nem-kódoló régió	3832	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G		nem kódoló
E5A	3952	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T		I28F

(nt 3871-4146)	3985	G							A				D39N
	3991	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C		V41L
	4142	A				C							nem
Nem-kódoló régió	4380	T				G							nem kódoló
L2 (nt 4417-5784)	4521	A										C	E35D
	4569	T								G			nem
	4602	T		A									nem
	4647	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T		nem
	4887	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	nem
	5437	G							T				E341*
L1 (nt 5771-7276)	6028	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T		nem
	6484	T			C			G				C	nem
	6607	C		T									nem
LCR (nt 7277-7933, 1-101)	7331	T				G							
	7413	A	C		C		C	C	C	C	C		
	7479	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T		
	7509	T	deléció	deléció	deléció	deléció	deléció	deléció	deléció	deléció	deléció	deléció	
	7547	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C		
	7584	-	C inzerció	C inzerció	C inzerció		C inzerció	C inzerció	C inzerció	C inzerció	C inzerció	C inzerció	feltételezett USF and Sp-1 kötő-hely

ORF: nyitott leolvasási keret (open reading frame); E: korai (early); L: késői (late); LCR: hosszú szabályozó régió (long control region); nt nukleotid; JO-RRP: fiatalkori rekurrens légúti papillomatózis (juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis), AO-RRP: felnőttkori rekurrens légúti papillomatózis (adult onset recurrent respiratory papillomatosis); CAC condyloma acuminatum; CA cervikális atípiá

*Több recidívából származó HPV11 genomot is vizsgáltunk.

7.2 A hosszú szabályozó régió (LCR) funkcionális vizsgálata

7.2.1 A HPV6 LCR funkcionális vizsgálatának eredményei

A HPV6A klaszterbe (korábban HPV6b és rokon genomok) tartozó szekvenciák LCR-ében a referencia genom (génbank azonosító: NC_001355) LCR-éhez képest hat nukleotidcserét azonosítottunk, amelyek a G7815C kivételével mindhárom genomban megtalálhatóak. Ezek az eltérések befolyásolhatják a lehetséges transzkripciós faktor kötőhelyek előfordulását (18. táblázat). Az LCR-ek funkcionális vizsgálata során a három egyedi LCR transzkripciós aktivitása szignifikánsan nem tért el sem egymástól, sem pedig a referencia LCR aktivitásától ($p = 0,47-0,99$).

18. táblázat: A HPV6A klaszterbe (korábban HPV6b) tartozó szekvenciák LCR-ében azonosított SNP-k és a lehetséges transzkripciós faktor kötőhelyek érintettsége

Nukleotid pozíció	Referencia (NC_001355)	AO-RRP2	AO-RRP3	AO-RRP4	Megjegyzés
7373	G	T	T	T	feltételezett FOXP3 kötőhely elvesztése, GR- β új feltételezett kötőhely megjelenése
7585	A	C	C	C	feltételezett C/EBP- β , GR- β kötőhely elvesztése, LEF-1, SRY új feltételezett kötőhely megjelenése
7653	G	C	C	C	feltételezett C/EBP- β kötőhely elvesztése; GR- β és C/EBP- α új feltételezett kötőhely megjelenése
7654	C	A	A	A	feltételezett C/EBP- β és NF-1 kötőhely elvesztése; GR- β új feltételezett kötőhely megjelenése
7815	G	C		C	feltételezett C/EBP- β kötőhely megjelenése
7860	G	A	A	A	közvetlenül a virális E2 regulátor kötőhelye mellett; C/EBP- β új feltételezett kötőhely megjelenése

AO-RRP: felnőttkori rekurrens légúti papillomatózis (adult onset recurrent respiratory papillomatosis)

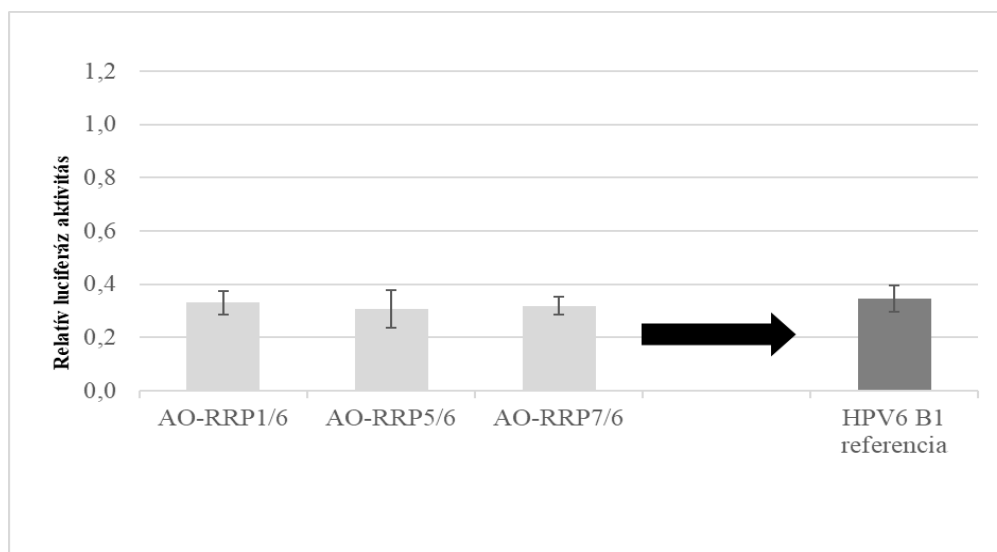
A HPV6B1 alcsoportba (korábban HPV6vc és rokon genomok) tartozó kilenc LCR szekvenciája közül hét megegyezett a referencia genom (génbanki azonosító: AF092932) LCR-ének szekvenciájával, további kettőben pedig három nukleotid cserét azonosítottunk. Ezek a mutációk nem befolyásolják a potenciális transzkripciós faktor kötőhelyeket (19. táblázat). Mivel referencia HPV6B1 plazmid nem áll rendelkezésünkre, a variánsok LCR aktivitásának összehasonlításához szükséges referencia LCR aktivitást az alábbiak szerint határoztuk meg. Meghatároztuk három, a referencia LCR szekvenciával azonos, HPV6B1 csoportba tartozó genom (AO-RRP1/6, AO-RRP5/6, AO-RRP7/6) LCR aktivitását; ezek nem különböztek egymástól szignifikánsan ($p = 0,83-0,96$) és a referencia LCR aktivitást ezen aktivitások három ismétlésben mért átlagaként definiáltuk (12. ábra). A két egyedi LCR szekvencia közül a JO-RRP2/6 LCR aktivitása a referencia aktivitáshoz hasonló volt (relatív aktivitás 0,88; $p = 0,20$), ezzel szemben a CAC1/6 LCR-e szignifikánsan magasabb

transzkripciós aktivitással rendelkezett, mint a referencia aktivitás (relatív aktivitás: 1,75; $p < 0,001$) (13. ábra).

19. táblázat: A HPV6B1 (korábban HPV6vc) klaszterba tartozó szekvenciák LCR-ében azonosított SNP-k és a lehetséges transzkripciós faktor kötőhelyek érintettsége

Nukleotid pozíció	Referencia (AF092932)	JO-RRP2	CAC1	Megjegyzés
7332	A	C		
7342	A		G	
7909	T		G	C/EBP- β és GR feltételezett kötőhelye

JO-RRP fiatalkori rekurrens légúti papillomatózis (juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis); CAC condyloma acuminatum



12. ábra: HPV6B1 referencia LCR aktivitás meghatározása

A B2 alcsoportba tartozó egyetlen HPV6 szekvencia tartalmaz egy 19 bp hosszúságú deléciót (nt 7361-7379), valamint további két mutációt. A deléció következtében négy lehetséges transzkripciós faktor kötőhely tűnik el (20. táblázat). Mivel B2 alcsoportba tartozó referencia genom szintén nem állt rendelkezésünkre, a B2 alcsoportba tartozó genomunk LCR aktivitását a B1 alcsoportba tartozó LCR-ek aktivitásához hasonlítottuk; az LCR aktivitása csak a CAC-ból származó minta LCR aktivitásától tért el szignifikánsan ($p < 0,001$).

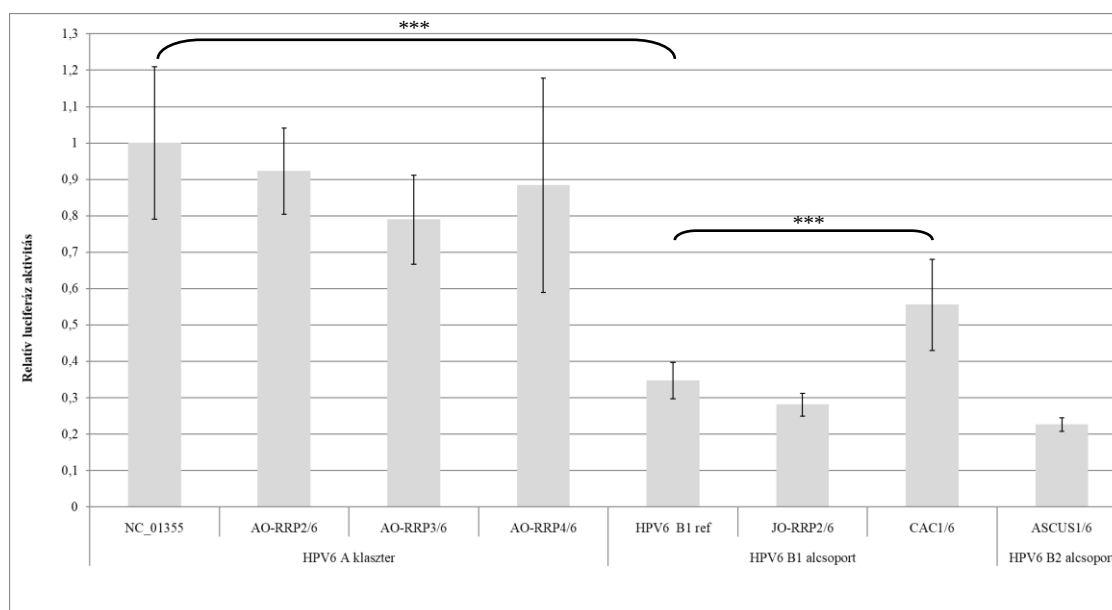
Összehasonlítva a HPV6 intratípusos variánsok LCR aktivitását, az A klaszterbe tartozó LCR-ek szignifikánsan nagyobb aktivitást mutattak a B1 vagy B2 alcsoportba tartozó LCR-ekhez képest, mind az egyes szekvenciák, mind pedig a klaszterátlagok összehasonlításakor (mindkét összehasonlításban $p < 0,001$). A HPV6 szekvenciák luciferáz aktivitásmérésnek összefoglaló eredményeit mutatja be a 13. ábra.

20. táblázat: A HPV6B2 klaszterba tartozó szekvencia LCR-ében azonosított SNP-k és a lehetséges transzkripciós faktor kötőhelyek érintettsége

Nukleotid pozíció	Referencia (FR751328)	ASCUS1	Megjegyzés
7368-7386		19 bp delécio*	feltételezett C/EBP- β , FOXP3, PR A, PR B kötőhely elvesztése
7623	T	T	feltételezett GR kötőhely elvesztése
7645	T	C	feltételezett HOXD9, HOXD10 kötőhely elvesztése; GR- β , TFIID esetében feltételezett kötőhely elvesztése

ASCUS atypical squamous cells of undetermined significance (ismeretlen jelentőségű atípusos laphámsejtek);

*TATATGTATGTGTGTTGTA



13. ábra: HPV6 LCR-ek transzkripciós aktivitásának vizsgálata luciferáz riporter esszével *** $p < 0,001$; AO-RRP: felnőttkori rekurrens légúti papillomatózis (adult onset recurrent respiratory papillomatosis); JO-RRP: fiatalkori rekurrens légúti papillomatózis (juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis); CAC: condyloma acuminatum

7.2.2 A HPV11 LCR funkcionális vizsgálatának eredményei

A funkcionális vizsgálatok során használt HPV11 referencia plazmid-ot a heidelbergi Krebsforschungszentrumban állították elő és H. zur Hausen bocsátotta rendelkezésünkre.

Az újonnan vizsgálatba vont mintáink esetében csak egyetlen új mutációt azonosítottunk, a JO-RRP9/11 betegtől származó HPV11 genom LCR-ében (T7331G). Irányított mutagenézissel megvizsgálva a mutáció LCR aktivitásra gyakorolt hatását, megállapítottuk, hogy ez az eltérés nem befolyásolja szignifikánsan a szabályozó régió transzkripciós aktiváló hatását.

A tizenöt általunk vizsgált HPV11 szekvencia LCR-ében azonosított nukleotidcserék alapján, az LCR aktivitások könnyebb összevethetősége céljából mintázatok határoztunk meg (21. táblázat). 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 gégepapillómából (JO-RRP3/11 és JO-RRP5/11) származó szekvenciában fordult elő (Gáll és mtsai., 2013). A harmadik LCR mintázat (M3) egy közepes súlyosságú (JO-RRP1/11; Gáll és mtsai., 2013) 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) egy-egy LCR szekvenciát foglalnak magukba. Az M3 és M6 között egyetlen különbség a JO-RRP9/11 szekvenciában azonosított T7331G nukleotid mutáció. A CA/11 szekvencia LCR-e identikus a referencia szekvencia (génbanki azonosító: M14119) LCR-ével, így ezt az LCR szekvenciát a referencia mintázathoz (Ref) soroltuk.

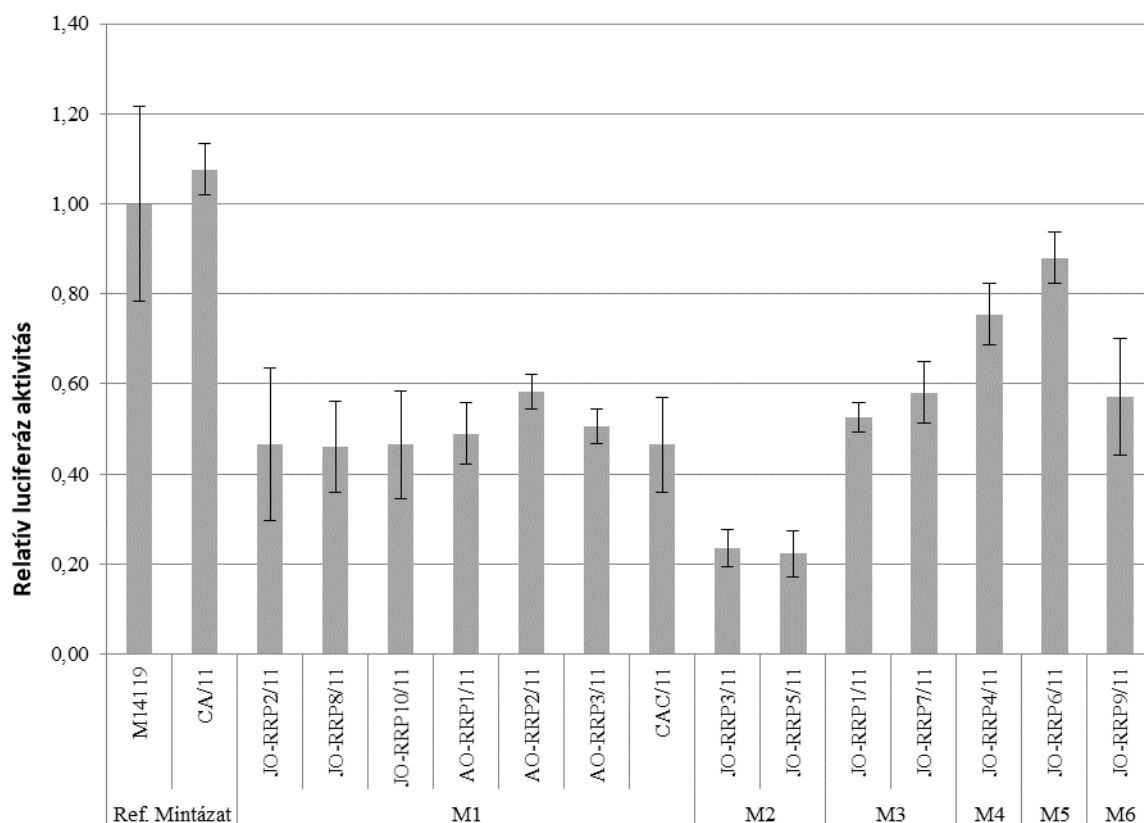
21. táblázat: HPV11 LCR mintázatok.

