

OTKA zárójelentés

Humán papillomavírus onkoproteinek hatása celluláris gének expressziójára (T049191)

Futamidő: 2005 – 2008.

Témavezető: Dr. Veress György

A genitális humán papillomavírusok (HPV) a méhnyakrák (cervix carcinoma) kialakulásának legfontosabb kockázati tényezői [1]. Az onkogén HPV típusok transzformáló aktivitásáért egyértelműen az E6 és E7 korai fehérjék felelősek [2]. A magas kockázatú genitális HPV-k E6 és E7 onkogénjei befolyásolhatják fontos celluláris gének expresszióját, aminek szerepe lehet e vírusok patogenitásában ill. onkogén sajátságában.

A HPV 16 E6 és E7 fehérjék hatása a survivin gén expressziójára

A survivin az ún. IAP (inhibitor of apoptosis protein) fehérje család egyik újabban felfedezett tagja [3,4]. A survivin fehérje az apoptózis (programozott sejthalál) gátlása mellett a sejtosztódás szabályozásában is részt vesz [5]. Fontos szerepet játszik a szövetek differenciálódásában és az embriogenezisben. A survivin gén expressziója nagymértékben sejtciklustól függő: leginkább a G2/M fázisra jellemző a gén intenzív transzkripciója [6]. Transzkripciója gátolt a terminálisan differenciálódott szövetekben, viszont nagyon aktív az embrionális fejlődés során, valamint a legkülönbözőbb malignus tumorokban, így a cervix carcinomában is [7]. A vírus onkoproteinjei (E6 és E7) beavatkoznak a sejtciklus működésébe, ezáltal a méhnyak malignus elváltozását indukálják.

Kísérleteinkben tranziens transzfekcióval vizsgáltuk különböző sejtvonalakon az E6 és E7 fehérjék survivin génre gyakorolt hatását. Az E6 - szemben az E7-tel - szignifikánsan aktiválta a survivin gén promóterét. HPV 16 E6 mutánsokkal végzett kísérleteink arra utalnak, hogy az E6 survivin promoterre gyakorolt hatását nagy mértékben a p53 tumorsuppresszor fehérje közvetíti. A p53 expressziója viszont erősen gátolta a survivin promoter aktivitását. Mivel a HPV 16 E6 képes a p53 lebontását indukálni, valószínűnek tűnik, hogy az E6 a p53 fehérje lebontása révén aktiválja a survivin promotert.

Humán embrionális fibroblasztot stabilan transzfektáltunk a HPV 16 E6 és E7 onkogénjeit hordozó retrovírus vektorokkal, majd kimutattuk, hogy mindkét onkoprotein képes az endogén survivin mRNS szintjét növelni. Sejtciklus-szinkronizációs kísérleteink eredményei arra utalnak, hogy a HPV onkogének nem a sejtciklus módosítása révén aktiválják a survivin gén expresszióját [8].

A survivin gén promóter polimorfizmus hatása a cervix carcinogenesisre

A survivin gén promoterében számos nukleotid polimorfizmust írtak le. Az egyik ilyen polimorfizmus (G/C a -31 nukleotidnál) sejtvonalakban végzett transzfekeziós kísérletekben nagy mértékben befolyásolta a promóter transzkripciós aktivitását [9]. Kutatási célunk annak kiderítése volt, hogy a survivin promóter (-31 G/C) polimorfizmusa befolyásolja-e a cervicalis carcinogenesis folyamatát.

A HPV DNS kimutatását és tipizálását polimeráz láncreakciót követő restrikciós enzimemesztéssel végeztük (PCR-RFLP). A survivin promóter (-31 G/C) polimorfizmusát több független módszerrel is vizsgáltuk. Mindegyik módszerhez a survivin promóter adott szakaszát PCR módszerrel szaporítottuk fel. A gén polimorfizmus vizsgálatát egyrészt restrikciós emésztéssel (PCR-RFLP), másrészt ún. egyszálú konformációs polimorfizmus (SSCP) analízissel végeztük.

Nem találtunk szignifikáns különbséget a vizsgált survivin promóter genotípusok eloszlásában az egyes vizsgálati csoportok (kontroll csoport, rákmegelőző csoport, ill. méhnyakrákos csoport) között ($p=0,4$). Hasonlóképpen, akkor sem mutatkozott szignifikáns különbség a genotípusok eloszlásában, ha külön hasonlítottuk össze a kontroll csoportot a rákmegelőző csoporttal ($p=0,5$), ill. a kontroll csoportot a méhnyakrákos csoporttal ($p=0,37$). Eredményeink alapján tehát úgy tűnik, hogy a survivin promóter vizsgált polimorfizmusa nem befolyásolja jelentősen a méhnyakrák kialakulását, legalábbis a vizsgált populációban [10].

