

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Klinikai és kísérletes vizsgálatok perzisztens fertőzésekhez társuló
kórfolyamatokban**

Dr. Kónya József

Debrecen, 2016

A mikroorganizmusok által okozott fertőzések többsége **akut** módon zajlik le és a gazdaszervezet-kórokozó kapcsolat teljes megszűnésével ér véget, a gazdaszervezet vagy eradikálja a kórokozót vagy elpusztul tőle. Minden gazdaszervezetnek vannak olyan kórokozói, amelyek **perzisztens fertőzéseket** képesek kialakítani. A perzisztálás akkor áll fenn hosszú ideig, ha a gazdaszervezet károsodása csak olyan mértékű, hogy a gazdaszervezet a saját biológiai funkcióit el tudja látni. Az elhúzódó, larvált lefolyásnak a veszélye éppen abban rejlik, hogy a szervezeti károsodások kumulálódhatnak, ami megbetegedés lassú, de biztos progressziójával jár együtt. Mire a progresszió folyamatok eredményeképpen a megbetegedés teljesen manifesztálódik, a szervezet tartalékai, kompenzáló és kontrolláló mechanizmusai már rendszerint kimerülnek, ami a sikeres orvosi kezelés esélyét erősen csökkenti.

A kórokozó szaporodási tendenciája alapján a perzisztens fertőzés lehet **krónikus** lefolyású, lehet **látens** fertőzés időnkénti reaktivációval vagy lehet lassúvírus **fertőzés**. A **krónikussá** váló fertőzés rendszerint akutan kezdődik, kórokozó szaporodása előbb felfut, majd a szervezeti védekezés és a belső környezetből fakadó korlátok miatt csökkenni kezd, de a szervezet nem képes teljesen eradikálni a kórokozót. A szervezet és a kórokozó között patológias egyensúlyi állapot jön létre, a kórokozó szaporodása hosszú távon mérsékelt, egyenletes vagy enyhén fokozódó. A gazdaszervezet sorsa attól függ, hogy milyen mértékig és mennyi ideig képes kompenzálni a kórokozó szaporodásából eredő károsodásokat. A **látens** fertőzés is az akut szakasz után szokott kialakulni, a kórokozó itt sem tűnik el a szervezetből, hanem inaktív állapotban megbújik arra alkalmas sejtben vagy képletben, a mikroorganizmus szaporodása leáll. Amíg inaktív állapotban van, nem okoz további károsodást, azaz látens állapotban a fertőzés nem befolyásolja a szervezet egészségi állapotát. A *látens fertőzés reaktivációja* valószínűségi esemény, amely részben a kórokozó saját minőségi és mennyiségi tulajdonságaiból adódik, részben olyan, a kórokozótól független körülmények határozzák meg, mint a gazdaszervezet általános állapota, immunstátusza, társfertőzések jelenléte. A reaktiválódott fertőzés lefolyás szempontjából akut fellángolásnak felel meg, amely után a fertőzés ismét inaktív állapotba kerül. A lassúvírus fertőzést a kórokozó és az általa okozott degeneratív károsodások alattomos, monoton mennyiségi növekedése jellemzi.

Kórokozó szerep, kórfolyamati szerep

A mindennapi orvosi gyakorlatban természetesnek vesszük, hogy adott betegből kimutatott, jól ismert mikroorganizmust a betegség kórokozójának tekintsünk. Az egyes fertőző betegségek kórokozóinak ismerete mögött korábbi tudományos igényű megfigyelések, elemzések állnak. Mikroorganizmusok kórokozó szerepének első formális igazolása Robert Koch nevéhez fűződik. A klasszikus *Koch posztulátumok* vizsgálatát a mikroorganizmusok több tulajdonsága is akadályozhatja. Tenyésztéssel nem vagy nehezen izolálható mikroorganizmus esetében ugyanúgy nem alkalmazható, mint fogékony állatmodell hiányában. A perzisztens fertőzésekből a korlátozott vagy ideiglenesen szünetelő szaporodás miatt még az egyébként igénytelen mikroorganizmusok is nehezebben izolálhatók. Fogékony állatmodellben végezhető vizsgálatra még kisebb az esély, mivel a perzisztens fertőzésekre jellemző patológiás gazda-kórokozó egyensúlyt fenntartó mechanizmusok más gazdafajban más összetételben várhatók, ami a folyamat más kimenetelét eredményezi.

A mikroorganizmus teljes egészében történő izolálásával közel egyenértékű a mikroorganizmus egyes esszenciális komponenseinek kimutatása. A fogékony állatmodell helyett közelítő megoldást jelentenek a jól kontrollált klinikai megfigyelések, nyomon követések. A mikroorganizmusok jellegzetes esszenciális alkotórészeinek a kimutatása különböző molekuláris vizsgálati eljárásokkal végezhető. Ezen vizsgálati módszerek széles körű elterjedése lehetővé tette a *molekuláris Koch posztulátumok*ként elnevezett feltételrendszer megalkotását.

1. *A mikroorganizmus halmozódása megbetegedettekben.* A megbetegedettekben és az egészségesekben megfigyelt prevalencia (előfordulási arány) szokott lényegesen különbözni. Az epidemiológiai tanulmány típusától függően az összefüggés erősségét *relatív kockázattal* vagy *esélyhányadossal* szokták kifejezni. A mikroorganizmus és a betegség kapcsolatára utalhat az is, ha a beteg szervezetben a vizsgált mikroorganizmus lényegesen nagyobb mennyiségben mutatható ki, mint az egészségesekben. Az utóbbi esetben a mikroorganizmus *dózishatásának* kimutatása történik.

