

OTKA K 81422 projekt záró beszámolója

A projekt keretében az elsődleges etiológiai szereppel rendelkező humán papillomavírusok (HPV) onkogén mechanizmusait vizsgáltuk a természetes gazdasejtben.

A PCR array terveket funkcionális csoportonként kezdtük megvalósítani és a keratinocita differenciálódási génekkel kapcsolatban az alábbi eredményekre jutottunk: Primer humán keratinocytákat retrovírus vektorokkal fertőztünk, amelyek tartalmazták a HPV 16 E6, E7 és E6/E7 géneket. A HPV mRNS-ek jelenlétét RT-PCR segítségével, a funkcionálisan aktív E6 onkoproteint a p53 fehérje szintjének csökkentésével igazoltuk. A sejtek egy részét differenciáltattuk szérum és magas kalcium tartalmú tápoldatokban, majd real-time PCR segítségével vizsgáltuk az involukrin és a transzglutamináz 1 (fontos differenciálódási markerek), valamint más celluláris gének (CDKN2A, TERT-telomeráz reverz transzkriptáz) génexpressziós változásait. A differenciáltatás hatására az involukrin és a transzglutamináz 1 mRNS szintje megemelkedett a humán keratinocytákban. Az HPV 16 E6 és E7 onkogének együtt csökkentették az involukrin gén aktivitását a differenciálódott és nem differenciálódott sejtekben. A transzglutamináz 1 expressziós szintjét azonban nem befolyásolták szignifikánsan a HPV onkogének. A TERT mRNS szintje sokszorosára emelkedett az E6 hatására, CDKN2A génexpressziós aktivitása viszont csak az E6/E7-tel immortalizált sejtekben nőtt. A keratinocytákat a transzláció szintjén Western blot módszerrel, monoklonális anti-involukrin antitest segítségével vizsgáltuk. A HPV 16 E6, E7 hatása a celluláris involukrin fehérje szintjére hasonló volt, mint az mRNS szintre. Az involukrin fehérje mennyisége a differenciáltatás eredményeképpen megnőtt, a két HPV onkogén jelenlétében pedig a differenciáltatott és nem differenciáltatott sejtekben is csökkent. Primer humán keratinocita sejteket, mint a HPV-ok természetes gazdasejtjét transziensen transzfektáltunk involukrin promotert tartalmazó reporter plazmidokkal és HPV 16 E6, E7 géneket tartalmazó expressziós vektorokkal, azért, hogy az onkogének hatását az involukrin promoterre igazoljuk. A transzfektált sejtekben a HPV 16 E6 csökkentette a promoter aktivitását. Az E7 onkoprotein nem redukálta szignifikánsan az involukrin szabályozó régióját, ezért valószínűsíthető, hogy ez a hatás nem direkt, hanem közvetett módon valósul meg. Emellett az involukrin promoter különböző hosszúságú szakaszait tartalmazó reporter vektorok segítségével lokalizáltuk az E6 onkogén hatását a promoteren. Megállapítottuk, hogy az E6 gátló hatását a promoter proximális részén fejtik ki (a transzkripció kezdőhelytől számított 231 bázispárnyi régió belül). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy humán keratinocytákban a HPV 16 onkogének az involukrin promoter aktivitásának csökkentésével hatnak az involukrin mRNS és fehérje szintjére. AP-1 transzkripció faktor kötőhelyet tartalmazó reporter és HPV 16 E6 ill. E7 onkogéneket tartalmazó expressziós plazmidokkal újabb transziens transzfekciós kísérleteket végeztünk, amelyben a sejtek egy részét differenciáltatásnak is kitettük. A differenciáltatás hatására emelkedett az AP-1 plazmid aktivitása. Ezzel szemben az E6 ill. a két onkogén együttesen csökkentette az AP1 aktivitást. Az involukrin promoteren a transzkripció kezdőhelytől számított 231 bázispárnyi régió belül található egy (differenciálódásban már bizonyítottan fontos) AP-1 faktor kötőhely. Mivel a differenciálódás, illetve a HPV onkogének hasonló hatást fejtettek ki az involukrin promoterre és az AP-1 reporter vektorra, feltételezzük, hogy a HPV onkogének AP-1 faktorokon keresztül fejtik ki hatásukat az involukrin expressziójára.