Az E-cadherin gén promóter polimorfizmusának vizsgálata

Az E-cadherin tumorszuppresszor gén promóter (-160 C/A) polimorfizmusának szerepe a gyomor-, mell-, vastagbél- és prosztatadaganatokban jól ismert. A transzkripció kezdőhelyétől számított -160. bázisnál található, egyedi nukleotidot érintő (C/A) polimorfizmus megváltoztatja a promóter erősségét és a transzkripciós faktorok kötődését, emellett közvetlen hatása van az E-cadherin gén transzkripciójára is [11,12].

Munkánk során méhnyakrákos és laryngeális daganatokban (papilloma planocellulare és carcinoma planocellulare) restrikciós emésztéssel és SSCP-vel (single strand conformation polymorphism) vizsgáltuk a (-160 C/A) polimorfizmus előfordulását. Eredményeink szerint sem a cervix carcinomás primer daganatokban, sem a nyirokcsomó metasztázisaikban nem tért el szignifikánsan az allélfrekvencia a kontroll (egészséges véradó) populációhoz viszonyítva (1. táblázat). A (-160 C/A) polimorfizmus megléte és a HPV jelenléte között sem találtunk szignifikáns összefüggést ($p=0,650$).

1. táblázat

E-cadherin tumorsuppresszor gén promóter (-160 C/A) genotípusok eloszlása cerix carcinomás ill. kontroll populációban

genotípus	kontroll	cervix carcinoma
	n=182	n = 92
CC	97 (0,53)	55 (0,60)
CA	73 (0,40)	33 (0,36)
AA	12 (0,07)	4 (0,04)
		p=0,444
allél	C: 0,73	C: 0,78
frekvencia	A: 0,27	A: 0,22
		p=0,411

A laryngeális carcinoma planocellulare mintákban a polimorfizmus előfordulása nem különbözött szignifikánsan a kontroll mintákhoz viszonyítva (2. táblázat). Amennyiben viszont a papillomavírus jelenlétének függvényében vizsgáltuk az allélfrekvenciákat, a polimorf 'A' allél szignifikánsan nagyobb valószínűséggel volt jelen a HPV-t nem tartalmazó mintákban (p=0,0366).

A papilloma planocellulare mintákban szintén szignifikánsan nagyobb volt a polimorf A allél frekvenciája, mint a kontroll populációban (2. táblázat); viszont a mintacsoport kis esetszáma miatt az E-cadherin (-160 C/A) polimorfizmusának a laryngeális papilloma planocellulare kialakulásában játszott szerepe további vizsgálatokat igényel.

2. táblázat

E-cadherin tumorsuppresszor gén promóter (-160 C/A) genotípusok eloszlása laryngeális tumorokban ill. kontroll populációban

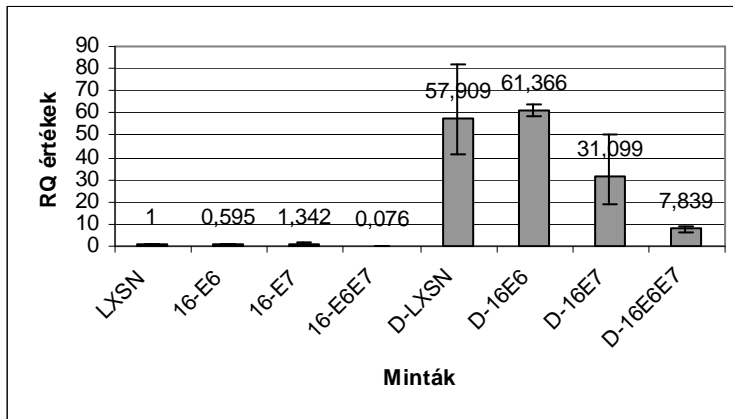
genotípus	kontroll	papilloma planocellulare	carcinoma planocellulare
	n=62	n = 10	n = 46
CC	35 (0,56)	2 (0,20)	23 (0,50)
CA	21 (0,34)	5 (0,50)	18 (0,39)
AA	6 (0,10)	3 (0,30)	5 (0,11)
		p=0,058	p=0,800
allél	C: 0,73	C: 0,45	C: 0,70
frekvencia	A: 0,27	A: 0,55	A: 0,30
		p=0,000057	p=0,638