2. *A mikroorganizmus és a megbetegedés időbeli viszonya.* Az 1. pontban vázolt kapcsolat a betegség és kórokozó között még nem ad választ arra, hogy a valós kóroki tényezőt azonosítottuk vagy a betegség hajlamosít a vizsgált fertőzésre vagy a kettő között nem közvetlen kapcsolat van, hanem egy közös, még

általunk nem ismert harmadik tényező segíti elő mind a betegség, mind a fertőzés kialakulását. A kóroki szerep időbeni feltétele teljesül, ha a jelenleg egészséges populációban a kórokozó vagy egyedi antigénje, nukleinsav szekvenciája alapján meg lehet jósolni, hogy kik vannak kitéve fokozott betegségkockázatnak a jövőben.

3. *Reverzibilitás.* A gyógyulás vagy eredményes terápia után a mikroorganizmus prevalenciája vagy a fertőző csíraszám (vírusoknál kópiaszám) lényegesen csökken. Szintén a reverzibilitást támasztja alá, amikor a kórokozó eliminálása után a populációban a megbetegedés incidenciája lényegesen csökken.

4. *Plauzibilitás.* Viszonylag tág értelemben megfogalmazott feltételek tartoznak ide, értékelésük pedig a tudomány aktuális állása szerint történik: A mikroorganizmus filogenetikai helye és filogenetikailag közel álló fajok biológiai tulajdonságai alapján értelmezhető-e a kórfolyamat? A mikroorganizmus ellenes immunválasz összhangban van-e a betegség lefolyásával? A kórfolyamatra jellemző sejt-, szövet-, szervkárosodás kulcslépéseit kísérletes körülmények között elő lehet-e idézni a feltételezett kórokozóval vagy annak egyes termékeivel, összetevőivel?

Humán papillomavírusok (HPV) és cervikális karcinogenezis

A cervikális karcinogenezis folyamatának klinikai megnyilvánulásai a méhnyaki hámok enyhe diszpláziás elváltozásaival kezdődnek, rákmegelőző intraepiteliális neopláziákkal folytatódnak és az invazív méhnyakrákban és metasztázisaiban érik el a végstádiumot. Az elmúlt negyedszázad alatt világszerte folytatott kutatások eredményeként az egyetlen olyan onkológiai kórfolyamat lett, amelyben a folyamatot fenntartó és elsődleges kóroki tényezőre az onkogén HPV típusokra lehet alapozni a hatékony primer (*HPV vakcina*) és szekunder (*méhnyakszűrés*) prevenciót. A humán papillomavírusok biodiverzitása és az emberi szervezet védekezésének sajátosságai azonban további kihívások elé állítják a szakterületet.

Humán herpesvírusok és a periodontitis apicalis

A fog gyökércsúcsa körüli fogágszövetek gyulladása, a *periodontitis apicalis* jellemzően kevert mikrobiális fertőzés következtében alakul ki. A krónikussá váló lokalizált gyulladás és a szervezet között kialakult patológiás egyensúly

felborulása a *periodontitis apicalis* akut fellángolásához vezet. Az utóbbiban a szakirodalom felvetette az Epstein-Barr vírus (EBV, *Gamma-herpesvirinae* alcsalád) és a humán cytomegalovírus (HCMV, *Beta-herpesvirinae* alcsalád) patogenetikai szerepét.

Morbillivírus és az otosclerosis

A morbillivírus szaporodása közben képződő defektív partikulák képezik az alapját a fertőzés lokalizált perzisztálásának és fertőzött területen kialakuló krónikus gyulladásnak. A morbillivírus patogén szerepére utaló adatok (vírusszerű képletek, sejtfüzióval létrejött óriássejtek a szövetekben, vírus ellenanyag a *perilymphában*) gyűltek össze primer hallászavarok közé tartozó *otosclerosis*-ra vonatkozóan, amely a vezetési halláscsökkenést okozó *stapes* fixáció leggyakoribb oka.

Célkitűzések

Az értekezésben szereplő kísérletes klinikai vizsgálatok közös vonása az, hogy lassan, lappangva kialakuló kórfolyamatokban molekuláris epidemiológia eszközeivel valamint *in vitro* kísérletes rendszerekben vizsgáltuk perzisztens fertőzések patogenetikai szerepét. Közvetlen célkitűzéseink a következők voltak:

Humán papillomavírusok (HPV) és cervikális karcinogenezis

- A nukleinsav hibridizáción alapuló Hybrid Capture HPV® rendszer klinikai értékelése és kiegészítése restriktív fragment hossz alapú tipizálással.
- A HPV kimutatás és további tipizálás szerepe az onkogén kockázat becslésében a cervikális karcinogenezis korai szakaszában
- Kóros citológiai elváltozás mellett milyen időtávon figyelhető meg a HPV fertőzés onkogén kockázata?
- HPV kimutatás prognosztikai értéke CIN léziók műtéti eltávolítása után
- A méhnyak szöveti környezetében kiemelt szerepet játszó IL-10 promotor szakasz polimorfizmusának és epigenetikai szabályzásának vizsgálata

- A HPV-16 onkoproteinek hatásának vizsgálata a non-receptor Src tirozinkinázokra proliferáló és differenciálódó keratinocitákban.

Humán herpesvírusok és a periodontitis apicalis

- Az endodonto-patogén baktériumok által kiváltott *periodontitis apicalis chronica* kórfolyamatban az Epstein-Barr vírus, a humán cytomegalovírus és a humán herpesvírus 6 jelenlétét és transzkripció aktivitását összevetni a periapikális léziók méretével, panaszos manifesztációjával
- A periapikális léziókban a gyulladással összefüggő meghatározó szerepet játszó TNF-alfa és TGF-β expresszióját transzkripció szinten összevetni a fenti vírusfertőzésekkel.

Morbillivírus és az otosclerosis

- Morbillivírus előfordulásának a virális RNS-re alapozott vizsgálata klinikailag *otosclerosis* gyanús elváltozásokban, valamint szövettanilag verifikált *otosclerosis*ban
- A *otosclerosis* léziókban a gyulladással és a csontátépülési folyamatban meghatározó szerepet játszó TNF-alfa expresszióját transzkripció szinten vizsgálni és összevetni a kórfolyamat aktivitásával.