További kísérleteink során proliferáló illetve differenciálódó sejtekben a western blottal meghatározott Src, Yes és Fyn fehérjék mennyisége heterogén módon változott a HPV 16 onkoproteinek hatására: proliferáló sejtekben az Src és Yes fehérjék mennyiségének szignifikáns növekedését mutattuk ki mindkét HPV 16 onkoprotein jelenlétében, míg differenciálódó sejtekben az E7 jelenléte elegendő volt az emelkedett Src fehérje expresszió kiváltásához. Ezzel szemben sejtdifferenciáció a Yes fehérje mennyiségének egyöntetű, a papillomavírus onkoproteinek jelenlététől független növekedését eredményezte minden sejtvonalban. Az immunoblot vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a Fyn fehérje expressziójára nincsenek hatással a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek sem proliferáló, sem differenciálódó keratinocitákban. Megjegyzendő, hogy nem az mRNS expresszió változott meg, így az egyes kinázok fehérje mennyiségeiben tapasztalt változásokat a HPV onkoproteinek feltételezhetően poszttranszkripció mechanizmusok útján fejtették ki. Foszfokináz array alkalmazásával kimutattuk, hogy a HPV 16 E7 jelenléte a keratinocitákban expresszálandó Src-kinázok katalitikusan aktív (az aktivációs hurokban elhelyezkedő tirozinon foszforilált) állapotát váltotta ki. Mindezek az adatok arra utalnak, hogy a HPV 16 E7 – a HPV 16 E6 segítségével – kettős hatással bírhat az Src-kinázokra keratinocitákban: aktiválhatja a konstitutívan expresszálandó Fyn kinázt, illetve növelheti a Src és Yes kinázok fehérje expresszióját majd aktív állapotukat idézheti elő. Kísérletünk során tehát kimutattuk, hogy a HPV 16 onkoproteinek poszttranszkripció mechanizmusok útján képesek az Src és Yes fehérjék expresszióját növelni, a HPV 16 E7 jelenléte pedig kiváltotta a keratinociták által termelt mindhárom citoplazmatikus kináz katalitikusan aktív állapotát okozó tirozin-foszforilációját. Az Src-kinázok megváltozott expressziója és aktivitása hozzájárulhat a malignus folyamatok kiváltásához vagy fenntartásához a HPV fertőzésekhez társuló tumorok kialakulása során.

Annak a vizsgálatára, hogy a HPV16 E7 RB kötési képessége hatással van-e a Src fehérje mennyiségére és a Src családba tartozó kinázok foszforilációjára Western blot vizsgálatokat végeztünk. Eredményeink azt mutatják, hogy az E7 fehérjében az N-terminális RB kötőhely aminosav cseréi (Cys24Gly és Glu26Gly) hatására az RB fehérje szintje magas maradt az onkoprotein jelenlétében, tehát feltételezhetően ezek a mutánsok nem tudták az RB fehérjét kötni illetve annak lebontását kiváltani. A vad típusú E7-et expresszáló sejtvonalhoz hasonlítva a Cys24Gly és Glu26Gly mutáns fehérjét kifejező sejtvonalakban alacsony maradt a Src fehérje és a foszforilált Src kinázok mennyisége is. A RB kötőhelyen kívüli aminosavcseréket tartalmazó E7 mutánsok jelenlétében a vad típusú HPV16 E7 által okozott RB fehérje mennyiség csökkenést és Src fehérje expresszió emelkedést, valamint a Src kinázok emelkedett foszforilációját tapasztaltuk.

A HPV genotípusok előfordulási arányát PCR amplifikálás után folyamatosan határozzuk meg. A HPV 16 típus a várokozásoknak megfelelően 50%-ot meghaladó mértékben van jelen. A non-vakcina HPV típusok között eddig második leggyakoribbnak a HPV31 adódott.

Kutatásaink során a HPV 31 LCR (Long Control Region) szekvencia variánsainak funkcionális különbségeit vizsgáltuk. A HPV-31 izolátumokat a korábbi HPV-31 izolátumokkal kiegészítve összesen 41 izolátum LCR promóter szekvenciaanalízisét végeztük el. Vizsgálataink során olyan klinikai mintákkal dolgoztunk, amelyek olyan nőktől származnak, akiknél a méhnyakban kolposzkóppal vagy citológiai vizsgálattal elváltozást találtak. A vírusgenomban az LCR olyan regulatórikus egységeket tartalmaz, amelyek számos virális és celluláris faktort képesek kötni, ezáltal az LCR szabályozza a vírus replikációját és a virális gének transzkripcióját. A klinikai mintákból PCR segítségével felszaporítottuk az LCR-t (nt7122-179), majd az LCR izolátumok közötti genetikai kapcsolatok feltárása érdekében

szekvenáltattuk azokat. Az LCR szekvenciák elemzését DNA Baser programmal végeztük el, majd a MEGA 5 program segítségével elkészítettük a filogenetikai törzsfát. A HPV 31 LCR variánsokból készült törzsfá alapján három intratípusos csoportot sikerült elkülöníteni (A, B, C).