A HPV 16 E6 és E7 fehérjék hatása az involucrin és transzglutamináz 1 gének expresszójára

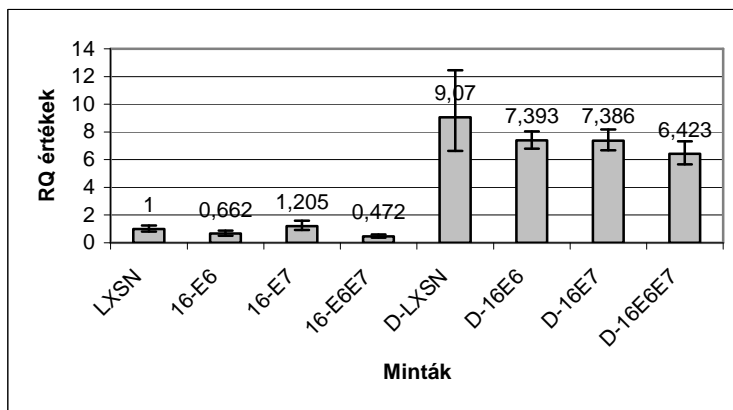
A keratinocyták differenciálódása és a humán papillomavírusok (HPV) replikációs ciklusa szorosan kapcsolódik egymáshoz. A HPV a bazális sejteket fertőzi, ahol beindul a vírusreplikáció, de a vírusciklus további lépései csak a gazdasejt érése során mennek végbe. Az involucrin és a transzglutamináz 1 markerként szolgálhatnak a keratinocyták differenciálódásának tanulmányozásában, ugyanis az epidermisz szuprabazális rétegeiben ezen gének aktivitása megnő (az emelkedő intracelluláris Ca^{2+} koncentrációnak megfelelően) [13]. Az involucrin egy glutaminban gazdag fehérje, ami részt vesz a corneocyták sejtvezárák felépítésében. A transzglutamináz 1 enzim pedig glutamil-lizin keresztkötéseket hoz létre a hámsejtek fehérjéi között [14,15]. A HPV 16 E6, E7 onkogének hatását a keratinocyták érési folyamataira a két differenciálódási marker génextpressziós változásának segítségével vizsgáltuk.

A primer humán keratinocytákat DK-SFM (szérummentes, 0,3 mM Ca^{2+} tartalmú) tápfolyadékban tenyésztettük, majd LXXSN alapú retrovírus vektorokkal fertőztük, amelyek tartalmazták a HPV 16 E6, E7, ill. E6/E7 géneket. A sejtek egy részét 24 órán keresztül differenciáltattuk DMEM (10% FBS és 1,8 mM Ca^{2+} tartalmú) tápfolyadékban. RNS-t izoláltunk a differenciálódó és a nem differenciálódó sejtekből, és elvégeztük a reverz transzkripciót. Ezt követően kvantitatív RT PCR módszer (TaqMan Gene Expression Assay) alkalmazásával vizsgáltuk az involucrin és a transzglutamináz 1 gének expressziós változásait a differenciáltatás, ill. a HPV onkogének hatására.

A primer humán keratinocytákban a differenciáltatás hatására erősen megemelkedett mind az involucrin, mind a transzglutamináz 1 génextpressziós szintje. A nem differenciálódott sejtekben a HPV 16 E6 csökkentette az involucrin és a transzglutamináz 1 expressziós szintjét. Az E6, E7 onkogének együtt csökkentették az involucrin gén aktivitását a differenciálódott és nem differenciálódott sejtekben, valamint a transzglutamináz 1 szintjét a nem differenciálódott sejtekben (1. és 2. ábra).



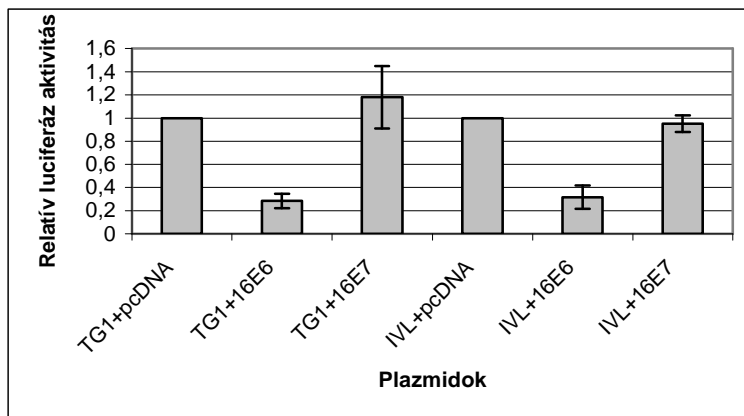
1. ábra: HPV 16 E6 és E7 onkogének hatása az involucrin gén expressziójára humán keratinocytákban (D: differenciálódó sejtek)