Vizsgálati módszerek

A klinikai tanulmányok egyik részét retrospektív, másik részét prospektív módon szerveztük, részben keresztmetszeti eset-kontroll, részben longitudinális elemzést végeztünk. Az *in vitro* kísérletes munkában primer és folyamatos sejtvonalakon dolgoztunk. A primer keratinocita rendszerben mind a proliferáló, mind a differenciáló modellt beállítottuk. A sejtes munkában izolált gének, rekombináns konstrukciók hatását vizsgáltuk a gazdasejtre.

A perzisztensen fertőző mikroorganizmusok kimutatására érzékeny nukleinsav alapú vizsgálati módszereket adaptáltunk és megoldottuk a csontos, a szklerotikus ill. a nyákos mátrixú klinikai mintákból a kórokozó és a gazdasejt eredetű nukleinsavak megfelelő feltárását fagyasztásos, mechanikai, extrakciós-precipitációs ill. szilika-adszorpciós módszerekkel

A vizsgálatokhoz a nukleinsav elemző módszerek széles körét alkalmaztuk, a konvencionális PCR mellett, allél-specifikus PCR, cDNS PCR, valós idejű PCR, génextpresszió kvantifikálása Taqman próbákkal, restriktions fragmenthossz analízis, DNS metiláció elemzése biszulfid modifikálás után, első és második generációs szekvenálás, PCR termék klónozása expressziós plazmid vektorokba transzfektálása és kotranszfektálása, génextpressziós aktivitás luciferáz alapú mérése. metilációs kazetta assay, kromatin immunprecipitáció. Protein alapú vizsgálatok köréből Western-blot detektálás, proteinfoszforiláció Western-blot és array blot analízise.

A statisztikai analízist a klinikai tanulmányokban nem parametrikus statisztikai módszerekkel végeztük, a keresztmetszeti elemzéseket Yates korrigált khi-négyzet, Fisher exact statisztikákkal ill. egy- és több változós logisztikus regressziós módszerrel esélyhányados (odds ratio) és a hozzátartozó 95% megbízhatósági tartomány meghatározásával végeztük. A longitudinális elemzéseket egy- és több változós logisztikus regressziós módszerrel esélyhányados (odds ratio) és a hozzátartozó 95% megbízhatósági tartomány meghatározásával végeztük. Az *in vitro* kísérletes munkában mérési adat szórását, standard hibáját határoztuk meg, valamint T-próbával vizsgáltuk a szignifikanciát.

Eredmények

Nukleinsav hibridizációs elven működő Digene Hybrid Capture HPV® tesztre kiegészítő HPV tipizálási eljárás fejlesztése (analitikai értékelés)

A Hybrid Capture HPV vizsgálatra feldolgozott 129 HPV pozitív mintából 102-ben magas onkogén kockázatú, 15-ben alacsony kockázatú HPV-t mutatott ki a Hybrid Capture HPV teszt, míg a maradék 12 mintában mind magas onkogén kockázatú, mind alacsony kockázatú HPV jelet kaptunk. A mintákat MY09-MY11 konszenzus HPV primerek segítségével amplifikáltuk, az amplifikációs termékekre restriktions fragmenthossz alapú (PCR-RFLP) tipizálást dolgoztam ki és Hybrid Capture HPV eredményeket összehasonlítottam a PCR-RFLP eredményekkel. A Hybrid Capture HPV vizsgálat szerint kizárólag magas onkogén kockázatú HPV fertőzést mutató 102 mintából 93-ban olyan HPV típusokat mutattunk ki, amelyekre a teszt validálva volt, 9 mintában további

típusok (53, 58, 66, 81, 82) jelenlétében kaptunk pozitív hibridizációs jelet, amelyek közül a HPV-81 típust alacsony kockázatúnak tekintik. A Hybrid Capture HPV tesztben járulékosan detektált típusokat a PCR-RFLP módszer mellett DNS szekvenálással is megerősítettük. A Hybrid Capture HPV teszt szerint kizárólag alacsony kockázatú HPV fertőzést mutató 15 minta mindegyikében a teszt leírásnak megfelelő alacsony kockázatú típusokat igazolt vissza a PCR-RFLP tipizálás. A Hybrid Capture HPV teszt szerint alacsony kockázatú és magas kockázatú koinfekciókat (n=12) viszont csak két esetben igazolta vissza a PCR RFLP tipizálás, nyolc esetben csak magas kockázatú, két esetben csak alacsony kockázatú típust lehetett kimutatni a háttérben. Összességében 97%-ban (111/114) igazolódott, hogy a Hybrid Capture HPV teszt valóban jól jelezte onkogén HPV típus jelenlétét. A maradék három esetben a Hybrid Capture HPV teszt a biztonságos oldal felé tévedett, nem onkogén HPV mellett is megjelent a magas kockázatú típust jelző gyenge hibridizációs szignál.

A HPV kimutatás és tipizálás szerepe az onkológiai kockázat megítélésében

Retrospektív longitudinális tanulmányban értékeltük, hogy a diagnosztikus HPV kimutatás és a kiegészítő tipizálás hogyan járul hozzá a HPV fertőzések onkológiai kockázatának megítéléséhez. A vizsgálati kohorszba 455 olyan nőbeteget vettünk be, akiknél HPV vizsgálatot végeztünk citológiai vagy kolposzkópos elváltozások miatt és az elváltozások kimenetelét a klinikai információs rendszerből követtük (10644 beteghónap). A tanulmány végponti paramétere az onkológiai jelentőségű, legalább közepes fokú *cervicalis intraepithelialis neoplasia* (CIN2+) elváltozás kialakulása volt. Abban a betegcsoportban, amelyben a citológiai atípiá háttérében magas onkogén kockázatú HPV fertőzés állt, 58,7%-os arányban alakult ki CIN, amelynek többségében – a teljes csoportra vonatkoztatva 52,6%-ban – az onkológiai jelentőségű CIN2+ elváltozás állt.