A különböző intratípusos csoportokból kiragadtunk néhány variánst melyeket pGL2 basic luciferáz reporter vektorba klónoztunk funkcionális vizsgálatok céljából. A luciferáz konstrukttal C33-A sejteket transzfektáltunk, majd luciferáz és Bradford teszt segítségével megállapítottuk a különböző izolátumok standard luciferáz aktivitását. Szignifikáns különbségeket találtunk az eltérő intratípusos csoportba tartozó HPV 31 LCR variánsok transzkripció aktivitásában. Azzal a céllal, hogy megvizsgáljuk, hogy az LCR variánsok mely szakasza felelős az aktivitás különbségeért, deléciós mutánsokat hoztunk létre a pGL2 basic luciferáz reporter vektorba klónozott LCR variánsokból, majd C33-A sejteket transzfektáltunk a deléciós mutánsokkal és mértük a luciferáz aktivitásukat. Ezek alapján megállapítottuk, hogy az egyes LCR variánsok aktivitás különbségeiért az LCR 3' szakaszán (minimal promoter region) található nukleotid cserék a felelősek.

A magas onkogén kockázatú HPV31 típus LCR régiójának epigenetikai mintázatát is vizsgáltuk. Összesen 24 db HPV31 pozitív, citológiai elváltozást mutató klinikai mintában vizsgáltuk a vírusgenom LCR régiójának metilációs mintázatát. A klinikai mintákból izolált nukleinsav Na-biszulfitos modifikálását végeztük el, hogy a metilált és metilálatlan CpG dinukleotidokat azonosítani tudjuk. Ezt követően elvégeztük a teljes LCR régió amplifikálását a modifikált szekvenciára tervezett és univerzális végekkel jelölt specifikus primerpárok segítségével. Az első PCR után így a teljes LCR-t lefedő, egymással átfedő PCR termékeket kaptunk, melyeket egy második PCR körben a szekvenáláshoz szükséges egyedi azonosító szekvenciákkal jelöltünk meg. A PCR termékek minőségét fragment analízissel ellenőriztük, majd az emulziós PCR-t követően új generációs szekvenálással (Roche GS Junior System) vizsgáltuk a vírusgenom metilációs állapotát. Az új generációs szekvenálás nagy előnye, hogy lehetővé teszi a CpG dinukleotidok metilációjának kvantitatív meghatározását. 19 minta esetében (citológiai eredmény: 15 LGSIL és 4 HGSIL) az LCR régió metilációs mintázata homogénnek mutatkozott és nem találtunk jelentős különbséget a különböző súlyosságú citológiai elváltozást mutató klinikai minták között. Ezekben a mintákban a CpG dinukleotidok metilációja a teljes LCR-ben alacsony, 10% alatti volt. Öt klinikai minta esetében találtunk részleges metilációt az 5'-LCR/enhancer régióban. Összesen 5 CpG dinukleotid esetében tudtunk detektálni mérsékelt fokú metilációt a különböző mintákban. 5 illetve 4 metilált citozint találtunk két HGSIL súlyosságú klinikai mintában, ezekben a szövettani vizsgálat in situ carcinoma-t igazolt. Ezzel szemben 3 kevésbé súlyos citológiai elváltozást mutató LGSIL mintában csupán egy illetve két CpG dinukleotid esetében találtunk alacsony mértékű metilációt. Az LCR promoter régiójában egyetlen minta esetében sem találtunk metilált CpG dinukleotidot. A metilált citozinok közül 3 CpG (CpG-7479, CpG-7485 és CpG-7876) E2 kötőhely szekvenciájában található. Ez alapján feltételezhetjük, hogy ezen nukleotidok metilációja fontos szabályozó szereppel bír a virális onkogének expressziójának szabályozásában és így a HPV fertőzésekhez társuló malignus folyamatok kialakulásában. A korábban Sanger-féle szekvenálással detektált, a különböző HPV31 intratípusokra jellemző variáns nukleotidokat az új generációs szekvenálás segítségével is azonosítottuk. Ezek alapján az általunk vizsgált HPV31 LCR variánsok a B és C intratípusokba tartoztak.

Debrecen, 2014-12-30

Dr. Kónya József