		Ref. (M14119)	1. mintázat	2. mintázat	3. mintázat	4. mintázat	5. mintázat	6. mintázat	Megjegyzés
7331	semleges	T						G	
7413	attenuátor	A	C						
7479	enhanszer	C	T		T		T	T	
7509	közepes attenuátor	T	delécio	delécio	delécio		delécio	delécio	
7547	erős attenuátor	T	C	C	C	C	C	C	
7585	semleges	-	C inzerció	C inzerció	C inzerció	C inzerció	C inzerció		feltételezett USF és Sp-1 kötő-hely
7719*		G inzerció	G inzerció	G inzerció	G inzerció	G inzerció	G inzerció	G inzerció	feltételezett Sp- 1 kötőhely mellett
7720*		C inzerció	C inzerció	C inzerció	C inzerció	C inzerció	C inzerció	C inzerció	
7904	közepes enhanszer	T					A		közvetlenül E2 kötő-hely mellett
Betegek/szekvenciák		CA/11 (MK313768)	JO-RRP2/11 (HE574702 & MK313763) JO-RRP8/11 (MK313765) JO-RRP10/11 (MN788368) AO-RRP1/11 (MK313761) AO-RRP2/11 (MK313762) AO-RRP3/11 (MW404328) CAC/11 (MK313767)	JO-RRP3/11 (HE574703) JO-RRP5/11 (HE574705)	JO-RRP1/11 (HE574701) JO-RRP7/11 (MK313764)	JO-RRP4/11 (HE574704)	JO-RRP6/11 (FR872717)	JO-RRP9/11 (MK313766)	

JO-RRP: fiatalkori rekurrens légúti papillomatózis (juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis), AO-RRP: felnőttkori rekurrens légúti papillomatózis (adult onset recurrent respiratory papillomatosis); CAC condyloma acuminatum; CA cervikális atípiá

*Feltételezett szekvenálási hiba a génbanki referencia genomban (génbanki azonosító: M14119) (Gáll és mtsai., 2013; Heinzel és mtsai., 1995)

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 aktivitást mutatott ($p \leq 0,005$ minden esetben) a referenciához képest (14. ábra).



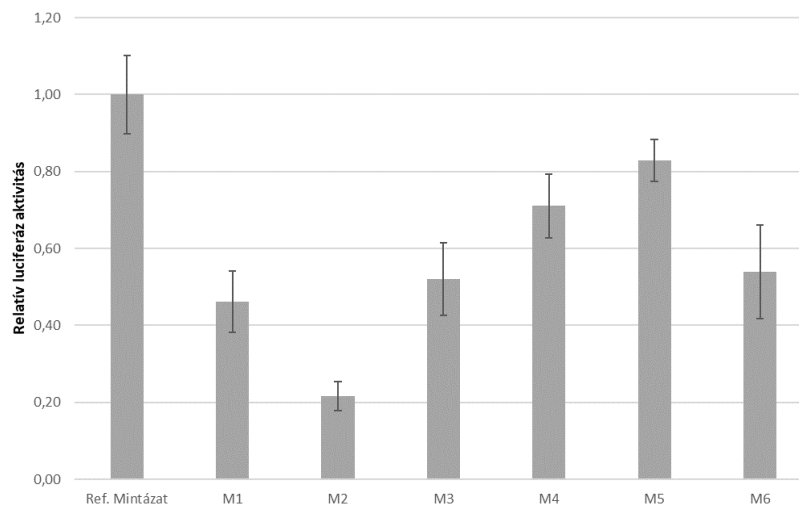
14. ábra: A HPV11 LCR szekvenciák luciferáz aktivitásának mérési eredményei

A legkisebb aktivitást a szoliter papillómákból származó M2 mintázatú LCR-ek mutatták (JO-RRP3/11 és JO-RRP5/11); aktivitásuk szignifikánsan alacsonyabb, mint az M1 és M3-M6 LCR mintázatoké ($p = 0,026$ -tól $p \leq 0,004$) (15. ábra). A funkcionális vizsgálatok statisztikai eredményeinek összehasonlítását mutatja a 22. táblázat.

22. táblázat: Eltérő LCR mintázatok luciferáz aktivitásának statisztikai összehasonlítása

	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Ref. mintázat	0,003	0,003	0,003	0,005	NSZ	0,003
M1		0,026	NSZ	0,023	0,003	NSZ
M2			0,004	0,003	0,003	0,003
M3				NSZ	0,003	NSZ
M4					NSZ	NSZ
M5						0,005

NSZ nem szignifikáns



15. ábra: Egyes LCR mintázatok luciferáz aktivitásának mérési eredményei

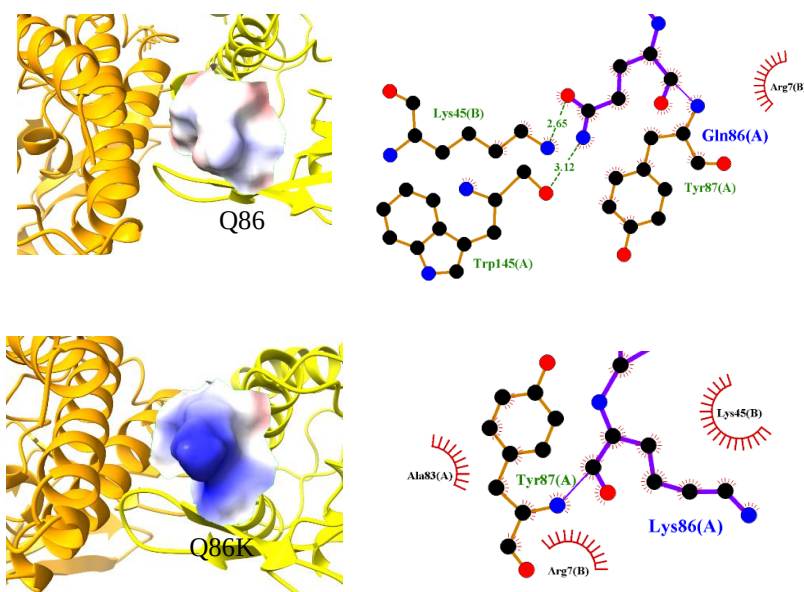
7.3 HPV11 E2 korai vírusfehérje modellezése és az E2 protein variánsok funkcionális vizsgálata

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.

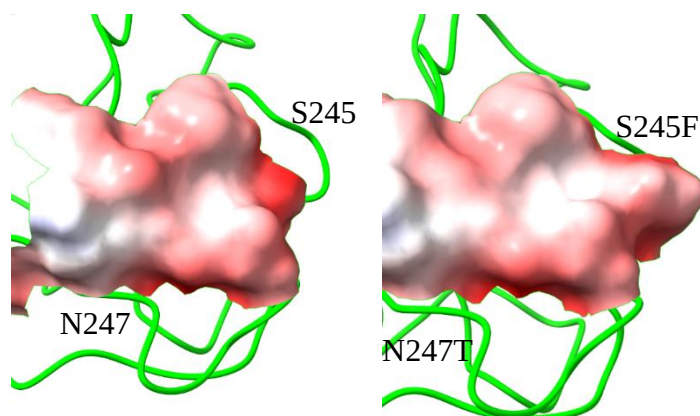
Az egyedi Q86K aminosavcserét a JO-RRP4/11 páciens mintájából kimutatott HPV11 szekvenciában azonosította korábban a munkacsoportunk (Gáll és mtsai., 2013), mely a fehérje transzaktivációs (E1-kötő) doménjében (TAD) található és az E2 protein felszíni töltésének változását okozza. A Q86 kötődik a szomszédos E2 monomer lánc K45 aminosavához, míg a K86 a fehérje felszínén helyezkedik el (19. ábra). A kötési energia különbözik a két TAD monomer esetében; a referencia E2 esetében kissé alacsonyabb, mint a mutáns E2-nél (-6,30 kcal/mol szemben -6,62 kcal/mol). A referencia E2 (Q86) esetében a fehérje felszíni töltése negatívabb, ezzel szemben a variáns K86 E2 felszíne a lizin jelenléte következtében pozitívabbá válik (16. ábra).

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 (17. ábra). 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 (17. ábra).



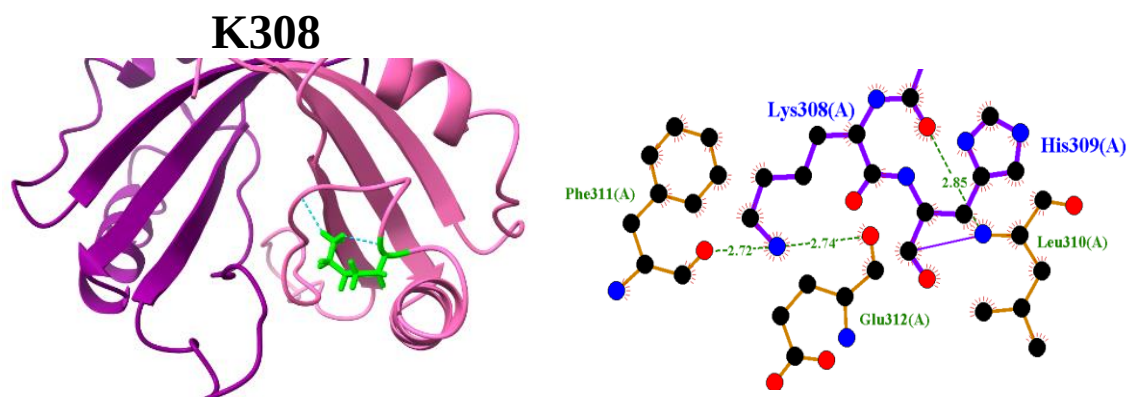
16. ábra: A referencia HPV11 E2 transzaktivációs doménje (sárga és narancssárga) és Q86K aminosavcserét tartalmazó HPV11 E2 transzaktivációs doménje, valamint a Q86 és K86 2D ligand kölcsönhatások plot-jai. A pozitív töltésű fehérje felszint kék, a negatív töltésű felszint piros, míg a semleges töltésűt fehér szín jelöli.



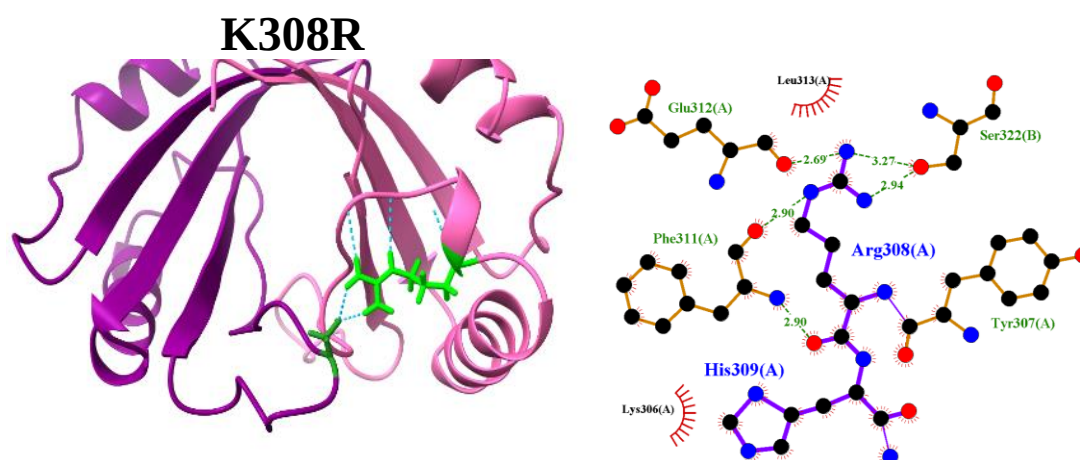
17. ábra: Referencia (vad típusú) HPV11 E2 hinge-régiójának, valamint az F245 és T247 aminosav variánsokat tartalmazó HPV11 E2 hinge-régiójának modelljei

Az E2 fehérje DNS-kötő és dimerizációért felelős doménjében (DBD) lokalizálódó K308R aminosavcsere a vizsgált szekvenciák jelentős részében megtalálható. Az eltérés nem változtatja meg közvetlenül a DBD DNS-kötését; a referencia E2 (K308) illetve az R308 E2 fehérjék fehérje-DNS kötési energiája megegyezik (17,24 kcal/mol) (Yang és Deng, 2020). Ezt támasztja alá a 18. ábrán látható fehérjemodellezés eredménye, ahol látható, hogy a K308 nem a DNS felé helyezkedik el. A fehérje dimerizációját azonban jelentősen megváltoztatja a

K308R aminosavcsere. A referencia fehérje K308-t tartalmazó oldallánca hidrogén kötések keresztül kapcsolódik a DNS-kötő hélix stabilizáló fehérje láncának F311 és E312 aminosavaihoz (18. ábra). Az R308 esetében, a terjedelmesebb arginin a dimer másik fehérje oldalláncával áll szemben, az S322-höz kötődik (19. ábra). Az így létrejött hidrogén kötések jelentősen megemelik a teljes kötési energiát a két E2 monomer között, amely a K308 referencia fehérjében -17,23 kcal/mol, míg az R308 aminosavcsere esetében -22,46 kcal/mol.



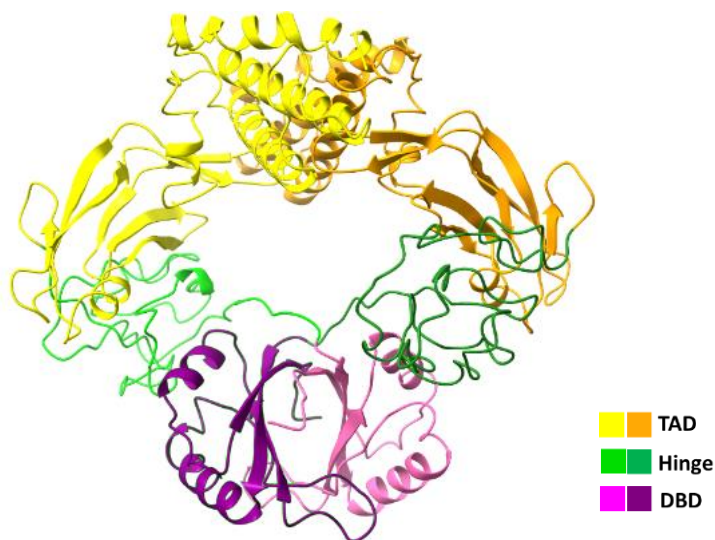
18. ábra: HPV11 referencia E2 DBD doménjeinek 3D kölcsönhatásai a szomszédos oldalláncokkal (zöld színnel; hidrogén kötések szaggatott kék vonallal jelölve), valamint a 2D interakciók plotja



19. ábra: HPV11 K308R E2 DBD doménjeinek 3D kölcsönhatásai a szomszédos oldalláncokkal, (zöld színnel; hidrogén kötések szaggatott kék vonallal jelölve), valamint a 2D interakciók plotja

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 és megváltoztatva a DNS-kötő motívumot. Továbbá a deléció pozitív töltésű aminosavak kiesését eredményezi, melynek következtében a fehérje felszíne kissé negatívvá válik. Összességében ez a két változás a fehérje DNS-kötő képességének elvesztéséhez vezethet.