A kiindulási HPV és citológiai státusz függvényében egy- és többváltozós Cox regressziós analízissel elemeztük a szövettanilag igazolt CIN2+ kialakulásának relatív kockázatát. A kohorsz HPV és citológiai státusz szerinti alábontásában kapott alcsoportok életkoreloszlása jelentősen különbözött, ezért a többváltozós regressziós modellbe a HPV és a citológiai státusz mellett az életkort is beépítettük. A többváltozós analízisben a fenti tényezők mindegyikére kiszámítottuk a másik két tényező zavaró hatásától megtisztított relatív

kockázati értéket. Az onkogén HPV csoporton belül a legmagasabb kockázatot a HPV16/18 csoport jelentette (RR=119,1 CI_{95%}: 36,2-391), de még az egyéb (non16/non18) onkogén típusok által hordozott kockázat (RR=41,6 CI_{95%}: 15,6-111,2) is lényegesen magasabb volt, mint a citológiai atípiához (RR=16,2 CI_{95%}: 3,9-66,6) ill. a 35 éve feletti életkorhoz társuló kockázat (RR=1,99 CI_{95%}: 1,26-3,16). A HPV16/18 alcsoport többletkockázata non16/non18 csoporthoz képest közel háromszoros volt (RR=2,91 CI_{95%}: 1,67-5,05).

A továbbiakban kiterjesztettük a vizsgálatot 638 betegre (16423 beteghónap) és az alaptanulmányban vizsgált kockázati tényezők mellé bevontuk a gesztációs anamnézist. Továbbá a kiterjesztett tanulmányban vizsgáltuk azt is, hogy kóros elváltozás első észlelése után milyen időtávon, milyen onkológiai kockázatot jelent a kiindulási HPV státusz. A kihordott terhességek száma a citológiára, a HPV státuszra és az életkorra standardizálás után kockázati tényezőnek bizonyult, kihordott terhességenként 1,62-szeresen (CI_{95%}: 1,26-3,16) nőtt a kockázata annak, hogy a HPV fertőzés talaján onkológiai folyamat fejlődik ki. A szűrésen kiemelt méhnyaki elváltozások első észlelését követő 30 hónapos időszaknak mind az első (≤ 1 év), mind a második (>1 év) szakaszán a HPV pozitivitás onkológiai kockázata konzisztensen magas volt [RR=80,4 (CI_{95%}: 19,6 – 330,1) ill. RR=112,8 (CI_{95%}: (15,1 – 840,5)]. A HPV-16/18 típusok háromszoros többletkockázata az egyéb onkogén típusokhoz képest konstans jelleggel mutatkozott meg az első (RR=3,29 CI_{95%}: 1,80-6,0) és a második (RR=3,19 (CI_{95%}: 1,40-7,24) szakaszban. Normál citológia és HPV mentes kiindulási státusz 100% (CI_{95%}: 97%-100%) negatív prediktív értékkel zárt ki manifeszt rákmegelőző elváltozást 2 év távlatában és 99% (CI_{95%}: 94,2%-99,98%) negatív prediktív értékkel 3 év távlatában.

A HPV státusz prognosztikai értékének vizsgálata CIN léziók műtéti eltávolítása után.

A CIN léziók sebészi eltávolítása után a rekurrens betegséget rendszeres ellenőrző vizsgálatokkal lehet időben észlelni. Sajátosságai miatt maga a HPV fertőzés is alkalmas lehet a betegség, akár a minimális reziduális betegség érzékeny kimutatására ugyanis a fertőzött gócban a HPV onkogének folyamatos expressziója szükséges a neoplázia fenntartásához és progressziójához, miközben a környező egészséges hámsejtek mentesek a HPV fertőzéstől.

Összesen 61 beteg CIN eltávolítás utáni nyomon követése (20-53 hónap, medián 33 hónap) során 18 betegben lehetett HPV-t kimutatni Hybrid Capture

módszerrel. A magas kockázatú HPV pozitív eredményeket minden esetben megerősítettük és egyben tipizáltuk PCR-RFLP módszerrel. Amennyiben a CIN eltávolítás után HPV fertőzés nem volt kimutatható, akkor a rekurrens betegséget nagy biztonsággal ki lehetett zárni, sem perzisztens citológiai atípiá, sem CIN lézió nem alakult ki a 43 HPV negatív beteg egyikében sem. A számított negatív prediktív érték minden kimenetel vonatkozásában 100% volt, amelynek megbízhatósági tartománya is teljes egészében 90% felé esett.

Rekurrens betegség csak a műtét után észlelt HPV pozitivitás mellett alakult ki. A műtét utáni HPV pozitív esetek 56%-ában (10/18) perzisztáló citológiai atípiá alakult ki, 22%-ában (4/18) kiújult a premalignus folyamat. A műtét után új HPV fertőzés is kialakulhat hosszú távon újabb kockázatot jelentve.

HLA-II allélek kockázati szerepe a cervikális karcinogenezisben (metaanalízis)

Olyan HLA haplotípusokat vizsgáltuk, amelyeket legalább egy közleményben cervikális karcinogenezis szignifikáns kockázati tényezőjeként azonosított a szakirodalom. A cervikális folyamatokra specifikus HLA halmozódást egységesen az esélyhányados (OR, odds ratio) értékek alapján értékeltük, referencia csoportnak az egészséges kontrollokat vettük. A metaanalízisben a *béta* logisztikus regressziós koefficiensét és annak varianciáját vettük figyelembe, a *béta* koefficiens az esélyhányados természetes alapú logaritmus. A különböző tanulmányok *béta* értékeiből súlyozott átlagot számoltunk, a súlyozás a variancia reciprokával történt. Az így kapott *súlyozott béta* (β_s) értékre emelve az *e* természetes alapot számoltuk ki az összesített esélyhányadost.