2. ábra: HPV 16 E6 és E7 onkogének hatása a transzglutamináz 1 gén expressziójára humán keratinocytákban (D: differenciálódó sejtek)

MCF-7 sejt vonalat (amely emlőtumorból származó epitheliális sejt vonal és natív p53 proteint expresszál) tranziensen transzfektáltunk involucrin, ill. transzglutamináz 1 promótereket tartalmazó luciferáz reporter plazmidokkal és HPV 16 E6, E7 géneket tartalmazó expressziós vektorokkal. 48 óra után mértük a relatív luciferáz aktivitást és Bradford-tesztel határoztuk meg a minták fehérjetartalmát.

A transzfektált MCF-7 sejtekben a HPV 16 E6 csökkentette az involucrin és a transzglutamináz 1 promóterek transzkripciós aktivitását, míg az E7 onkogén hatására nem tapasztaltunk szignifikáns változást (3. ábra).



3. ábra: HPV 16 E6 és E7 onkogének hatása a humán transzglutamináz 1, ill. involucrin promoter transzkripció aktivitására MCF-7 sejtvonalon

Eredményeink szerint tehát a HPV 16 E6 onkogén mindkét, a celluláris differenciálódás folyamatában alapvető fontosságú gén promóterét közvetlenül képes gátolni, ily módon befolyásolva a természetes gazdasejt differenciálódási folyamatait. Ezek a mechanizmusok fontosak lehetnek mind a produktív (vírustermeléssel járó) fertőzésben, mind a virális carcinogenesis folyamatában. Annak tisztázására, hogy a HPV 16 E6 pontosan milyen molekuláris mechanizmusokkal gátolja az involucrin, ill. a transzglutamináz 1 promóterét, további vizsgálatok szükségesek.

Irodalom

- zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat.Rev.Cancer* **2**, 342-350.
- Münger, K. and Howley, P. M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* **89**, 213-228.
- Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat.Med.* **3**, 917-921.
- Deveraux, Q. L. and Reed, J. C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 239-252.
- Altieri, D. C. (2001). The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol.Med.* **7**, 542-547.

6. Li, F., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C., and Altieri, D. C. (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* **396**, 580-584.
7. Kim, H. S., Shiraki, K., and Park, S. H. (2002). Expression of survivin in CIN and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Anticancer Res.* **22**, 805-808.
8. Borbely, A. A., Murvai, M., Konya, J., Beck, Z., Gergely, L., Li, F., and Veress, G. (2006). Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. *J.Gen.Virol.* **87**, 287-294.
9. Xu, Y., Fang, F., Ludewig, G., Jones, G., and Jones, D. (2004). A mutation found in the promoter region of the human survivin gene is correlated to overexpression of survivin in cancer cells. *DNA Cell Biol.* **23**, 527-537.
10. Borbely, A. A., Murvai, M., Szarka, K., Konya, J., Gergely, L., Hernadi, Z., and Veress, G. (2007). Survivin promoter polymorphism and cervical carcinogenesis. *J.Clin.Pathol.* **60**, 303-306.
11. Tsukino, H., Kuroda, Y., Nakao, H., Imai, H., Inatomi, H., Kohshi, K., Osada, Y., and Katoh, T. (2003). E-cadherin gene polymorphism and risk of urothelial cancer. *Cancer Lett.* **195**, 53-58.
12. Verhage, B. A., van Houwelingen, K., Ruijter, T. E., Kiemeny, L. A., and Schalken, J. A. (2002). Single-nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter modifies the risk of prostate cancer. *Int.J Cancer* **100**, 683-685.
13. Ng, D. C., Su, M. J., Kim, R., and Bikle, D. D. (1996). Regulation of involucrin gene expression by calcium in normal human keratinocytes. *Front Biosci.* **1**, a16-a24.
14. Eckert, R. L., Crish, J. F., Efimova, T., Dashti, S. R., Deucher, A., Bone, F., Adhikary, G., Huang, G., Gopalakrishnan, R., and Balasubramanian, S. (2004). Regulation of involucrin gene expression. *J Invest Dermatol.* **123**, 13-22.
15. Jessen, B. A., Qin, Q., and Rice, R. H. (2000). Functional AP1 and CRE response elements in the human keratinocyte transglutaminase promoter mediating Whn suppression. *Gene* **254**, 77-85.