Homológ modellezéssel és loop modellezés használatával létrehoztuk a teljes hosszúságú referencia HPV11 E2 fehérje dimer homológjainak modelljét, melyet a 20. ábrán látható.



20. ábra: Referencia HPV11 E2 fehérje dimer homológjának modellje. A DNS-kötő domént (DBD) jelöli a rózsaszín/lila szín, a transzaktivációs domént a sárga/narancssárga, míg a két szakaszt összekötő hinge-régiót világoszöld/sötétzöld színnel ábrázoltuk.

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/11 mintákból kimutatott HPV11 szekvenciákban és a fehérje prolin gazdag régióját érinti. A G61E (G43E a fúziós fehérjében) és az S78L (S60L a fúziós fehérjében) aminosavcserék csak a CA/11, JO-RRP6/11, illetve az AO-RRP1/11 esetében detektáltuk és a fehérje loop és negatív töltésű prolin-gazdag régiójában lokalizálnak. A P68S és T70P (P50S és T52P a fúziós fehérjében) aminosavcseréket 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 protein 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 aminosaveltéréseket tartalmazó HPV11 szekvencia (JO-RRP9/11) (23. táblázat).

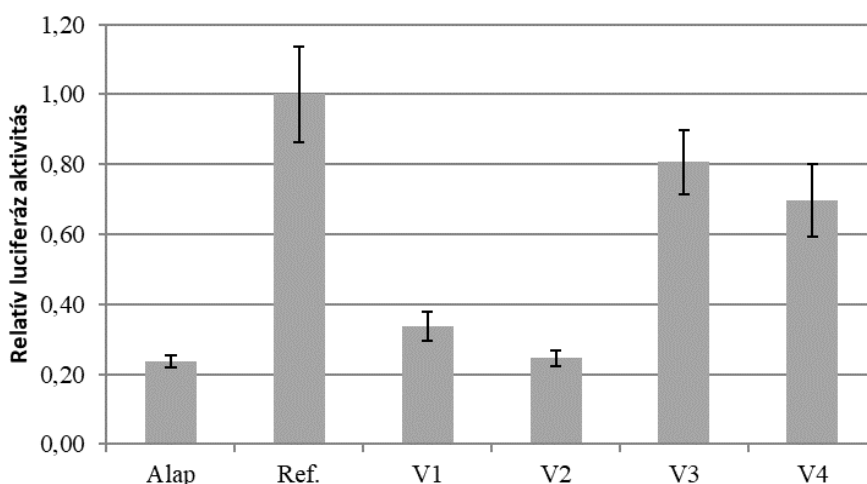
A kotranszfekciós kísérletekben az LCR mintázatok és az E2 variánsok három kombinációját vizsgáltunk; (i) a referencia LCR és az egyes variáns E2 fehérjék közötti kölcsönhatás, (ii) a referencia E2 hatása az eltérő mintázatú LCR-ek aktivitására, és végül (iii) az egyedi LCR mintázatok és a hozzájuk tartozó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

23. táblázat: Humán papillomavírus 11 E2 variáns csoportok

	Referencia típus		1. variáns		2. variáns	3. variáns	4. variáns	Aminosav cserék
	Referencia szekvencia	Szekvencia típus 1	Szekvencia típus 2	Szekvencia típus 3				
2978	C					A		Q86K E2-ben
3381					58 bp deléció			
3391	A		G			G		Q46R E4-ben (Q28R E1^E4 fúziós fehérjében)
3436	G	A	A	A		A	A	G61E E4-ben (G43E E1^E4 fúziós fehérjében)
3438								
3456	C						T	S245F E2-ben P68S E4-ben (P50S E1^E4 fúziós fehérjében)
3462	A						C	N247T E2-ben T70P E4-ben (T52P E1^E4 fúziós fehérjében)
3487	C	T	T	T	T	T	T	S78L E4-ben
3645	A		G	G	G	G	G	K308R E2-ben
Betegek	CA/11 (MK313768)	JO-RRP6/11 (FR872717)	JO-RRP1/11 (HE574701) JO-RRP2/11 (HE574702 & MK313763) JO-RRP3/11 (HE574703) JO-RRP5/11 (HE574705) JO-RRP8/11 (MK313765) JO-RRP10/11 (MN788368) AO-RRP2/11 (MK313762) AO-RRP3/11 (MW404328) CAC/11 (MK313767)	JO-RRP7/11 (MK313764)	AO-RRP1/11 (MK313761)	JO-RRP4/11 (HE574704)	JO-RRP9/11 (MK313766)	

JO-RRP: fiatalkori rekurrens légúti papillomatózis (juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis), AO-RRP: felnőttkori rekurrens légúti papillomatózis (adult onset recurrent respiratory papillomatosis); CAC condyloma acuminatum; CA cervikális atípiá

A referencia LCR és a variáns E2-k kölcsönhatását vizsgálva a referencia E2, valamint a V3 és V4 E2 variánsok szignifikánsan emelték a referencia LCR luciferáz aktivitását ($p=0,002$ minden esetben). A V1 E2 variáns 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, ezt követte a V3 és V4 ($p=0,002-0,003$), végezetül a V1 változat. Ezen vizsgálatok eredményeit mutatja be a 21. ábra, valamint a statisztikai analízis eredményeit foglalja össze a 24. táblázat.



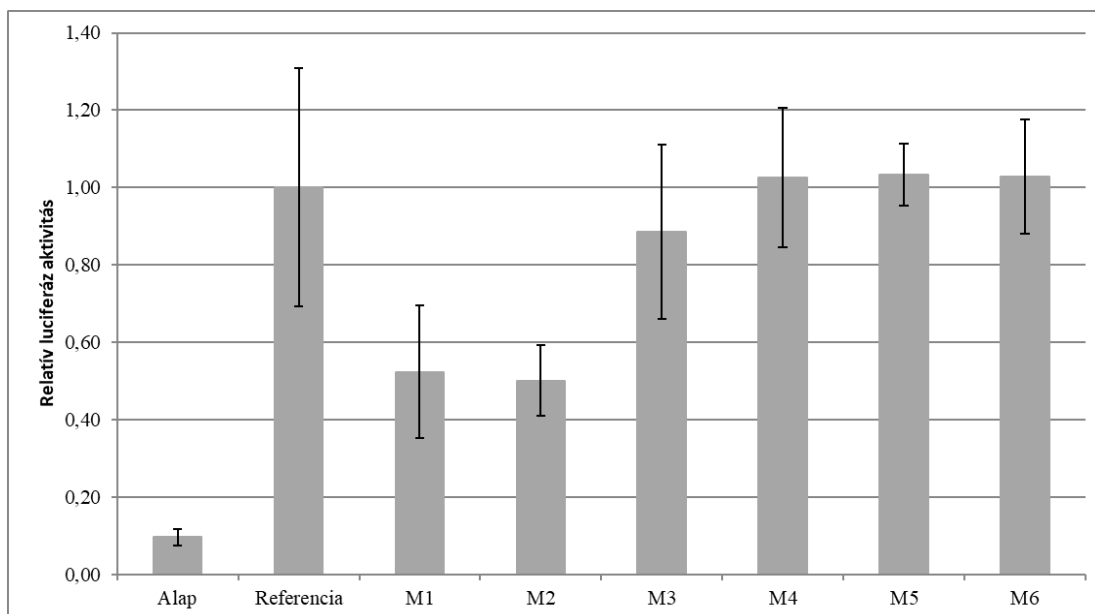
21. ábra: A variáns E2 fehérjék hatása a referencia LCR luciferáz aktivitására

24. táblázat: A különböző HPV11 E2 variánsok referencia LCR alap aktivitására gyakorolt hatásának statisztikai összehasonlítása.

	Referencia variáns	V1	V2	V3	V4
Alap LCR aktivitás	0,002	NSZ	NSZ	0,002	0,002
Referencia variáns		0,002	0,002	NSZ	0,003
V1			NS	0,002	0,002
V2				0,002	0,002
V3					NSZ

NSZ nem szignifikáns

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 a referencia, az M3, M4, M5 és M6 LCR mintázat esetében szignifikánsan megnövelte az LCR luciferáz aktivitását ($p=0,004$ minden esetben) az alap aktivitáshoz képest. A referencia LCR aktivitáshoz viszonyítva azonban egyik mintázatnál sem volt statisztikailag szignifikáns eltérés. A kotranszfekciós kísérletek ezen eredményeit a 22. ábrán láthatjuk, míg a statisztikai elemzés eredményeit a 25. táblázat foglalja össze.



22. ábra: Referencia E2 fehérje hatása az eltérő mintázatú LCR-ek luciferáz aktivitására

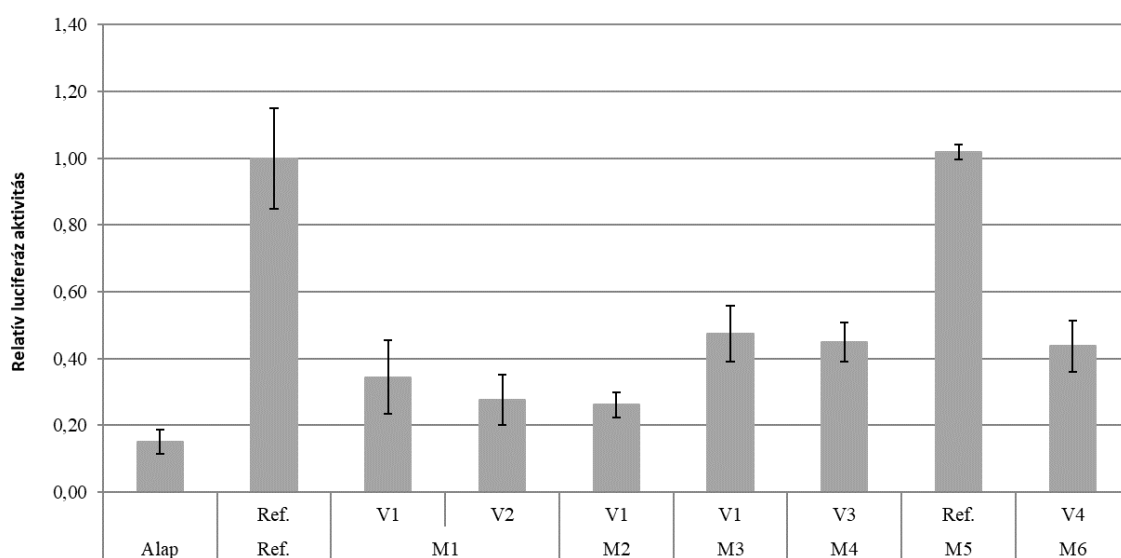
25. táblázat: A referencia HPV11 E2 és az eltérő mintázatú LCR-ek kölcsönhatásának vizsgálatából származó eredmények statisztikai összehasonlítása.

	Referencia LCR	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Alap LCR aktivitás	0,004	NSZ	NSZ	0,004	0,004	0,004	0,004
Referencia LCR		NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
M1			NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	NSZ
M2				NSZ	0,097	0,084	0,092
M3					NSZ	NSZ	NSZ
M4						NSZ	NSZ
M5							NSZ

NSZ nem szignifikáns

Végezetül megvizsgáltuk azon E2 variánsok regulátor hatását a saját LCR régiójukra. A nukleotidcseréket 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 aktivitással rendelkező M1 és M2 mintázatú LCR-ek aktivitását a V1 mintázatú E2 megnövelte, azonban ez az aktivitás statisztikailag nem volt szignifikánsan magasabb, mint a referencia LCR alap aktivitása. Amikor magasabb aktivitással rendelkező LCR mintázattal (M3) kombináltuk a V1 E2 variánst, 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. A vizsgálati eredményeket a 23. ábra mutatja be, míg a statisztikai értékelés eredményét a 26. táblázatban foglaltuk össze.



23. ábra: Az összetartozó variáns HPV11 E2 fehérjék és LCR-ek kotranszfekciós vizsgálatának eredményei

26. táblázat: Az összetartozó HPV11 E2 és LCR mintázatok kotranszfekciós vizsgálatának statisztikai összehasonlítása.

	Ref. LCR – Ref. E2	LCR M1 – E2 V1	LCR M1 – E2 V2	LCR M2 – E2 V1	LCR M3 – E2 V1	LCR M4 – E2 V3	LCR M5 – ref. E2	LCR M6 – E2 V4
Alap LCR aktivitás	0,005	NSZ	NSZ	NSZ	0,006	0,011	0,005	0,017
Ref. mintázat – Ref. E2		0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	NSZ	0,005
LCR M1 – E2 V1			NSZ	NSZ	NSZ	NSZ	0,005	NSZ
LCR M1 – E2 V2				NSZ	NSZ	NSZ	0,005	NSZ
LCR M2 – E2 V1					NSZ	NSZ	0,005	NSZ
LCR M3 – E2 V1						NSZ	0,005	NSZ
LCR M4 – E2 V3							0,005	NSZ
LCR M5 – ref. E2								0,005

NSZ nem szignifikáns

8. Megbeszélés

Bár az alacsony onkogén kockázatú humán papillomavírusok által okozott megbetegedések rendszerint enyhe tünetekkel járnak, néhány esetben az életminőséget jelentősen rontó kórlefolyás, vagy akár életet veszélyeztető állapot is kialakulhat a fertőzés következtében (Derkay és Bluher, 2019). Míg a magas onkogén kockázatú 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 vizsgálatai 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 (Gáll és mtsai., 2013).

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 (Jelen és mtsai., 2014). Egy dél-amerikai tanulmány esetében szintén a B1 alvonal halmozott előfordulását írták le, a második leggyakoribb alvonalnak pedig a B3 bizonyult; ezen eredmények összhangban vannak Jelen és munkacsoportja által kapott, Dél-Amerikára vonatkozó megoszlási adatokkal (Jelen és mtsai., 2014; Sichero és mtsai., 2021). További hasonlóság eredményeink és a dél-amerikai eredmények esetében, hogy a kimutatott HPV6 szekvenciák jelentős része felnőttkori papillomatózisból származott (Sichero és mtsai., 2021). Egy japán tanulmányban a leggyakoribb filogenetikai vonalnak szintén a B1 alvonal bizonyult, az esetszámuk hasonló volt a tanulmányunkban vizsgált HPV6 pozitív minták számához (Ikegami és mtsai., 2021a). A jelen tanulmány esetében az alacsony esetszám miatt a filogenetikai csoportok előfordulása és a nemek közötti összefüggés statisztikailag nem vizsgálható, de felnőttkori papillomatózisok esetében megfigyelhető a férfi dominancia.

Vizsgálataink során az egy betegről származó, egymást követő recidívákból kimutatott HPV6 szekvenciák egymással identikusnak bizonyultak, ami a genomok stabilitását mutatja; ezt a jelenséget korábbi tanulmányok is leírtak (Kocjan és mtsai., 2013; Measso de Bonfim és mtsai., 2015). Az alacsony variabilitás az egy páciensről származó genomok szekvenciájában a HPV11 esetében is megfigyelhető (Gáll és mtsai., 2011; Gáll és mtsai., 2013; Kocjan és mtsai., 2013), azonban a HPV16 esetében ennek ellenkezőjéről számoltak be kutatócsoportok

(Mendes de Oliveira és mtsai., 2015; Dube Mandishora és mtsai., 2018). 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 kapcsolható.