HPV indukált cervikális betegség, HPV-16 pozitív és non-16 HPV-pozitív cervikális betegség kategóriákban összesítettük az egyes HLA típusok betegség-specifikus halmozódását. Az összesített esélyhányados és konfidencia intervallum értékek alapján HPV indukált cervikális betegséggel szemben protektívnek bizonyult a DR13 HLA specificitás, HPV-16 pozitív cervikális betegségre emelkedett kockázatot jelentett a DR7 HLA specificitás, a DRB1*1501–DQB1*0602 haplotípus, valamint a DQB1*0302 és DQB1*0303 allélok. Non-16 HPV-pozitív cervikális betegséggel szemben protektívnek bizonyult a DR7 HLA specificitás.

Interleukin (IL)-10 nt-1082(rs1800896) nukleotid polimorfizmusának (A/G) kofaktor szerepe a cervikális karcinogenezisben

A premalignus elváltozásnak számító közepes vagy súlyos fokú CIN léziókban az IL-10 termelés megemelkedik. Eset-kontroll tanulmányban vizsgáltunk az IL-10 promoterben egy olyan polimorf nukleotid pozíciót, amelynek mind transzkripciós faktor kötő, mind promoter aktivitást befolyásoló szerepe ismert. A vizsgálati csoportot 125 onkogén HPV pozitív és 128 HPV negatív beteg alkotta, akiknél a citológiai vagy a kolposzkópos vizsgálat atípiát tárt fel és nt-1082 allél-specifikus PCR módszerrel egyedi nukleotid polimorfizmust tudtunk vizsgálni az IL-10 promoterben. A HPV pozitív esetek 78 %-ában volt citológiai atípiia, a maradék 22%-ban citológiai eltérés nem igazolódott. A HPV típusok eloszlása megfelelt a korábbi tanulmányainknak, a gyakori típusok a HPV-16 (50,4%), a HPV-33 (12,6%), a HPV-31 (10%) és a HPV-18 (6%) voltak. Mellettük kis arányban a következő HPV típusokat mutattuk ki: 35, 45, 52, 53, 56, 58, 66, 72 és 82. A HPV negatív csoportban 65 % volt citológiai atípiia előfordulási aránya.

Az IL-10 promoter nt-1082 allélok betegségekre jellemző halmozódásának megítéléséhez az allélok frekvenciáját egészséges kontroll csoportéhoz hasonlítottuk, amelyben az A és G allél megoszlása 0,51 ill. 0,49 volt és a genotípusok eloszlása is megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúlynak. Ehhez képest szignifikánsan ($p=0,05$) eltérő volt a megoszlás a betegcsoport egészében ($n=253$), a genotípus AA volt 88 esetben (35%), AG volt 123 esetben (49%) és GG volt 42 esetben (16%). A betegcsoportot az onkogén HPV fertőzésre ($n=125$) leszűkítve [AA (28%), AG (52%), GG (20%)] nem lehetett kimutatni a szignifikáns változást ($p=0,70$) az egészséges kontrollokhoz képest, akkor sem, ha a HPV pozitív eseteket citológiai eredmény szerint tovább bontottuk, valamint akkor sem, ha az elemzést a leggyakoribb HPV-16 típusra szűkítettük le ($p=0.61$).

A betegcsoport alábontása viszont a HPV negatív cervikális elváltozások csoportjában tárt fel allél frekvencia eltérést és a genotípus arányok megváltozását. Az utóbbi a HPV-negatív atípiia csoportban ($n=83$) szignifikánsnak [AA (42%), AG (47%), GG (11%); ($p=0,006$)] bizonyult, az A allélt hordozó genotípusok kerültek túlsúlyba. A két allél közötti relatív kockázati különbséget logisztikus regressziós modellben számított esélyhányadossal fejeztük ki. A GG genotípus kb. négyszer kisebb kockázatot [OR=0,27 (CI₉₅: 0,11-0,63)] szignifikáns rezisztenciát jelentett a HPV negatív

citológiai atípiával szemben a referencia AA genotípushoz képest. Az AG genotípusnál észlelt kockázatsökkenés (OR=0,56) konfidencia intervalluma (CI₉₅: 0,31-1,02) megközelített, de nem ért el szignifikáns szintet. Ugyanakkor a logisztikus regressziós modellben számított $p_{\text{for_trend}}=0,05$ érték felvetette azt a lehetőséget, hogy G allél dóziszfüggő módon csökkenti a kockázatot.

Az IL-10 gén expressziós inaktivitása és a promoter CpG metilációja epiteliális eredetű normál és daganatos sejtekben

A diszpláziás és neopláziás léziókban az emelkedett IL-10 szekréció nem hámsejt eredetű annak ellenére, hogy a hámsejtekben a transzkripciós faktorok összetétele ezt lehetővé tenné. Ezért az IL-10 gén epigenetikai mechanizmusok révén kialakult inaktivitását feltételeztük és vizsgáltuk. A kromatin inaktív állapotának kialakításában alapvető szerepet játszik a DNS metiláció, amely típusosan olyan citozinokon következik be, amelyeket guanin követ. Az egyedi CpG helyek számos gén promoterében megtalálhatók. A CpG metilációs szignál hatására a H3 és H4 hisztonok deacetilálódnak, ami az inaktív heterokromatin struktúra kialakulását segíti elő.