Jelentős genomi átrendeződés ritkán történik az alacsony onkogén kockázatú genotípusok esetében, ezek azonban általában valamilyen kedvezőtlen változást, pl. malignus transzformációt okozhatnak (DiLorenzo és mtsai., 1992; Yuan és mtsai., 2012) vagy hatásukra nagyobb számú recidíva jelenhet meg (Seedat és mtsai., 2016).

A magas onkogén kockázatú genotípusok, mint például a HPV16 esetében, főként az E6 onkoproteinben előforduló pontmutációk lehetnek felelősek a daganatok progressziójáért (Villa és mtsai., 2000; Zehbe és mtsai., 1998; Zehbe és mtsai., 2009). Ezzel szemben tanulmányunkban a HPV6 E6 ORF esetében aminosavcserét eredményező mutációt nem detektáltunk, hasonlóan a munkacsoportunk által már vizsgált HPV11 genotípushoz (Gáll és mtsai., 2011; Gáll és mtsai., 2013; jelen tanulmány).

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 (Gáll és mtsai., 2011; Danielewski és mtsai., 2013; Kocjan és mtsai., 2013; de Matos és mtsai., 2013). Ezzel szemben az E7 onkoprotein konzervált jellege a két csoport közös tulajdonsága (Zehbe és mtsai., 1998; Van Doorslaer, 2013).

Eredményeink alapján a HPV6 genotípus többi korai, illetve késői ORF-je variabilisabbnak bizonyult, viszont az egyes (al)vonalak között jelentős különbség van az ORF-ek és az LCR variabilitásában. Az általunk vizsgált HPV6A filogenetikai vonalba tartozó genomokban azonosított nukleotid polimorfizmusok több mint fele (15/25) megtalálható mindhárom vizsgált genomban, a szekvenciák nagyfokú hasonlóságot mutatnak. A HPV11 referencia szekvenciához hasonlóan (génbanki azonosító: M14119, Gáll és mtsai., 2013), a HPV6A referencia (génbanki azonosító: NC_001355), illetve a génbanki szekvenciák összehasonlításával meghatározott konszenzus szekvencia vizsgálata alapján felvetődött, hogy a HPV6A filogenetikai vonal referencia genomjaként megjelölt szekvencia (génbanki azonosító: NC_001355) 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 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, illetve *condylomá*-ból származnak. Két, egyetlen recidívát mutató felnőttkori papillóma (AO-RRP6/6 és AO-RRP7/6) esetében egyetlen egyedi mutációt azonosítottunk az L1 ORF-ben.

Egyetlen A vonalba tartozó HPV6 szekvencia (AO-RRP4/6) esetében azonosítottunk aminosavcserét eredményező mutációt az E5a ORF-ben. Az E35D (HPV11 esetében szintén aszparaginsav található ebben a pozícióban) a fehérje hurok régiójában - a HPV16 E5 fehérjéjének struktúrája alapján feltételezve - az első és második transzmembrán domén között, a fehérje extracelluláris részén lokalizálódik, míg a P78S aminosavcsere feltételezhetően egy új foszforilációs helyet hoz létre a fehérje harmadik transzmembrán doménjében (szintén a HPV16 E5 fehérje alapján) (DiMaio és Petti, 2013). Az extracellulárisan elhelyezkedő E35D befolyásolhatja a növekedési faktorok kötődését, így hozzájárulhat 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 mutációk hatással lehetnek a fehérjék funkciójára, így módosíthatják az egyes vírus variánsok 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 (Gáll és mtsai., 2013).

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 az aminosavcserék helyzetükből adódóan befolyásolhatják az E1 fehérje kötődését, illetve a DNS replikáció iniciálásának folyamatát, ezáltal a transzkripció aktivitást, az intracelluláris lokalizációt, a kromatin kötődést és önszabályozást, vagy az L1 kötődését (Siddiqi és mtsai., 2015), illetve az E2 LCR-hez való kötődésén keresztül az onkoproteinek expresszióját (McBride, 2013). 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 (Doorbar, 2013).

Az L1 fehérjében azonosított egyedi mutációk (F441L a CAC1/6-ban és K449E a JO-RRP1/6-ban) a fehérje C-terminális régiójában lokalizálódnak, 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 (Bishop és mtsai., 2007; Buck és mtsai., 2013).

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 a virális ORF-ekhez hasonló variabilitást lehetett megfigyelni. Míg a HPV6B1 (korábban HPV6vc) 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 hatása nagyon hasonló volt, nem tértek el szignifikánsan sem egymástól, sem pedig a referencia LCR transzkripció aktiváló hatásától. A B1 alvonal esetében a hat recidívával manifesztálódó *condylomá*-ból (CAC1/6) származó, a referenciától két nukleotidban eltérő (A7342G, T7909G) LCR szignifikánsan magasabb aktivitást mutatott, mint a többi B1 alvonalba tartozó HPV6 LCR. A HPV6 LCR variabilitását vizsgálva Measso do Bonfim munkacsoportjának (2015) öt variánst sikerült azonosítaniuk. Az egyetlen B3 variáns (korábban HPV6a) esetében a referencia HPV6 B3 LCR aktivitásától szignifikánsan magasabb transzaktiváló hatást mértek. A B1 alvonal (korábban HPV6vc) esetében a referencia LCR és két B1 variáns aktivitása közel azonos volt, míg egy variáns esetében szignifikánsan alacsonyabb értéket detektáltak (Measso do Bonfim és mtsai., 2015). Az általunk kapott LCR aktivitási mintázat tükrözi Measso do Bonfim és munkatársai (2015) által is leírt kapcsolatot az LCR szekvenciabeli különbségei és transzkripció aktiváló hatás között. Emellett kimutatták, hogy a részben duplikálódott LCR-rel rendelkező HPV6 (Combrinck és mtsai., 2012, Seedat és mtsai., 2016) és HPV11 (Yuan és mtsai., 2012)

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

Az eredmények alapján megállapítható, hogy hasonlóan a HPV11 variánsokhoz (Gáll és mtsai., 2013) a HPV6 variánsok esetében kimutatott egyes mutációk szintén befolyásolhatják az LCR aktivitását, azonban vannak olyan nukleotid eltérések is, amelyek nincsenek hatással a regulátor szakasz transzkripciót aktiváló hatására.

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 vonalra jellemző LCR szignifikánsan magasabb aktivitást mutatott, mint a HPV6 B1 és B2 alvonalakba tartozó LCR-ek, kivéve a B1 alcsoportba sorolható CAC1/6 mintából származó LCR-t, melynek aktivitása megközelítette a HPV6A csoportban mért 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) sejtproliferációt 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 transzkripciós faktor kötőhelyek nagyobb variabilitása is az A vonalban, szemben a B1 alcsoport LCR-ével. Hasonló különbségek körvonalazódtak a HPV11 filogenetikai csoportjai esetében is (Gáll és mtsai., 2013).

A HPV6B1 alvonal szintén mutat néhány hasonlóságot a HPV11 genotípussal, melynek előfordulása szignifikánsan gyakoribb a súlyosabb lefolyású, elsősorban juvenilis RRP-kben (Rabah és mtsai., 2001; Wiatrak és mtsai., 2004). 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 mutatkozó különbségek kevésbé szembetűnőek, mint a HPV11-asszociált megbetegedések esetében (Gáll és mtsai., 2013).

A HPV11 szekvenciák filogenetikai vizsgálataink eredményei összhangban vannak munkacsoportunk korábbi eredményeivel, illetve az irodalomban fellelhető kutatási eredményekkel. Munkacsoportunk korábbi HPV11 szekvenciái (Gáll és mtsai., 2011; Gáll és mtsai., 2013) 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 alvonal dominanciája figyelhető meg (Sichero és mtsai., 2021). Az általuk és általunk kapott filogenetikai eredmények összhangban vannak Jelen és munkatársai 2016-os vizsgálati eredményeivel, miszerint földrészenként és globálisan is az A2 alvonal dominanciája a jellemző (Jelen és mtsai., 2016).

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 (Sichero és mtsai., 2021).

Az újonnan vizsgálatba vont HPV11 genomok LCR-ében megtalálhatóak voltak korábban leírt mutációk; az új szekvenciák LCR-ében egyetlen új nukleotid eltérést azonosítottunk (T7331G, JO-RRP9/11-ben), amely azonban nem befolyásolta az LCR aktivitását a referencia aktivitáshoz képest. Hasonlóképpen, számos, a korábbi vizsgálataink során már kimutatott, aminosavcserét nem eredményező nukleotid polimorfizmust azonosítottunk a kódoló régiókban, melyek közül több további, génbankban található HPV11 genomban 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 betegből származó HPV11 szekvencia E2 ORF-ében azonosított 58 bp hosszúságú deléció, 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, Gáll és mtsai., 2013) és 2. E2 variáns (leggyakoribb E2 variáns, a K308R cserét tartalmazza) kölcsönhatása során mért aktivitás. Ezen páciens esetén a diszplázia kialakulásának hátterében az állhat, hogy a csonka E2 fehérje nem képes az

onkoproteinek expressziójának szabályozására. A delécio háttérben állhat akár a HPV11 gazdasejt genomjába történő integrációja is. Két munkacsoport is kimutatta HPV11-asszociált rákos elváltozásokban a vírus DNS gazdasejtbe történő integrációját, de vizsgálataik nem terjedtek ki az integráció E2 fehérjére gyakorolt hatásának elemzésére (Rady és mtsai., 1998; Reidy és mtsai., 2004). A magas onkogén kockázatú HPV genotípusok esetében ugyanakkor 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 (McBride és Warburton, 2017; Pinatti és mtsai., 2018).

Az egyedi Q86K aminosavcsere (JO-RRP4/11) az E2 fehérje transzaktiváló doméjének felületi töltésében okoz változást, valamint kis mértékben segíti a fehérje dimerizációját. Az E2 fehérje dimerként aktív (McBride, 2013), így a könnyebb dimerizáció hozzájárulhat a kissé emelkedett LCR aktivitáshoz; melyre 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 a fehérje foszforilációs mintázatát változtathatják meg. A foszforilációs helyek elvesztése vagy új helyek létrejötte módosíthatja az E2 fehérje aktivitását és funkcióját, valamint a foszforilációs mintázatok befolyásolhatják a celluláris proteinek és az E2 fehérje közötti kölcsönhatásokat (Sekhar és McBride, 2012). 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 lehetséges új foszforilációs helyet hoz létre a 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/S243. pozícióban foszforilált szerin oldallánca részt vesz a vírus genom gazdasejt kromatin állományához való kötődésben (Chang és mtsai., 2014; Sekhar és McBride, 2012). 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 szolgáljon. Másrészt mivel egy másik kináz célpontja lehet, így más celluláris szabályozási utakhoz kapcsolódhat, így ennek a foszforilációs helynek a megjelenése nem tekinthető egyenértékűnek az elveszett 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 (génbanki azonosító: M313765 és M313767) által meghatározott szekvencia variáns csoporthoz. Így a prototípus szekvencia számos egyedi mutációval rendelkezik, mint pl. az attenuátor mutáció az LCR-ben (T7547C, Gáll és mtsai, 2013), 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, génbanki azonosító: M313768), amely hasonlóan magas LCR alap aktivitással rendelkezett. Ez magyarázhatja a HPV11 referencia genom által okozott juvenilis RRP súlyosságát, ugyanakkor a cervikális atípiában a fertőzés kimeneteléről nincs információnk.

Hasonlóan, az E7 fehérjében jelenlévő polimorfizmus (S45) inkább képviseli a vad típust, míg a referencia szekvenciában jelen lévő alanin (A45) egy feltételezett foszforilációs hely elvesztéséhez vezet; a HPV6 esetében, illetve a feltételezett vad típusú HPV11-ben 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 mutáció 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 (DiMaio és Petti., 2013).

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, Gáll és mtsai., 2013), valamint a JO-RRP3/11 és JO-RRP5/11-ben megtalálható további attenuátor polimorfizmus (T7509Δ, Gáll és mtsai., 2013) hozzájárulhatnak a csökkent LCR aktivitáshoz. Az ugyanezen mintákból származó E2 variánsok is alacsony LCR aktiváló hatással rendelkeznek, aminek következtében kombinációjuk a legalacsonyabb LCR aktivitást eredményezi, és magyarázhatja, hogy ezek a papillómák 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 LCR aktivitás E2 enhanszer hatására történő fokozódása együttesen alakítják ki az LCR bruttó hatását. A legmagasabb LCR aktivitást az önmagában is legmagasabb aktivitású LCR mintázat (referencia mintázat, egy agresszív papillomatózisból) és referencia E2 variáns kölcsönhatása eredményezte. Egy kevésbé erős LCR magas aktivitást mutatott a referencia E2 fehérjével kölcsönhatásban; ezen HPV11 genom jelenléte egy több mint 60 recidívával jelentkező, súlyos lefolyású papillomatózis (JO-RRP6/11) megjelenésével párosult (Gáll és mtsai., 2013). Számos közepes súlyosságú esetből (2-10 recidíva) származó HPV11 genom a legtöbb szekvenciában előforduló, 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 a gyakoribb (jelen

tanulmány, Gáll és mtsai., 2013; Sichero és mtsai., 2021), kivéve egy amerikai tanulmányt mely esetében a vizsgált JO-RRP-ben szenvedő páciensek mintáiból kimutatott HPV szekvenciák között nagyobb arányban fordult elő HPV6 (Amiling és mtsai., 2021). Azonban a korábbi tanulmányokhoz hasonlóan Amiling és munkacsoportja (2021) is arról számolt be, hogy a HPV11-asszociált fiatalkori papillomatózisok nagyobb agresszivitást mutatnak (Major és mtsai., 2005; Larson és Derkay., 2010; Amiling és mtsai., 2021). Labedz és munkatársai (2021) szintén erre a következtetésre jutottak vizsgálataik során, továbbá megállapították, hogy kapcsolat van az extralaringeális terjedés, a tracheosztóma szükségessége és a diagnózis ideje között (az 5 éves kor alatt diagnosztizált eseteknél gyakoribb az extralaringeális szóródás előfordulása), valamint szignifikáns összefüggést találtak az extralaringeális terjedés és a HPV11 fertőzöttség között (Labedz és mtsai., 2021).

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 dominál, illetve ezen alvonalak globális dominanciája is jellemző (Jelen és mtsai., 2014; Jelen és mtsai., 2016; Sichero és mtsai., 2021). A HPV6 teljes genom szekvenciák vizsgálata számos hasonlóságot, de különbségeket is feltárt az alvonalak tekintetében, így i.) bár az A vonalban és B1 alvonalban közel azonos számú mutációt azonosítottunk; ii.) a B1 alvonal esetében jórészt egyedi mutáció voltak jelen, míg az A vonal esetében a legtöbb polimorfizmus a vizsgált minták jelenős hányadában jelen volt; iii.) az A vonal esetén a polimorfizmusok szinte kivétel nélkül csak a DNS szintjén jelentek meg, addig a B1 alvonal esetében több olyan mutációt is azonosítottunk, amelyek hatása fehérje szinten is érvényesült, aminosavcserét okozva a referenciához 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, a magas onkogén kockázatú típusokhoz hasonlóan a HPV6 filogenetikai (al)csoportjai esetében detektált különbségek hatással lehetnek a variánsok különböző betegségekben/betegcsoportokban való előfordulására, bár ennek megerősítésére nagyobb mintaszámon kivitelezett vizsgálatokra van szükség.

Az eddig megismert HPV6 és 11 genotípus variánsok szekvencia analízise alapján megállapítható, hogy az E6 és E7 onkoproteinek erősen konzerváltak HPV11 (Danielewski és mtsai., 2013; Gáll és mtsai., 2013, valamint ez a tanulmány), illetve HPV6 (Grassmann és mtsai., 1996, valamint ez a tanulmány) 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 proliferációja jelentős különbséget mutat (Doorbar és mtsai., 2012). 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 szubtypusok onkogenitási kockázatát (Xin és mtsai., 2001; Lizano és mtsai., 2006; Lee és mtsai., 2008; Mirabello és mtsai., 2017). Ezzel szemben úgy tűnik, hogy az alacsony onkogén kockázatú genotípusok patogenitásbeli különbségének hátterében, nem ezen onkoproteinek, hanem inkább az E1, E2/E4 és E5a, valamint a kapszid proteinek és az LCR variabilitása állhat.

8.1 Konklúziók

1. Munkacsoportunk elsőként vizsgálta az alacsony onkogén kockázatú humán papillomavírus 6 és 11 genotípusok szekvencia variánsaiban azonosított mutációk és az általuk okozott megbetegedések közötti összefüggéseket.
2. A HPV6 filogenetikai (al)csoportjai jelentős különbséget mutathatnak a genomi régiók variabilitási mintázataiban, ami hatással lehet a variánsok különböző betegségekben/betegcsoportokban való előfordulására.
3. A HPV6A referencia, illetve a génbanki szekvenciák alapján meghatározott konszenzus szekvencia összehasonlítása során felvetődött, hogy a HPV6A filogenetikai vonal referencia genomjaként megjelölt szekvencia (génbanki azonosító: NC_001355) inkább egy egyedi variáns és nem ez reprezentálja a HPV6A leggyakrabban előforduló, úgynevezett vad típusát. Ezzel szemben a B1 alcsoportba tartozó szekvenciák igen diverznek bizonyultak, valamint a dendrogramon különböző távolságban helyezkednek el a konszenzus szekvenciával nagy hasonlóságot mutató, referencia szekvenciához képest.
4. Hasonlóan a HPV6A variánshoz, vizsgált HPV11 genomokban jelen lévő polimorfizmusok mintázata azt mutatja, hogy a referencia HPV11 szekvencia egy egyedi variáns és az általunk azonosított polimorfizmusok jellemzik inkább a vad típust.
5. A HPV11 genotípus esetén azonosított néhány mutáció – az ismert klinikai háttérrel rendelkező esetekből származó szekvenciák alacsony számának ellenére – úgy tűnik, összefüggésbe hozható az okozott betegség súlyosságával. Az LCR és az E2 protein közötti kölcsönhatás által meghatározott transzaktiváló hatás számos esetben korrelál a betegség súlyosságával, ami arra utal, hogy a HPV11 intratípusos variánsainak patogenitásban/virulenciájában ez a kölcsönhatás fontos szerepet játszhat.

9. 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 is, 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 célul tűztük ki új páciensektől, valamint már ismert betegek új recidívájából származó HPV6 és HPV11 szekvenciák teljes genom analízisét. *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 B-főcsoporton belül a B1 és B2 alvonalba tartoztak, leggyakoribbnak a B1 alvonal 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 esetében. Ezzel szemben a LCR-t tekintve az HPV6A szekvenciái bizonyultak variábilisabbnak.

Az HPV6 LCR funkcionális vizsgálata során a variánsok LCR aktivitásának gradiensszerű csökkenését tapasztaltuk; legmagasabb a HPV6A variáns 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 transzkripciós faktor kötőhelyek nagyobb variabilitása is ezt támaszthatja alá.

A HPV11 esetében az ORF-ek és az LCR is számos polimorfizmust tartalmaznak a referencia szekvenciához viszonyítva. A filogenetikai vizsgálatok alapján a HPV11 szekvenciáink körében az A2 alvonal dominanciája volt megfigyelhető. A szekvencia vizsgálatok alapján az E1, E2/E4 és E5a, valamint a kapszid proteineket kódoló régiók és az LCR esetében nagyobb variabilitást figyeltünk meg.

Az E2 ORF-ben azonosított K308R aminosavcsere az 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, negatívabb lesz általa. A két szintén egyedi aminosaveltérés (S245F és N247T) a fehérje hinge-régiójában található és a foszforilációs mintázatban okoz változást. Az E2/E4 ORF régióban azonosított 58 bp deléción leolvasási kereteltolódást és korai stop kodon kialakulását eredményezi, amely valószínűleg működésképtelen E2 fehérje képződéséhez vezet; 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 alakítják ki az LCR bruttó 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 okozhatnak a vírusvariáns patogenitásában/virulenciájában a referenciához képest, de ezen eltérések háttérében nem a fő onkoproteinek, hanem sokkal inkább az E1, E2/E4 és E5a, valamint a kapszid proteinek és az LCR variabilitása állhat.

10. Summary

The etiological role of low-risk human papillomavirus (HPV) type 6 and 11 has been demonstrated in the development of many benign diseases, including recurrent respiratory papillomatosis, but the association between disease severity and genetic characteristics of the causative agents is even less well known. However, it is also increasingly known that HPV genotypes with high or low oncogenic potential show basic differences in the course of the disease caused and in the underlying genetic variability.

The aim of our work was to perform the complete genome and phylogenetic analysis of HPV6 and HPV11 sequences from newly enrolled patients as well as the new recurrences from already known patients. The potential effect of amino acid changes on the structure and function of viral proteins was investigated by *in silico* protein modelling. In transient transfection experiments, we performed functional analysis of different LCR patterns and examined the effect of E2 protein variants on LCR activity.

Based on the phylogenetic analysis of HPV6 genomes, our sequences belonged to the lineage A and to the sublineages B1 and B2; sequences belonging to the sublineage B1 were the most common. The results of the sequence analysis showed that nucleotide substitutions in HPV6 sublineage B1 sequences resulted in amino acid changes more frequently than those of HPV6 genomes classified as lineage A. In contrast, in case of lineage A sequences the LCRs showed higher variability.

In the functional analysis of the HPV6 LCRs, a gradient-like decrease in the LCR activity of the variants was observed; the highest activity was related to the HPV6 lineage A variants, followed by the LCR activity of the phylogenetic sublineages B1 and finally B3. These results support the hypothesis that there is a difference among the effect of each HPV6 (sub)lineages in the modulation of the cell proliferation. In contrast to sublineage B1, the lineage A LCR has more efficient transcription activating effect. The greater variability of the transcription factor binding sites identified in the HPV6A lineage may also support this.

In case of HPV11 genotype, both the ORFs and the LCR contain numerous polymorphisms in comparison to the reference sequence; greater variability was observed for E1, E2/E4, and E5a, as well as regions encoding capsid proteins and LCR. Based on the phylogenetic analysis, the dominance of the sublineage A2 was detected among our HPV11 sequences.

The K308R amino acid change identified in the E2 ORF is capable forming strong interaction between the stabilizing chains in E2 dimers but does not influence the DNA

binding, resulting in this E2 variant with less efficient enhancer activity than the reference E2. The unique amino acid alteration Q86K changed the negative surface charge of E2 (Q86) to positive (K86). The unique amino acid changes S245F and N247T in the hinge region of the protein cause changes in the phosphorylation pattern. The 58 bp long deletion identified in the E2/E4 ORF results in a frameshift and the formation of an early stop codon, which lead to the formation of truncated and non-functional E2 protein; the loss of E2 function may have contributed to the development of papillomatosis with dysplasia.

Co-transfection experiments with different LCR and E2 combinations confirm that the basic transcription activating effect of the LCR and the enhancer activity of the E2 protein together determine the gross transactivating effect of the LCR.

In conclusion, based on our results, it appears that in case of intratypic variants of low-risk HPV genotypes - similarly to high-risk ones – such genetic changes can be identified which can cause differences in the pathogenicity/virulence of the virus variants. In the background of these differences rather the variability of the E1, E2/E4, and E5a, as well as capsid proteins and LCR may be identified than the variation of the main oncoproteins.

11. Irodalomjegyzék

11.1 Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. World Health Organization. (2014). Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, October 2014. *Weekly Epidemiological Record = Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 89, 465-491.
2. Akst, L. M., Lee, W., Discolo, C., Knott, D., Younes, A., & Koltai, P. J. (2003). Stepped-dose protocol of cidofovir therapy in recurrent respiratory papillomatosis in children. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 129, 841-846.
3. Amiling, R., Meites, E., Querec, T. D., Stone, L., Singh, V., Unger, E. R., ... & Markowitz, L. E. (2021). Juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis in the United States, epidemiology and HPV types—2015–2020. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*
4. Arney, A., Bennett, K.M., (2010). Molecular diagnostics of human papillomavirus. *Laboratory Medicine*, 41, 523-530.
5. Arnott, S., Campbell-Smith, P. J., Chandrasekaran, R., (1976). Handbook of biochemistry an molecular biology. In: Fasman. G.P. (Ed.), *Nucleic Acids - Volume II, 3rd ed.* CRC Press, Cleveland, pp. 411-422.
6. Balcacer, P., Shergill, A., & Litkouhi, B. (2019). MRI of cervical cancer with a surgical perspective: staging, prognostic implications and pitfalls. *Abdominal Radiology*, 44, 2557-2571.
7. Bergvall, M., Melendy, T., Archambault, J., (2013). The E1 proteins. *Virology*, 445, 35-56.
8. Berumen, J., Ordoñez, R. M., Lazcano, E., Salmeron, J., Galvan, S. C., Estrada, R. A., ... & Madrigal-De La Campa, A., (2001). Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case–control study. *Journal of the National Cancer Institute*, 93, 1325-1330.
9. Best, S.R., Friedman, A.D., Landau-Zemer, T., Barbu, A.M., Burns, J.A., Freeman, M.W., Halvorsen, Y.D., Hillman, R.E., Zeitels, S.M., (2012). Safety and dosing of bevacizumab (avastin) for the treatment of recurrent respiratory papillomatosis. *Annals of Otolaryngology & Rhinology*, 121, 587-593.
10. Bielamowicz, S., Villagomez, V., Stager, S. V., & Wilson, W. R., (2002). Intralesional cidofovir therapy for laryngeal papilloma in an adult cohort. *The Laryngoscope*, 112, 696-699.
11. Bishop, B., Dasgupta, J., & Chen, X. S., (2007). Structure-based engineering of papillomavirus major capsid L1: controlling particle assembly. *Virology Journal*, 4, 1-6.
12. Blom, N., Sicheritz-Ponten, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., Brunak, S., (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4, 1633-1649.
13. Buck, C.B., Day, P.M., Trus, B.L., (2013). The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, 445, 169-174.
14. Burd, E.M., Dean, C.L., (2016). Human papillomavirus. *Microbiology Spectrum* 4,4-4.
15. Burk, R.D., Chen, Z., Harari, A., Smith, B.C., Kocjan, B.J., Maver, P.J., Poljak, M., (2011). Classification and nomenclature system for human Alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. *Acta Dermatovenereologica Alpina, Pannonica, et Adriatica*, 20, 113-123.
16. Campisi, P., Hawkes, M., Simpson, K., Canadian Juvenile Onset Recurrent Respiratory Papillomatosis Working, G., (2010). The epidemiology of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis derived from a population level national database. *The Laryngoscope*, 120, 1233-1245.

17. Castrignano, T., De Meo, P.D., Cozzetto, D., Talamo, I.G., Tramontano, A., (2006). The PMDB Protein Model Database. *Nucleic Acids Research*, 34, D306-309.
18. Chang, S. W., Liu, W. C., Liao, K. Y., Tsao, Y. P., Hsu, P. H., & Chen, S. L., (2014). Phosphorylation of HPV-16 E2 at serine 243 enables binding to Brd4 and mitotic chromosomes. *PloS One*, 9, e110882.
19. Chansaenroj, J., Theamboonlers, A., Junyangdikul, P., Supiyaphan, P., Poovorawan, Y., (2012). Whole genome analysis of human papillomavirus genotype 11 from cervix, larynx and lung. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13, 2619-2623.
20. Colovos, C., Yeates, T.O., (1993). Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science*, 2, 1511-1519.
21. Combrinck, C. E., Seedat, R. Y., Randall, C., Roodt, Y., & Burt, F. J. (2012). Novel HPV-6 variants of human papillomavirus causing recurrent respiratory papillomatosis in southern Africa. *Epidemiology & Infection*, 140, 1095-1101.
22. Conway, M. J., & Meyers, C., (2009). Replication and assembly of human papillomaviruses. *Journal of Dental Research*, 88, 307-317.
23. Coulombeau, B., Naiman, N., Ceruse, P., & Froehlich, P., (2002). Anti-viral injectable treatment (cidofovir) in laryngeal papillomatosis. *Revue de laryngologie-otologie-rhinologie*, 123, 315-320.
24. Cornet, I., Gheit, T., Franceschi, S., Vignat, J., Burk, R. D., Sylla, B. S., ... & IARC HPV Variant Study Group., (2012). Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *Journal of Virology*, 86, 6855-6861.
25. Danielewski, J. A., Garland, S. M., McCloskey, J., Hillman, R. J., & Tabrizi, S. N. (2013). Human papillomavirus type 6 and 11 genetic variants found in 71 oral and anogenital epithelial samples from Australia. *PloS One*, 8, e63892.
26. Dartmann, K., Schwarz, E., Gissmann, L., zur Hausen, H., (1986). The nucleotide sequence and genome organization of human papilloma virus type 11. *Virology* 151, 124-130.
27. Degenhardt, Y. Y., & Silverstein, S. (2001a). Interaction of zyxin, a focal adhesion protein, with the e6 protein from human papillomavirus type 6 results in its nuclear translocation. *Journal of virology*, 75, 11791-11802.
28. Degenhardt, Y. Y., & Silverstein, S. J. (2001b). Gps2, a protein partner for human papillomavirus E6 proteins. *Journal of virology*, 75, 151-160.
29. de Matos, R. P. A., Sichero, L., Mansur, I. M., do Bonfim, C. M., Bittar, C., Nogueira, R. L., ... & Rahal, P., (2013). Nucleotide and phylogenetic analysis of human papillomavirus types 6 and 11 isolated from recurrent respiratory papillomatosis in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 16, 282-289.
30. de Oliveira, C. M., Bravo, I. G., e Souza, N. C. S., Genta, M. L. N. D., Fregnani, J. H. T. G., Tacla, M., ... & Levi, J. E., (2015). High-level of viral genomic diversity in cervical cancers: a Brazilian study on human papillomavirus type 16. *Infection, Genetics and Evolution*, 34, 44-51.
31. de Oliveira, G.R., Siqueira, J.D., Finger-Jardim, F., Vieira, V.C., Silva, R.L., Gonçalves, C.V., Soares, E.A., Martinez, A.M.B.d., Soares, M.A., (2017). Characterisation of complete high-and low-risk human papillomavirus genomes isolated from cervical specimens in southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112, 728-731.
32. de Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U., zur Hausen, H., (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17-27.
33. Derkay, C.S., (1995). Task force on recurrent respiratory papillomas. A preliminary report. *Archives of Otolaryngology - Head & Neck Surgery*, 121, 1386-1391.
34. Derkay, C.S. (2001). Recurrent respiratory papillomatosis. *The Laryngoscope*, 111, 57-69.