A proximális IL-10 promoterben 8 CpG hely található, amelyek a transzkripció kezdőpontjához viszonyítva -634, -599, -373, -352, -350, -320, -185 ill. -110 pozícióban helyezkednek el, melyek CpG metilációját *biszulfid modifikált DNS* minták *szekvenálásával* vizsgáltuk. A hat proximális CpG (-373, -352, -350, -320, -185 and -110) erősen metilált állapotú volt mind a primer keratinocitákban, mind a hámeredetű sejtvonalakban. A legproximálisabb helyzetű ₋₁₁₀CpG az összes vizsgált hám eredetű sejtben teljesen metilált volt, míg az IL-10 termelő perifériás mononukleáris sejtekben (PBMC) a kezeléstől függetlenül metilálatlan állapotban volt. A proximális CpG metiláltsága sejt kultúrákhoz hasonlóan teljes mértékű volt három donor exfoliált cervikális hámsejtjeiben és további 10 *cervix carcinomás* mintában is. A vizsgált fiziológiás és tumoros epiteliális eredetű sejtvonalak közül expressziósan aktív HPV genomot hordoz a Caski, HeLa, SiHa, míg a többi HPV negatív sejt vonal. A legproximálisabb helyzetű ₋₁₁₀CpG konzisztens metilációját a HPV hatástól függetlenül meg lehetett figyelni. A bemutatott eredményeken felül érdemes megjegyezni, hogy primer keratinocitákban HPV-16 E6 és E7 onkogének transzdukciója után is teljesen metilált volt a két proximális CpG.

A CpG metiláció géncsendesítő hatását *in vitro* kísérletes módon *metilációs kazetta módszerrel* is igazoltuk. A proximális promoter -1102 és 14 valamint -

613 és 14 pozíciók közé eső szekvenciáját klónoztuk pGL2-Basic expressziós plazmidba pGL2-1102 ill. pGL2-613 néven. A plazmid konstrukciókból jól reprodukálhatóan ki lehetett vágni a metilálendő kazettát, *SssI* metiláz enzimmel CpG metilálni, majd azt visszaligálni. A promoter kazetta CpG metilálása után tranziens transzfekciós kísérletben vizsgáltuk az expressziós aktivitás változását és a proximális promoter 1,1 és 0,6 kb méretű kazettáinak CpG metilációja egyaránt, >70% mértékben gátolta az IL-10 promoter aktivitását.

Az IL-10 promoter szakaszhoz kötődő hisztonok acetilációs állapotát *kromatin immunprecipitációs módszerrel* vizsgáltuk. A H3 és H4 hisztonok acetilációs állapota azt jelzi, hogy az adott genomszakasz az aktív eukromatinban vagy az inaktív heterokromatinban helyezkedik-e el. A módszer immunprecipitációs lépésében specifikus ellenanyagokkal fogtuk meg azokat a nukleoszóma fragmenteket, amelyekben a H3 ill. H4 molekulák acetilált állapotban voltak. A kvantifikációs lépésben valós idejű PCR reakcióban $\Delta\Delta\text{CT}$ módszerrel határoztuk meg, hogy az IL-10 promoter egyes szakaszai (-669–531 ill. -233–70) milyen arányban precipitálódtak az acetilált H3 ill. acetilált H4 tartalmú nukleoszómákban. A -669–531 promoter szakaszon Ets-1 és Sp1 transzkripciós faktor kötőhelyek, valamint 2 CpG hely található, a -233–70 promoter szakaszon CCAAT-box and STAT-3 kötőhely található a két proximális CpG hellyel együtt. Az IL-10 termelő és nem termelő sejtek a promoter hiszton acetilációs állapotában is markáns különbséget mutattak, a promoter legproximálisabb szakaszán az epiteliális sejtekben nem vagy csak nyomnyi mennyiségben lehetett acetilált hisztonokat kimutatni, ami arra utal, hogy a keratinocitákban és a hámeredetű sejtvonalakban az IL-10 gén az inaktív heterokromatin állományba tartozik.

CpG metiláció a humán papillomavírus genom LCR szabályzó régiójában

A diszpláziás vagy már neopláziás HPV fertőzött cervikális hámsejt autonóm növekedéséhez szükséges optimális virális onkogén expressziót a virális genomban kialakuló **szomatikus genetikai** és **epigenetikai változások** véletlenszerűen kialakuló kombinációja biztosítja. A papillomavirális onkogének expressziós szabályozása az **LCR** régió keresztül valósul meg, amely a virális E6 és E7 onkogének promoterét és enhancer szekvenciáit tartalmazza. *In vitro* fenntartott HPV pozitív sejtvonalakban, organotipikus kultúrákban kimutathatók a HPV genom LCR régiójának CpG metilációs változatai, amelyek a HPV genom állapotával (integrált vagy episzomális) és

kópiaszámával mutatnak összefüggést. A CpG metiláció nemcsak epigenetikai inaktiválódást indukál, hanem az aktív genomon is befolyásolhatja a virális E2 szabályzófehérje kötődését.

Összefoglaló értékelést végeztünk a virális LCR CpG metilációs adataiból a méhnyak HPV fertőzéseiben, HPV által indukált lézióiban és malignomáiban. Az elemzés idején a szakirodalomban található 149 invazív *cervix carcinoma*, 52 cervikális lézió és 107 aszimptomatikus HPV fertőzés CpG metilációs adatait dolgoztuk fel. A feldolgozott esetek HPV-16 és HPV-18 típusok által okozott klinikai fertőzések, megbetegedések voltak. A klinikai mintákról rendelkezésre álló eredményeket az *in vitro* fenntartott sejtes rendszerekben megfigyelt jelenségek és a HPV genom állapota alapján értelmeztük: (i) A klinikai és citológiai szempontból aszimptomatikus mintákban vagy a normál HPV vírusciklus játszódik le transzkripciósan és replikációsan aktív, nem vagy csak részlegesen metilált episzomális virális genomról vagy látens fertőzés alakul ki inaktív, teljesen metilált szintén episzomális vírus genommal. (ii) A HPV indukált *invazív carcinomákban* nagyszámban integrálódott HPV genomok többsége metilációsan inaktivált, míg a sejtenként egy vagy néhány kópiában integrált HPV genomok metilálatlanok maradnak. (iii) A HPV által indukált enyhe diszplázias hámléziókban az aktív episzomális HPV genom egy-egy CpG helyen metilált érintve akár CpG kötőhelyet is, míg a súlyosabb premalignus léziókban már egyes esetekben megjelenhet a több integrált genomi kópiára jellemző metilációs mintázat.