35. Derkay, C.S., Bluher, A.E., (2019). Update on Recurrent Respiratory Papillomatosis. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 52, 669-679.
36. Dickens, P., Srivastava, G., Loke, S. L., & Larkin, S. (1991). Human papillomavirus 6, 11, and 16 in laryngeal papillomas. *The Journal of Pathology*, 165, 243-246.
37. DiMaio, D., Petti, L.M., (2013). The E5 proteins. *Virology*, 445, 99-114.
38. DiLorenzo, T. P., Tamsen, A., Abramson, A. L., & Steinberg, B. M., (1992). Human papillomavirus type 6a DNA in the lung carcinoma of a patient with recurrent laryngeal papillomatosis is characterized by a partial duplication. *Journal of General Virology*, 73, 423-428.
39. Doorbar, J., (2005). The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, 32, S7-15.
40. Doorbar, J., (2013). The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*, 445, 80-98.
41. Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., Murakami, I., (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology*, 25, 2-23.
42. Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I.G., Stoler, M., Broker, T.R., Stanley, M.A., (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30, F55-70.
43. Farré, D., Roset, R., Huerta, M., Adsua, J.E., Roselló, L., Albà, M.M., Messegue, X., (2003). Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Research*, 31, 3651-3653.
44. Fortes, H.R., von Ranke, F.M., Escuissato, D.L., Araujo Neto, C.A., Zanetti, G., Hochegger, B., Souza, C.A., Marchiori, E., (2017). Recurrent respiratory papillomatosis: A state-of-the-art review. *Respiratory Medicine*, 126, 116-121.
45. Förster, G., Boltze, C., Seidel, J., Pawlita, M., Müller, A., (2008). Juvenile laryngeal papillomatosis--immunisation with the polyvalent vaccine gardasil. *Laryngo-rhinotologie*, 87, 796-799.
46. Gáll, T., Kis, A., Fehér, E., Gergely, L., & Szarka, K., (2011). 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 Research*, 92, 356-358.
47. Gáll, T., Kis, A., Tatar, T.Z., Kardos, G., Gergely, L., Szarka, K., (2013). Genomic differences in the background of different severity in juvenile-onset respiratory papillomatosis associated with human papillomavirus type 11. *Medical Microbiology and Immunology*, 202, 353-363.
48. Gradissimo, A., & Burk, R. D., (2017). Molecular tests potentially improving HPV screening and genotyping for cervical cancer prevention. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 17, 379-391.
49. Grassmann, K., Wilczynski, S. P., Cook, N., Rapp, B., & Iftner, T., (1996). HPV6 variants from malignant tumors with sequence alterations in the regulatory region do not reveal differences in the activities of the oncogene promoters but do contain amino acid exchanges in the E6 and E7 proteins. *Virology*, 223, 185-197.
50. Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4, 9.
51. Healy, G. B., Gelber, R. D., Trowbridge, A. L., Grundfast, K. M., Ruben, R. J., & Price, K. N., (1988). Treatment of recurrent respiratory papillomatosis with human leukocyte interferon. *New England Journal of Medicine*, 319, 401-407.
52. Heinzl, P. A., Chan, S. Y., Ho, L., O'Connor, M., Balaram, P., Campo, M. S., ... & Pfister, H., (1995). Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 1746-1754.

53. Hocevar-Boltezar, I., Maticic, M., Sereg-Bahar, M., Gale, N., Poljak, M., Kocjan, B., Zargi, M., (2014). Human papilloma virus vaccination in patients with an aggressive course of recurrent respiratory papillomatosis. *European Archives of Oto-rhino-laryngology*, 271, 3255-3262.
54. Hofmann, K.J., Cook, J.C., Joyce, J.G., Brown, D.R., Schultz, L.D., George, H.A., Rosolowsky, M., Fife, K.H., Jansen, K.U., (1995). Sequence determination of human papillomavirus type 6a and assembly of virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology*, 209, 506-518.
55. Ikegami, T., Hirakawa, H., Tsukahara, N., Murakami, A., Kise, N., Kiyuna, A., ... & Ganaha, A. (2021a). Coordinated Expression of HPV-6 Genes with Predominant E4 and E5 Expression in Laryngeal Papilloma. *Microorganisms*, 9, 520.
56. Ikegami, T., Kise, N., Kinjyo, H., Kondo, S., Suzuki, M., Tsukahara, N., ... & Hirakawa, H. (2021b). Development of Antibodies against HPV-6 and HPV-11 for the Study of Laryngeal Papilloma. *Viruses*, 13, 2024.
57. Ivancic, R., Iqbal, H., deSilva, B., Pan, Q., Matrk, L., (2018). Current and future management of recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology*, 3, 22-34.
58. Jelen, M. M., Chen, Z., Kocjan, B. J., Burt, F. J., Chan, P. K., Chouhy, D., ... & Poljak, M., (2014). Global genomic diversity of human papillomavirus 6 based on 724 isolates and 190 complete genome sequences. *Journal of Virology*, 88, 7307-7316.
59. Jelen, M. M., Chen, Z., Kocjan, B. J., Hošnjak, L., Burt, F. J., Chan, P. K., ... & Poljak, M. (2016). Global genomic diversity of human papillomavirus 11 based on 433 isolates and 78 complete genome sequences. *Journal of Virology*, 90, 5503-5513.
60. Kinkorová, J. (2016). Biobanks in the era of personalized medicine: objectives, challenges, and innovation. *EPMA Journal*, 7, 1-12.
61. Kocjan, B.J., Jelen, M.M., Maver, P.J., Seme, K., Poljak, M., (2011). Pre-vaccination genomic diversity of human papillomavirus genotype 6 (HPV 6): a comparative analysis of 21 full-length genome sequences. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 1805-1810.
62. Kocjan, B. J., Gale, N., Hočevr Boltežar, I., Seme, K., Fujs Komloš, K., Hošnjak, L., ... & Poljak, M., (2013). Identical human papillomavirus (HPV) genomic variants persist in recurrent respiratory papillomatosis for up to 22 years. *The Journal of Infectious Diseases*, 207, 583-587.
63. Kónya, J., Veress, G., Juhász, A., Szarka, K., Sápy, T., Hernádi, Z., Gergely, L., (2000). Additional human papillomavirus types detected by the hybrid capture tube test among samples from women with cytological and colposcopic atypia. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 408-411.
64. Kovelman, R., Bilter, G.K., Roman, A., Brown, D.R., Barbosa, M.S., (1999). Human papillomavirus type 6: classification of clinical isolates and functional analysis of E2 proteins. *Journal of General Virology*, 80, 2445-2451.
65. Kukimoto, I., Aihara, S., Yoshiike, K., & Kanda, T. (1998). Human papillomavirus oncoprotein E6 binds to the C-terminal region of human minichromosome maintenance 7 protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 249, 258-262.
66. Kühne, C., & Banks, L. (1998). E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 34302-34309.
67. Labedz, G., Scatolini, M. L., Ruvinsky, S., & Rodriguez, H. A. (2021). Factors Related to Extralaryngeal Spread in Juvenile Recurrent Respiratory Papillomatosis. *The Laryngoscope*, 131, 1652-1656.
68. Larson, D.A., Derkay, C.S., (2010). Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis. *APMIS* 118, 450-454.

69. Laskowski, R.A., Swindells, M.B., (2011). LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51, 2778-2786.
70. Lee, H., Lee, E.J., (2016). HPV infection and p16 promoter methylation as predictors of ASC-US/LSIL progression. *Cancer Cytopathology*, 124, 58-65.
71. Lee, K., Magalhaes, I., Clavel, C., Briolat, J., Birembaut, P., Tommasino, M., & Zehbe, I. (2008). Human papillomavirus 16 E6, L1, L2 and E2 gene variants in cervical lesion progression. *Virus Research*, 131, 106-110.
72. Lee, A. S., & Rosen, C. A., (2004). Efficacy of cidofovir injection for the treatment of recurrent respiratory papillomatosis. *Journal of Voice*, 18, 551-556.
73. Leonard, B., Kridelka, F., Delbecq, K., Goffin, F., Demoulin, S., Doyen, J., Delvenne, P., (2014). A clinical and pathological overview of vulvar condyloma acuminatum, intraepithelial neoplasia, and squamous cell carcinoma. *BioMed Research International*, 2014, 480573.
74. Limsukon, A., Susanto, I., Soo Hoo, G.W., Dubinett, S.M., Batra, R.K., (2009). Regression of recurrent respiratory papillomatosis with celecoxib and erlotinib combination therapy. *Chest*, 136, 924-926.
75. Lindeberg, H., Elbrond, O., (1990). Laryngeal papillomas: the epidemiology in a Danish subpopulation 1965-1984. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*, 15, 125-131.
76. Lizano, M., De la Cruz-Hernandez, E., Carrillo-Garcia, A., Garcia-Carranca, A., de Leon-Rosales, S.P., Duenas-Gonzalez, A., Hernandez-Hernandez, D.M., Mohar, A., (2006). Distribution of HPV16 and 18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions, and cervical cancer in a Mexican population. *Gynecologic Oncology*, 102, 230-235.
77. Major, T., Szarka, K., Sziklai, I., Gergely, L., & Czeglédy, J. (2005). The characteristics of human papillomavirus DNA in head and neck cancers and papillomas. *Journal of clinical pathology*, 58, 51-55.
78. Major, T., Sziklai, I., Czeglédy, J., Gáll, T., Gergely, L., Szarka, K., (2008). Follow-up of HPV DNA copy number in cidofovir therapy of recurrent respiratory papillomatosis. *Anticancer Research*, 28, 2169-2174.
79. Mandishora, R. S. D., Gjøtterud, K. S., Lagström, S., Stray-Pedersen, B., Duri, K., Chin'ombe, N., ... & Rounge, T. B., (2018). Intra-host sequence variability in human papillomavirus. *Papillomavirus Research*, 5, 180-191.
80. Maturo, S., Hartnick, C.J., (2010). Use of 532-nm pulsed potassium titanyl phosphate laser and adjuvant intralesional bevacizumab for aggressive respiratory papillomatosis in children: initial experience. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 136, 561-565.
81. Maver, P.J., Kocjan, B.J., Seme, K., Potocnik, M., Gale, N., Poljak, M., (2011). Prevaccination genomic diversity of human papillomavirus genotype 11: a study on 63 clinical isolates and 10 full-length genome sequences. *Journal of Medical Virology*, 83, 461-470.
82. McBride, A.A., (2013). The papillomavirus E2 proteins. *Virology*, 445, 57-79.
83. McBride, A. A., & Warburton, A., (2017). The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathogens*, 13, e1006211.
84. McGlennen, R.C., Adams, G.L., Lewis, C.M., Faras, A.J., Ostrow, R.S., (1993). Pilot trial of ribavirin for the treatment of laryngeal papillomatosis. *Head & Neck*, 15, 504-512; discussion 512-503.
85. Measso do Bonfim, C., Simão Sobrinho, J., Lacerda Nogueira, R., Salgado Kupper, D., Cardoso Pereira Valera, F., Lacerda Nogueira, M., ... & Sichero, L., (2015).

- Differences in transcriptional activity of human papillomavirus type 6 molecular variants in recurrent respiratory papillomatosis. *PLoS One*, 10, e0132325.
86. Meszner, Z., Jankovics, I., Nagy, A., Gerlinger, I., Katona, G., (2015). Recurrent laryngeal papillomatosis with oesophageal involvement in a 2 year old boy: successful treatment with the quadrivalent human papillomatosis vaccine. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 79, 262-266.
 87. Minhas, S., Manseck, A., Watya, S., Hegarty, P.K., (2010). Penile cancer—prevention and premalignant conditions. *Urology*, 76, S24-S35.
 88. Mirabello, L., Yeager, M., Yu, K., Clifford, G. M., Xiao, Y., Zhu, B., ... & Schiffman, M. (2017). HPV16 E7 genetic conservation is critical to carcinogenesis. *Cell*, 170, 1164-1174.
 89. Mudry, P., Vavrina, M., Mazanek, P., Machalova, M., Litzman, J., Sterba, J., (2011). Recurrent laryngeal papillomatosis: successful treatment with human papillomavirus vaccination. *Archives of Disease in Childhood*, 96, 476-477.
 90. Muller, M., & Demeret, C., (2012). Suppl 2: The HPV E2-Host Protein-Protein Interactions: A Complex Hijacking of the Cellular Network. *The Open Virology Journal*, 6, 173.
 91. Naiman, A. N., Ceruse, P., Coulombeau, B., & Froehlich, P., (2003). Intralesional cidofovir and surgical excision for laryngeal papillomatosis. *The Laryngoscope*, 113, 2174-2181.
 92. Naiman, A. N., Ayari, S., Nicollas, R., Landry, G., Colombeau, B., & Froehlich, P., (2006a). Intermediate-term and long-term results after treatment by cidofovir and excision in juvenile laryngeal papillomatosis. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 115, 667-672.
 93. Naiman, A. N., Abedipour, D., Ayari, S., Fresnel, E., Coulombeau, B., Bour, J. B., & Froehlich, P., (2006b). Natural history of adult-onset laryngeal papillomatosis following multiple cidofovir injections. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 115, 175-181.
 94. Newfield, L., Goldsmith, A., Bradlow, H.L., Auborn, K., (1993). Estrogen metabolism and human papillomavirus-induced tumors of the larynx: chemo-prophylaxis with indole-3-carbinol. *Anticancer Research*, 13, 337-341.
 95. Nodarse-Cuní, H., Iznaga-Marín, N., Viera-Alvarez, D., Rodríguez-Gómez, H., Fernández-Fernández, H., Blanco-López, Y., ... & Cuban Group for the Study of Interferon in Recurrent Respiratory Papillomatosis., (2004). Interferon alpha-2b as adjuvant treatment of recurrent respiratory papillomatosis in Cuba: National Programme (1994–1999 report). *The Journal of Laryngology & Otolaryngology*, 118, 681-687.
 96. Nyirjesy, S., Osmundson, P., Matrka, L., (2020). Spontaneous Regression of Recurrent Respiratory Papillomatosis with HPV Vaccination: A Case Study. *Journal of Voice*.
 97. O'Connor, M., Chan, S.-Y., Bernard, H.-U., (1995). Transcription factor binding sites in the long control region of genital HPVs. *Human Papillomaviruses*, 21-40.
 98. Petrosky, E., Bocchini Jr, J.A., Hariri, S., Chesson, H., Curtis, C.R., Saraiya, M., Unger, E.R., Markowitz, L.E., (2015). Use of 9-valent human papillomavirus (HPV) vaccine: updated HPV vaccination recommendations of the advisory committee on immunization practices. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 64, 300.
 99. Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25, 1605-1612.
 100. Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Meng, E.C., Couch, G.S., Croll, T.I., Morris, J.H., Ferrin, T.E., (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, 30, 70-82.

101. Pinatti, L. M., Walline, H. M., & Carey, T. E. (2018). Human papillomavirus genome integration and head and neck cancer. *Journal of Dental Research*, 97, 691-700.
102. Rabah, R., Lancaster, W., Thomas, R., Gregoire, L., (2001). Human papillomavirus-11-associated recurrent respiratory papillomatosis is more aggressive than human papillomavirus-6-associated disease. *Pediatric and Developmental Pathology*, 4, 68-72.
103. Rady, P. L., Schnadig, V. J., Weiss, R. L., Hughes, T. K., & Tyring, S. K., (1998). Malignant transformation of recurrent respiratory papillomatosis associated with integrated human papillomavirus type 11 DNA and mutation of p53. *The Laryngoscope*, 108, 735-740.
104. Rahbar, R., Vargas, S.O., Folkman, J., McGill, T.J., Healy, G.B., Tan, X., Brown, L.F., (2005). Role of vascular endothelial growth factor-A in recurrent respiratory papillomatosis. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 114, 289-295.
105. Reidy, P. M., Dedo, H. H., Rabah, R., Field, J. B., Mathog, R. H., Gregoire, L., & Lancaster, W. D., (2004). Integration of human papillomavirus type 11 in recurrent respiratory papilloma-associated cancer. *The Laryngoscope*, 114, 1906-1909.
106. Roberts, S., Ashmole, I., Rookes, S. M., & Gallimore, P. H. (1997). Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1--E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *Journal of virology*, 71, 3554-3562.
107. Rogers, A., Waltke, M., & Angeletti, P. C., (2011). Evolutionary variation of papillomavirus E2 protein and E2 binding sites. *Virology Journal*, 8, 1-12.
108. Rogers, D.J., Ojha, S., Maurer, R., Hartnick, C.J., (2013). Use of adjuvant intralesional bevacizumab for aggressive respiratory papillomatosis in children. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 139, 496-501.
109. Roman, A., Munger, K., (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, 445, 138-168.
110. Rosen, C.A., Bryson, P.C., (2004). Indole-3-carbinol for recurrent respiratory papillomatosis: long-term results. *Journal of Voice*, 18, 248-253.
111. Schwarz, E., Durst, M., Demankowski, C., Lattermann, O., Zech, R., Wolfsperger, E., Suhai, S., zur Hausen, H., (1983). DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b. *The EMBO Journal*, 2, 2341-2348.
112. Seedat, R. Y., Combrinck, C. E., Bester, P. A., Lee, J. Y., & Burt, F. J., (2016). Determination of the complete genome and functional analysis of HPV6 isolate VBD19/10 from a patient with aggressive recurrent respiratory papillomatosis. *Epidemiology & Infection*, 144, 2128-2135.
113. Seedat, R., (2020). Juvenile-Onset Recurrent Respiratory Papillomatosis Diagnosis and Management—A Developing Country Review. *Pediatric Health, Medicine and Therapeutics*, 11, 39.
114. Sekhar, V., & McBride, A. A., (2012). Phosphorylation regulates binding of the human papillomavirus type 8 E2 protein to host chromosomes. *Journal of Virology*, 86, 10047-10058.
115. Shah, K.V., Stern, W.F., Shah, F.K., Bishai, D., Kashima, H.K., (1998). Risk factors for juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 17, 372-376.
116. Sichero, L., Ferreira, S., López, R. V., Mello, B. P., Costa, V., El-Achkar, V. N., ... & Villa, L. L. (2021). Prevalence of human papillomavirus 6 and 11 variants in recurrent respiratory papillomatosis. *Journal of Medical Virology*, 93, 3835-3840.
117. Sidell, D.R., Nassar, M., Cotton, R.T., Zeitels, S.M., de Alarcon, A., (2014). High-dose sublesional bevacizumab (avastin) for pediatric recurrent respiratory papillomatosis. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 123, 214-221.

118. Silverberg, M.J., Thorsen, P., Lindeberg, H., Grant, L.A., Shah, K.V., (2003). Condyloma in pregnancy is strongly predictive of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Obstetrics & Gynecology*, 101, 645-652.
119. Siqueira, J.D., Alves, B.M., Prellwitz, I.M., Furtado, C., Meyrelles, A.R., Machado, E.S., Seuanez, H.N., Soares, M.A., Soares, E.A., (2016). Identification of novel human papillomavirus lineages and sublineages in HIV/HPV-coinfected pregnant women by next-generation sequencing. *Virology*, 493, 202-208.
120. Smith, B., Chen, Z., Reimers, L., Van Doorslaer, K., Schiffman, M., DeSalle, R., ... & Burk, R. D., (2011). Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies. *Plos One*, 6, e21375.
121. Smotkin, D., Prokoph, H., & Wettstein, F. O., (1989). Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *Journal of Virology*, 63, 1441-1447.
122. Snoeck, R., Wellens, W., Desloovere, C., Ranst, M. V., Naesens, L., De Clercq, E., & Feenstra, L., (1998). Treatment of severe laryngeal papillomatosis with intralesional injections of cidofovir [(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) cytosine]. *Journal of Medical Virology*, 54, 219-225.
123. Sun, L., Shen, X., Liu, Y., Zhang, G., Wei, J., Zhang, H., Zhang, E., Ma, F., (2010). The location of endogenous wild-type p53 protein in 293T and HEK293 cells expressing low-risk HPV-6E6 fusion protein with GFP. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 42, 230-235.
124. Suter-Montano, T., Montaña, E., Martínez, C., Plascencia, T., Sepulveda, M. T., & Rodríguez, M., (2013). Adult recurrent respirator papillomatosis: a new therapeutic approach with pegylated interferon alpha 2a (Peg-IFN α -2a) and GM-CSF. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 148, 253-260.
125. Tenti, P., Zappatore, R., Migliora, P., Spinillo, A., Belloni, C., Carnevali, L., (1999). Perinatal transmission of human papillomavirus from gravidas with latent infections. *Obstetrics & Gynecology*, 93, 475-479.
126. Tornesello, M. L., Buonaguro, F. M., Buonaguro, L., Salatiello, I., Beth-Giraldo, E., & Giraldo, G., (2000). Identification and functional analysis of sequence rearrangements in the long control region of human papillomavirus type 16 Af-1 variants isolated from Ugandan penile carcinomas. *Journal of General Virology*, 81, 2969-2982.
127. Trott, O., Olson, A.J., (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31, 455-461.
128. Tsikouras, P., Zervoudis, S., Manav, B., Tomara, E., Iatrakis, G., Romanidis, C., ... & Galazios, G. (2016). Cervical cancer: screening, diagnosis and staging. *J buon*, 21, 320-325.
129. Tuszynska, I., Magnus, M., Jonak, K., Dawson, W., Bujnicki, J.M., (2015). NPDock: a web server for protein-nucleic acid docking. *Nucleic acids research*, 43, W425-W430.
130. Ure, A.E., Forslund, O., (2012). Lack of methylation in the upstream region of human papillomavirus type 6 from aerodigestive tract papillomas. *Journal of Virology*, 86, 13790-13794.
131. Vande Pol, S.B., Klingelhutz, A.J., (2013). Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*, 445, 115-137.
132. Van Doorslaer, K., (2013). Evolution of the papillomaviridae. *Virology*, 445, 11-20.
133. Villa, L. L., Sichero, L., Rahal, P., Caballero, O., Ferenczy, A., Rohan, T., & Franco, E. L., (2000). Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *Journal of General Virology*, 81, 2959-2968.

134. Wang, J.W., Roden, R.B., (2013). L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, 445, 175-186.
135. Wang, R., Pan, W., Jin, L., Huang, W., Li, Y., Wu, D., Gao, C., Ma, D., Liao, S., (2020). Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: Opportunity and challenge. *Cancer Letters*, 471, 88-102.
136. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T., (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46, W296-W303.
137. Wiatrak, B. J., Wiatrak, D. W., Broker, T. R., & Lewis, L., (2004). Recurrent respiratory papillomatosis: a longitudinal study comparing severity associated with human papilloma viral types 6 and 11 and other risk factors in a large pediatric population. *The Laryngoscope*, 114, 1-23.
138. Wilcox, L.J., Hull, B.P., Baldassari, C.M., Derkay, C.S., (2014). Diagnosis and management of recurrent respiratory papillomatosis. *The Pediatric Infection Disease Journal*, 33, 1283-1284.
139. Wu, X., Zhang, C., Feng, S., Liu, C., Li, Y., Yang, Y., Gao, J., Li, H., Meng, S., Li, L., (2009). Detection of HPV types and neutralizing antibodies in Gansu province, China. *Journal of Medical Virology*, 81, 693-702.
140. Xiao, Y., Zhang, X., Ma, L., Wang, J., (2021). Long-term outcomes of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Clinical Otolaryngology*, 46, 161-167.
141. Xin, C. Y., Matsumoto, K., Yoshikawa, H., Yasugi, T., Onda, T., Nakagawa, S., ... & Taketani, Y., (2001). Analysis of E6 variants of human papillomavirus type 33, 52 and 58 in Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia/cervical cancer in relation to their oncogenic potential. *Cancer Letters*, 170, 19-24.
142. Xu, H., Ling, Y., Xi, Y., Ma, H., Wang, H., Hu, H.M., Liu, Q., Li, Y.M., Deng, X.T., Yang, S.X., Delwart, E., Zhang, W., (2019). Viral metagenomics updated the prevalence of human papillomavirus types in anogenital warts. *Emerging Microbes & Infections*, 8, 1291-1299.
143. Yang, J., Zhang, Y., (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*, 43, W174-181.
144. Yang, W., Deng, L., (2020). PreDBA: A heterogeneous ensemble approach for predicting protein-DNA binding affinity. *Scientific Reports*, 10, 1278.
145. Yuan, H., Myers, S., Wang, J., Zhou, D., Woo, J.A., Kallakury, B., Ju, A., Bazylewicz, M., Carter, Y.M., Albanese, C., (2012). Use of reprogrammed cells to identify therapy for respiratory papillomatosis. *New England Journal of Medicine*, 367, 1220-1227.
146. Zehbe, I., Wilander, E., Delius, H., & Tommasino, M., (1998). Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Research*, 58, 829-833.
147. Zehbe, I., Richard, C., DeCarlo, C. A., Shai, A., Lambert, P. F., Lichtig, H., ... & Sherman, L., (2009). Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology*, 383, 69-77.
148. Zeitels, S.M., Barbu, A.M., Landau-Zemer, T., Lopez-Guerra, G., Burns, J.A., Friedman, A.D., Freeman, M.W., Halvorsen, Y.D., Hillman, R.E., (2011). Local injection of bevacizumab (Avastin) and angiolytic KTP laser treatment of recurrent respiratory papillomatosis of the vocal folds: a prospective study. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 120, 627-634.

11.2 Internetes források

- Papillomavirus Episteme (PaVe) adatbázis <https://pave.niaid.nih.gov/>
- Global Cancer Observatory, <https://gco.iarc.fr>

11.3 Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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 laterális 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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.02.17.



12. Tárgyszavak

12.1 *Magyar tárgyszavak:*

- Humán papillomavírus
- Alacsony onkogén kockázatú
- Rekurrens légúti papillomatózis
- Genitális léziók
- Filogenetikai elemzés
- E2 fehérje
- LCR
- Fehérje modellezés
- Funkcionális vizsgálat

12.2 *English keywords:*

- Human papillomavirus
- Low-risk
- Recurrent respiratory papillomatosis
- Genital lesions
- Phylogenetic analysis
- E2 viral protein
- LCR
- Protein modelling
- Functional analysis

13. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet nyilvánítani elsősorban témavezetőmnek, dr. Szarka Krisztina egyetemi docensnek, hogy kiemelkedő szakmai vezetésével és segítségével hozzájárult kutatómunkám elvégzéséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Kónya József professzor úrnak, az Orvosi Mikrobiológiai Intézet vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra az intézetben való kutatómunkát.

Köszönöm dr. Szűcs Attilának és dr. Major Tamásnak a mintagyűjtésben nyújtott segítségét.

Köszönöm dr. Pethő Zoltánnak a fehérjemodellek elkészítésében nyújtott segítségét.

Köszönöm két tutoromnak, dr. Csoma Eszternek és dr. Szűcs Attilának a szakmai tanácsaikat és segítségüket.

Valamint köszönettel tartozom kollégáimnak, dr. Kardos Gábornak, Balázs Bencének és az Orvosi Mikrobiológiai Intézet valamennyi dolgozójának, hogy segítettek és támogatták a munkámat.

14. Mellékletek

14.1 melléklet: Aminosavak rövidítései

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartát	Asp	D
Cisztein	Cys	C
Fenilalanin	Phe	F
Glicin	Gly	G
Glutamát	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Hisztidin	His	H
Izoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lizin	Lys	K
Metionin	Met	M
Prolin	Pro	P
Szerin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tirozin	Tyr	Y
Triptofán	Trp	W
Valin	Val	V

14.2 melléklet: HPV6 pozitív páciensek adatai

Beteg azonosító	Nem	Génbanki azonosító	Életkor a diagnózis idején (év)	Lokalizáció	Beavatkozások száma	Tracheostomia	Extralaringeális terjedés	Adjuváns terápia
AO-RRP1/6	F	MK313769	28	gége	8	Nem	Nem	CDV
AO-RRP2/6	F	MK313770	25	garat, gége	1	Nem	N.R.	Nem
AO-RRP3/6	F	MK313771	36	orrüreg	6	Nem	N.R.	CDV
AO-RRP4/6	F	MK313772	71	gége	2	Nem	Nem	Nem
AO-RRP5/6	F	MK313773	22	garat	8	Nem	Nem	CDV
AO-RRP6/6	F	MK313774	30	gége	2	Nem	Nem	Nem
AO-RRP7/6	F	MK313775	27	gége	2	Nem	Nem	Nem
JO-RRP1/6	F	MK313776	12	gége	5	Nem	Nem	Nem
JO-RRP2/6 ¹	N	MK313777	8	gége	5	Nem	Nem	Nem
CAC1/6	N	MK313778	41	vulva	3	N.R.	N.R.	Podophyllin
LSIL1/6	N	MK313779	23	cervix	Mintavétel citológiai vizsgálatokhoz és HPV kimutatáshoz	N.R.	N.R.	N.R.
LP1/6	F	MK313780	28	pénisz	Mintavétel citológiai vizsgálatokhoz és HPV kimutatáshoz	N.R.	N.R.	N.R.
ASCUS1/6	N	MK313781	51	cervix	Mintavétel citológiai vizsgálatokhoz és HPV kimutatáshoz	N.R.	N.R.	N.R.

AO-RRP – felnőttkori rekurrens légúti papillomatózis (adult onset recurrent respiratory papillomatosis), JO-RRP – fiatalkori rekurrens légúti papillomatózis (juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis), CAC – condyloma acuminatum, LSIL – enyhe fokú laphámsejtes intraepiteliális lézió (low grade squamous cell intraepithelial lesion), LP – leukoplakia penis, ASCUS - ismeretlen jelentőségű laphámsejtes elváltozás (atypical squamous cells of undetermined significance), F – férfi, N – nő, CDV – cidofovir, IFN – interferon; N.R. – nem releváns

¹Egészséges nyálkahártyáról vett exfoliatív sejt minta is HPV6 pozitivitást mutatott, azonban teljes genom szekvenáláshoz nem volt elegendő víruskópia a mintában.

14.3 melléklet: HPV11 pozitív páciensek adatai

Beteg azonosító		Nem	Génbanki azonosító	Diagnózis kora (év)	Lokalizáció	Beavatkozások száma	Tracheostomia	Extralaryngeális terjedés	Adjuváns terápia
JO-RRP1/11		F	HE574701	2	gége	9	igen	nem	IFN
JO-RRP2/11 ¹		N	HE754702 MK313763	3	gége, garat, szinuszok, orrüreget, légcső	30<	igen	igen	IFN
JO-RRP3/11		N	HE574703	12	gége	1	nem	nem	nem
JO-RRP4/11		F	HE574704	6	gége	6	igen	nem	IFN
JO-RRP5/11		F	HE574705	2	gége	1	igen	nem	nem
JO-RRP6/11 ²		F	FR872717	1,5	gége, szájpádlás	60 <	igen	igen	IFN, CDV
JO-RRP7/11 ³		N	MK313764	8	gége, garat, szinuszok, orrüreget, légcső	40<	igen	igen	IFN, CDV
JO-RRP8/11 ⁴		F	MK313765	4	gége	4	nem	nem	nem
JO-RRP9/11 ⁵		N	MK313766	8	gége	5	nem	nem	nem
JO-RRP10/11		N	MN788368	3	orrüreget	1	nem	nem	nem
AO-RRP1/11		F	MK313761	48	orrüreget	2	nem	nem	nem
AO-RRP2/11		N	MK313762	29	gége	1	nem	nem	nem
AO-RRP3/11		F	MW404328	29	gége	4	nem	nem	nem
CAC/11		N	MK313767	57	vulva	1	N.R.	N.R.	nem
CA/11		N	MK313768	25	cervix	Mintavétel citológiai vizsgálathoz és HPV kimutatáshoz	N.R.	N.R.	nem

AO-RRP – felnőttkori rekurrens légúti papillomatózis (adult onset recurrent respiratory papillomatosis), JO-RRP – fiatalkori rekurrens légúti papillomatózis (juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis), CAC – condyloma acuminatum, CA – cervikális atípiából származó citológiai minta, F – férfi, N – nő, CDV – cidofovir, IFN – interferon; N.R. – nem releváns

¹A papillóma szövetből és egészséges nyálkahártya felszínéről vett exfoliatív sejtből kimutatott HPV11 genomok szekvenálása a 2016-os recidívából történt; a szövetből kimutatott HPV11 identikus volt a korábban vizsgált szekvenciával (HE574702) (Gáll és mtsai., 2013); míg az exfoliatív sejtekből kimutatott HPV11 szekvenciában eltérést találtunk, így ezt a genomot az MK313763 génbanki azonosító alatt töltöttük föl a Génbankba.