Kísérletes megközelítéssel HPV-31 pozitív citológiai atípiában vizsgáltuk a virális LCR régió teljes hosszában a CpG metilációt. A vizsgálati csoport 22 betegből állt, közülük hétnél CIN2 vagy súlyosabb elváltozás alakult ki. Az esetek nagy részében (16 beteg, 73%) a teljes HPV-31 LCR régióban metilálatlan CpG helyeket találtunk. A maradék hat mintában a promoter szakaszon két, az enhancer szakaszon négy, míg az 5'LCR szakaszon egy CpG pozícióban fordult elő metiláció. A metilált CpG pozíciók közül négy (7479, 7485, 7876, 40) E2 kötőhelyeken fordult elő, amelyek a HPV saját szabályzó fehérjéjét a virális E2 fehérjét kötik. Az LCR régióban CpG metilációt mutató hat klinikai mintában a CpG metiláció egyöntetűen érintette a disztális E2 kötőhely valamely vagy mindkét (7479, 7485) CpG helyét. Ezzel szemben a proximális E2 kötőhelyek inkább hipometiláltak voltak, mindössze két mintában fordult elő metiláció a második, egy mintában a harmadik E2 kötőhelyben és mindhárom esetben megfigyelhető volt mellettük a disztális E2 kötőhely markáns CpG metilációja. Eredményeink szerint a citológiai atípiát okozó HPV

31 fertőzésekben a CpG metiláció opcionális esemény, amely ha bekövetkezik, akkor elsődlegesen a disztális E2 kötőhelyen jelenik meg. A HPV-16 modell alapján a disztális E2 kötőhely CpG metilációja fokozhatja virális onkogén expressziót.

Humán papillomavírus (HPV)-16 E7 onkoprotein aktiváló hatása Src non-receptor tirozin kinázokra

Az Src családba tartozó non-receptor tirozinkinázok *cervix carcinomában* is aktiválódnak. *Kísérletes módon* vizsgáltuk a HPV-16 onkoproteinek hatását az Src kinázok expressziójára és aktiválódására. Míg transzkripciós szinten nem volt kimutatható hatásuk a HPV-16 onkoproteineknek, addig fehérje szinten expressziós különbségeket mutattunk ki az Src kináz családon belül. A Fyn a HPV-16 onkoproteinektől függetlenül konstitutívan expresszáldott. Az Src és a Yes proteinek celluláris szintje viszont markánsan megemelkedett a HPV-16 E6 és E7 papillomavirális onkoproteinek együttes jelenlétében. Az Src kinázok tirozin foszforilációs aktiválódását Western-blot és foszfokináz array módszerekkel vizsgáltuk. Az előbbiben az Src kinázok ⁴¹⁶Y foszforilációját a kinázcsalád szintjén vizsgáltuk és kimutattuk, hogy a HPV-16 E7 onkoprotein jelenlétében legalább egy Src kináz jelentősen aktiválódik. Az Src kináz családon belül foszfokináz array módszerrel vizsgáltuk az egyes kinázokat és kimutattuk, hogy a HPV-16 E7 onkoprotein jelenlétében az Src, a Fyn és a Yes tirozin foszforilációja egyöntetűen fokozódott. Az E6 onkoproteinek nem volt ilyen hatása egyik Src kinázra sem.

Szérum jelenlétével és megemelt kalcium koncentrációval kiváltott differenciálódás önmagában is megemelte a Yes kináz expressziót mind mRNS, mind fehérje szinten. Az Src kinázra viszont differenciálódó körülmények között is a HPV-16 hatott, hasonlóan a proliferáló keratinocitákhoz azzal a különbséggel, hogy az E7 differenciálódó sejtekben önmagában is elegendő volt az Src kináz szintjének növelésére, míg proliferáló sejtekben csak az E6 onkoproteinnel együtt volt ilyen hatása. A HPV-16 E7 onkoprotein Src tirozin foszforilációs hatását a kináz család szintjén nem befolyásolta a gazdasejt differenciálódása. Az mRNS mennyiségi vizsgálatok alapján a HPV-16 differenciálódó sejtekben is poszttranszkripciós módon hat az Src kinázra.

Béta- és gammaherpesvírusok előfordulása periodontitis apicalis léziókban

Prospektíven 40 periapikális léziót gyűjtöttünk, a kontroll csoport 40 impaktált bölcsességfog gyulladás- és szuvasodásmentes pulpája volt. A periapikális léziókat a radiológiai méret alapján $\geq 5\text{mm}$ és $< 5\text{mm}$ csoportokba osztályoztuk, a fogakat pedig panaszmentes és panaszos csoportokba. A gyűjtött mintákból DNS-t és RNS-t izoláltunk, a vírus genomi DNS-ét PCR amplifikálással, az EBNA fehérjék közös leader szakaszáról átíródott virális mRNS-t reverz transzkripciót követő PCR amplifikálással mutattuk ki. A vizsgált vírusok halmozódását, génexpressziós aktivitását egyrészt a kontroll csoporthoz viszonyítottuk, másrészt a fentebb részletezett betegcsoportok között hasonlítottuk össze.