²A 2015-ös és 2016-os recidívából, valamint egészséges nyálkahártya felszínéről vett exfoliatív sejtekből kimutatott HPV11 genom identikus volt a kutatócsoport által korábban vizsgált HPV11 genommal (génbanki azonosító: FR872717)

³Három lokalizációból (szupraglottis, szubglottis és tracheostoma helye) származó mintát vizsgáltunk, a kimutatott HPV11 szekvenciák identikusak voltak, így az MK313764 génbank azonosítóval történt meg a genom feltöltése a Génbankba.

⁴2013-ban és 2017-ben történt mintavétel mintáit elemeztük, a két HPV11 genom azonos volt, MK313765 azonosítóval történt meg a genom feltöltése a Génbankba.

⁵2006-ban és 2015-ben történt mintavétel mintáit vizsgáltuk, a szekvenciák identikusak voltak, így a HPV11 szekvencia MK313766 azonosítóval került feltöltésre a génbanki adattárba.

14.4 melléklet: HPV6 teljes genom PCR reakcióhoz használt primerek szekvenciái és anellációs hőmérsékletek

Primer	Genomi lokalizáció	Primer szekvencia (5'-3')	Anellációs hőmérséklet	Amplimer mérete
1 S	22/41–23/42	aaaaataggagggaccgaaa	60 °C	688 bp
1 AS	693/710–694/711	atccacagcaacagggtca		
2 S	399-416	cgtgctaattcggtgcta	57 °C	796 bp
2 AS	1178-1195	ctttttggctgtcttgt		
3 S	824-844	taacaacgatggcggacgat	50 °C	902 bp
3 AS	1725-1745	tagcgttgcaagtgtacgtg		
4 S	961-978	tgggtatgacatgggtgga	57 °C	815 bp
4 AS	1758-1776	ctttgtattttggtggct		
5 S	1706-1726	cacgtacacttgcaacgcta	50 °C	1066 bp
5 AS	2771-2791	ctaacaactgttctggcac		
6 S	2079-2096	cagaaatgaggaagatgt	52 °C	856 bp
6 AS	2918-2935	ttatgtcctttgtctcg		
7 S	2711-2729	gaggacgaggaagatggaa	57 °C	661 bp
7 AS	3354-3372	cgggggtgtatgtagaga		
8 S	3237-3255	gtaaaagaggcagaaaagt	55 °C	859 bp
8 AS	4078-4096	agtaggaaaaattgcaagg		
9 S	3903-3920	gtacaatatgctgcagga	55 °C	738 bp
9 AS	4624-4641	ggaacatagccagtacga		
10 S	4584-4601	ttggaggggtgggtatag	54 °C	656 bp
10 AS	5222-5240	cagggtgcattgtgtataga		
11 S	5136-5153	catttcttccactcctc	55 °C	823 bp
11 AS	5942-5959	gttttgttagcccgttt		
12 S	5825-5842	tcctcctaaccctgtatc	55 °C	726 bp
12 AS	6534-6551	tctggcaaacatttggtc		
13 S	6391-6410	ttgggtgctatgaatttgct	60 °C	687 bp
13 AS	7061-7078	tttcaggagtgggcttt		
14 S	6821-6839	aactacatcttccacatac	50 °C	679 bp
14 AS	7482-7500	cacataaacacacatacac		
15 S	7322-7340	gtgtgtatgtactgttatg	52 °C	700 bp
15 AS	8005-8022	gaaatatgtagggtgtgg		
16 S	7253-7270	tgctgccctaaacgtaa	58 °C	754 bp
16 AS	88-105	cataatgcctcgtttgct		

S szensz, AS antiszensz, bp bázispár

14.5 melléklet: HPV11 teljes genom PCR reakcióhoz használt primerek szekvenciái és anellációs hőmérsékletek

ORF	Primer	Genomi lokalizáció	Primer szekvencia (5'-3')	Anellációs hőmérséklet	Amplimer mérete
E6	E6 S	86-106	tagcagacgaggcattatgg	60°C	447 bp
	E6 AS	513-533 (C)	gcatgtgtccagcagtgtga		
E7	E7 S	514-534	tacactgctggacaacatgc	50°C	328 bp
	E7 AS	822-842 (C)	tcgtccgccatcctgttat		
E1	E1A S1	824-844	taacaaggatggcggacgat	50°C	545 bp
	E1A AS1	1349-1369 (C)	ccgcctctctatgttccacc		
	E1A S2	1329-1349	gagggacatagagggtgagg	50°C	550 bp
	E1A AS2	1859-1879 (C)	tatgttcaataacggtctgg		
	E1B S1	1861-1881	cagaccgttattgaacatag	50°C	566 bp
	E1B AS1	2407-2427 (C)	atatgtccaacatggttgtg		
	E1B S2	2361-2381	gctacagccactaacggatg	50°C	410 bp
	E1B AS2	2751-2771 (C)	ctaacaactgatcctggcac		
E2	E2 S1	2717-2737	aggaagatggaagcaatagc	50°C	608 bp
	E2 AS1	3305-3325 (C)	gctagatcacagatgcaggag		
	E2 S2	3275-3295	gaagtatgttatggcagcac	50°C	603 bp
	E2 AS2	3858-3878 (C)	acctcatacacgtatgtta		
E5	E5 S	3730-3750	tagcagtggaggaacaacgtc	50°C	765 bp
	E5 AS	4475-4495 (C)	gacatgtaccagtggccttg		
L1L2	Pr-A ¹	4445-4465	gtgcgtcagccacacaacta	57°C	895 bp ¹⁻³ 527 bp ²⁻³
	Pr-B ²	4813-4833	tctgaatcgactacacctgc		
	Pr-C ³	5320-5340 (C)	actgcgtgtgtacatggacc		
	Pr-D ⁴	5218-5238	cacaatgcacctgatgaagc	57°C	618 bp ⁴⁻⁵ 899 bp ⁴⁻⁶
	Pr-E ⁵	5816-5836 (C)	ggcaacaaccttggatacag		
	Pr-F ⁶	6097-6117 (C)	ccactaacaccaacgcctaa		
	Pr-G ⁷	5981-6001	aaggtagtgttgccagatcc	57°C	1058 bp ⁷⁻⁹ 684 bp ⁸⁻⁹
	Pr-H ⁸	6355-6375	ggacatgggtgatacaggct		
	Pr-I ⁹	7019-7039 (C)	ggtaatggcctgtgactgta		
	Pr-J	6909-6929	ctgcagaagtcattggcctat	56°C	391 bp
	Pr-K	7280-7300 (C)	acacaacacactgacacaca		
LCR	LCR S1	7192-7212	gtctgctgtacaggtataa	50°C	477 bp
	LCR AS1	7649-7669 (C)	cacacaacatatgggattag		
	LCR S2	7605-7625	gcccttacatacacttacct	50°C	457 bp
	LCR AS2	140-160 (C)	aacgtcttgcaactgggtc		

S szensz, AS antiszensz, bp bázispár

14.6 melléklet: Az egyedi nukleotid polimorfizmusok azonosításához használt HPV6 és HPV11 referencia genomok

HPV típus/altípus	Génbanki azonosító
HPV11	M14119
A csoport (HPV6b)	NC_001355
B1 alcsoport (HPV6vc)	AF092932
B2 alcsoport	FR751328
B3 alcsoport (HPV6a)	L41216

14.7 melléklet: A filogenetikai elemzésekhez használt génbankban található további HPV6 és HPV11 szekvenciák összesítése

Génbanki azonosító	Minta	Származás	Genomok száma	Referenciák
M14119 (HPV11 referencia genom)	JO-RRP	Németország	1	(Dartmann és mtsai., 1986)
HE574701-HE574705; FR872717	JO-RRP	Magyarország	6	(Gáll és mtsai., 2013)
EU918768	CAC	Kína	1	(Wu és mtsai., 2009)
JQ773408, JQ773411	RRP	Thaiföld	2	(Chansaenroj és mtsai., 2012)
JQ773412	PP	Thaiföld	1	(Chansaenroj és mtsai., 2012)
JQ773409, JQ773410	CS	Thaiföld	2	(Chansaenroj és mtsai., 2012)
JN644141	RRP	USA	1	(Yuan és mtsai., 2012)
HE611258-HE611274, HE962023-HE962025, HE962365-HE962368, FN907957, FN907964	RRP	Szlovénia	26	(Burk és mtsai., 2011) (Maver és mtsai., 2011)
FN870021, FN870022 FN907958, FN907959 FN907961	A	Szlovénia	5	(Burk és mtsai., 2011) (Maver és mtsai., 2011)
FN907960, FN907962	CAC	Szlovénia	2	(Burk és mtsai., 2011) (Maver és mtsai., 2011)
FN907963	CS	Szlovénia	1	(Burk és mtsai., 2011) (Maver és mtsai., 2011)
KU298879	CS	Brazília	1	(Siqueira és mtsai., 2016)
MK463914-MK463922	GW	Kína	9	(Xu és mtsai., 2019)
LN833161-LN833190	nem ismert	nem ismert	30	(Jelen és mtsai., 2016)
NC_001355 (HPV6 A fővonal [HPV6b] referencia genom)	CAC	Németország	1	(Schwarz és mtsai., 1983)
AF092932 (HPV6 B1 alcsoport [HPV6vc] referencia genom)	VC	USA	1	(Kovelman és mtsai., 1999)
FR751328 (HPV6 B2 alcsoport referencia genom; CAC301)	CAC	Szlovénia	1	(Kocjan és mtsai., 2011)
L41216 (HPV6 B3 alcsoport [HPV6a] referencia genom)	CAC	USA	1	(Hofmann és mtsai., 1995)
FR751320; FR751323; FR751324; FR751329; FR751331- FR751333; FR751338	RRP	Szlovénia	8	(Kocjan és mtsai., 2011)
FR751321; FR751322; FR751325-FR751327; FR751330; FR751334- FR751337	CAC	Szlovénia	10	(Kocjan és mtsai., 2011)
HE599226-HE599246; HE962026-HE962032	RRP	Szlovénia	28	(Kocjan és mtsai., 2011)
HG793809-HG793939	nem ismert	nem ismert	131	(Jelen és mtsai., 2014)
JN252314-JN252323	RRP	Svédország	10	(Ure és Forslund, 2012)
KU298876-KU298878	CS	Brazília	3	(Siqueira és mtsai., 2016)
KX514423, KX514427; KX514429	CS	Brazília	3	(de Oliveira és mtsai., 2017)

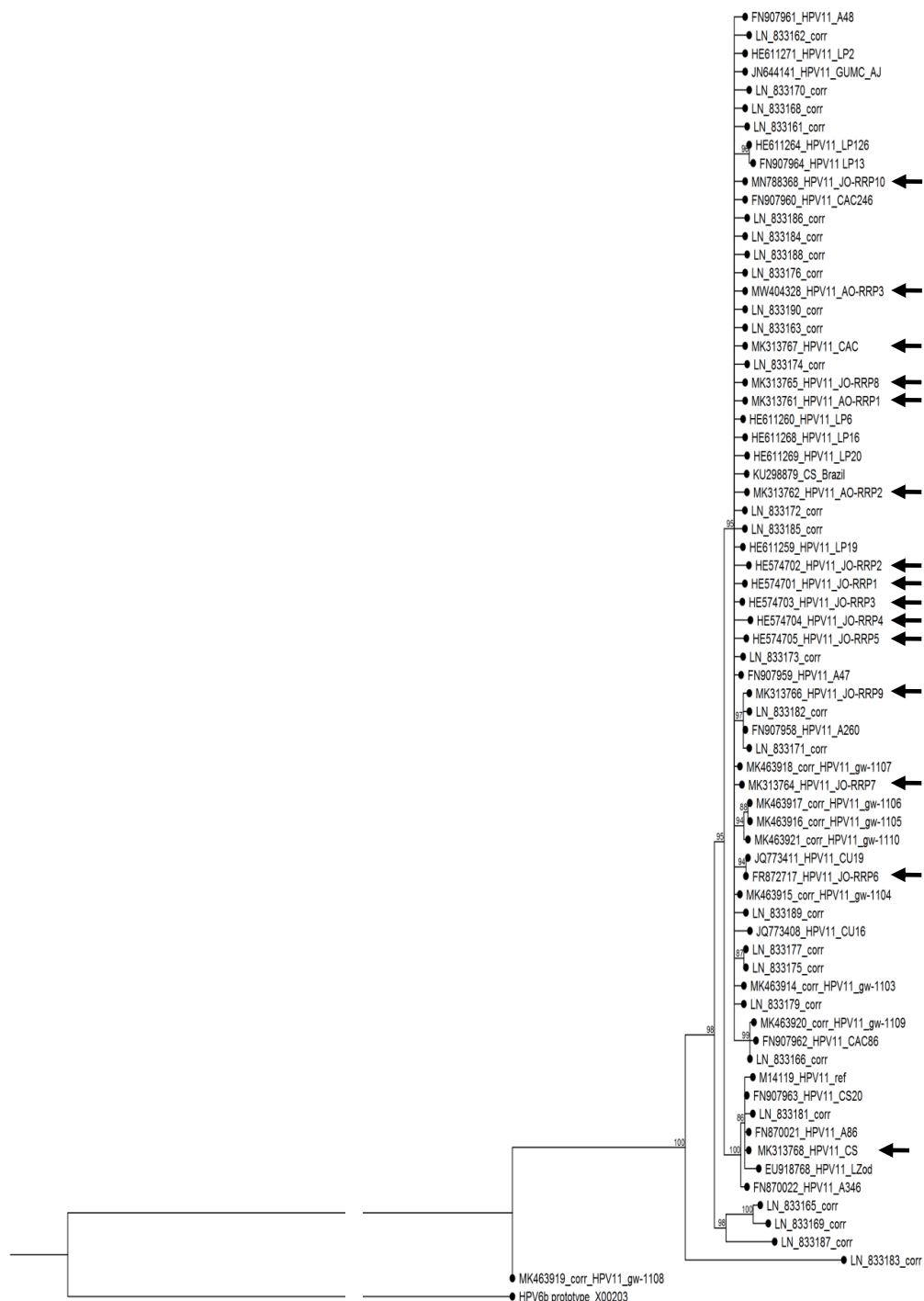
JO-RRP – fiatalkori rekurrens légúti papillomatózis (juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis), CAC - condyloma acuminatum, RRP - rekurrens légúti papillomatózis (recurrent respiratory papillomatosis), CS – cervikális minta (cervical swab), A – anális minta, PP - tüdő papilloma (pulmonary papilloma), GW - anogenitális szemölcs (genital wart), VC – vulva carcinoma

14.8 melléklet: Humán papillomvírus 6 filogenetikai analízisének dendrogramja



A fekete nyíl a magyar HPV6 szekvenciák elhelyezkedését jelöli a dendrogrammon.

14.9 melléklet: Humán papillomavírus 11 filogenetikai analízisének dendrogramja



A fekete nyíl a magyar HPV11 szekvenciák elhelyezkedését jelöli a dendrogrammon.

15. Függelék