Az összes periapikális lézió 72%-ban mutattuk ki az Epstein-Barr vírus (EBV) jelenlétét, míg a kontroll mintákban csak 2,5%-ban fordult elő. Az esetek jelentős részében, az összes minta felében az EBV genomról folyó génátírást is ki lehetett mutatni. A kontroll mintákhoz viszonyítva mindkét mind a genomi DNS, mind az EBNA transzkripció szintjén szignifikánsnak bizonyult az EBV halmozódása *periodontitis apicalis*ban. A periapikális léziókat tovább csoportosítottuk panaszosság ill. radiológiai lézióméret szerint és minden alcsoportban mindkét EBV marker szignifikánsan gyakrabban fordult elő, mint a kontrolloknál. Az előfordulási arányok mindazonáltal magasabbak voltak, ha a lézió panaszt okozott a betegnek (82% *EBV pozitívitas*) vagy ha nagyméretű volt (91% *EBV pozitívitas*). A továbbiakban azt vizsgáltuk a radiológiai és az EBV paraméterek milyen mértékben határozzák meg a panaszos manifesztáció kockázatát és azt tapasztaltuk, hogy az EBNA transzkripció és a nagy lézióméret együttes előfordulása jelentett szignifikáns [OR=8,8 (CI₉₅: 1,69-45,8)] kockázatot a panaszos manifesztációra.

A bétaherpesvírusok előfordulási aránya az EBV-nél lényegesen alacsonyabb volt, a HCMV, a humán herpesvírus (HHV)-6A és a HHV-6B egyaránt a léziók 10%-10%-ában fordult elő. Közülük a HHV-6B szignifikáns összefüggést ($p < 0,05$) mutatott a klinikai típussal, mind a négy HHV-6B fertőzés nagyméretű panaszos lézióban fordult elő.

TNF-alfa és TGF-béta mRNS expresszió vizsgálata periapikális léziókban

*Periodontitis apicalis*ban a TNF-alfa és a TGF-béta révén olyan citokinek expressziója fokozódik, amelyeknek herpesvírusok által okozott fertőzésekben is patogén szerepük van. A TNF-alfa egyrészt csontreszorpciót indukál az oszteoklasztok aktiválása révén, másrészt a nociceptív jelátvitel befolyásolásával hiperalgéziát okozhat. A TGF-béta szerepe is többretű, egyrészt a gyógyulást segíti elő a fibroblasztok proliferációja, a kötőszöveti állomány szintézise és az angiogenezis révén, másrészt negatív szabályzó szerepet tölt be a limfociták, elsősorban a citotoxikus T-sejtek gátlása révén ill. a toll-like receptorokhoz kapcsolódó jelátvitel gátlásával.

Ötvennyolc prospektíven gyűjtött periapikális léziót dolgoztunk fel az előző bekezdésben leírtak szerint. Az izolált RNS-ből reverz transzkripciót követő Taqman génexpressziós módszerrel határoztuk meg a TNF-alfa és a TGF-béta mRNS-ek GAPDH endogén kontroll mRNS-re vonatkoztatott relatív expresszióját. Az egyes vizsgálati csoportokban a relatív citokin expresszió medián, kvartilis és szélső értékeit ábrázoltuk, a vizsgálati csoportokat a medián citokin expresszió alapján hasonlítottuk össze, két csoport közötti különbség szignifikanciáját non-parametrikus Mann-Whitney analízissel vizsgáltuk.

A Taqman génexpressziós vizsgálatok alapján a periapikális léziókban a medián TNF-alfa mRNS expresszió közelítőleg 13-szor ($p < 0,001$), a medián TGF-béta mRNS expresszió közelítőleg ötször ($p < 0,001$) volt magasabb, mint a kontroll mintákban. A periapikális léziókban sem a panaszosság, sem a radiológiai méret nem befolyásolta sem a TNF-alfa, sem a TGF-béta expressziót. A vizsgált herpesvírusok közül az EBV jelenléte szignifikánsan ($p = 0,03$) emelte a TNF-alfa expressziót, és nem szignifikánsan ($p = 0,11$) csökkentette a TGF-béta expressziót a léziókban.

Morbillivírus kimutatása ankyloticus stapes talpmintákból

Az *otosclerosis* kizárólag az *oticus capsula* területén fordul elő, amelyhez a *stapes* talp is tartozik. A fixáció (*stapes ankylosis*) kezelése műtéttel történik, az ovális ablak keretéről eltávolított *stapest* vagy *stapes* talpat művi implantátummal helyettesítik. A *stapes* talp fejlődéstanilag is különbözik a kontroll mintaként vizsgált temporális csonttól, többi hallócsonttól és a *stapes* szártól (*stapes* szuperstruktúrától). A vizsgálataink első szakaszában 34 műtéti úton eltávolított *stapes* talpmintából RNS-t izoláltunk. A vizsgálatok második

szakaszához a nukleinsav alapú és a morfológiai vizsgálatokra is alkalmas feldolgozás módszerét előrehaladott arterioszklerotikus *carotis* mintákon dolgoztuk ki. A tapasztalatokat alapján a vizsgálatok második szakaszában a szintén szklerotikus, kalcifikált *stapes* fixáció morfológiai és morbillivírus RNS vizsgálatára további 44 eltávolított *stapes* talpmintából 10 um-es fagyasztott metszet sorozat készült a sorozat páratlan tagjai PCR amplifikálásra, a páros tagjai szövettani vizsgálatra kerültek. A vizsgálatok harmadik szakaszában további 76 mintát gyűjtöttünk és az első szakaszhoz hasonlóan tártuk fel az RNS-t

A vizsgálatok első szakaszában a 34 *stapes* talpmintából 20-ban (59%) mutattunk ki morbillivírus RNS-t. Ebben a sorozatban kilenc olyan csontmintát vizsgáltunk, amely nem része az *oticus capsulának*, mind a három *stapes* szuperstruktúra és mind a hat kortikális csontfragmentum morbillivírus negatívnak bizonyult. Ennek a vizsgálati szakasznak a tapasztalatai alapján a harmadik vizsgálati szakaszban a kontroll csontminták számát is jelentősen emeltük. A műtétek közben eltávolított 64 kontroll minta egyikében sem lehetett morbillivírus RNS-t kimutatni, ahogyan a nem *otosclerosis*os két cadaver *stapes* talpból sem. A kontroll minták között nagyobb arányban kortikális csontfragmentumok (42 minta) és *stapes* szuperstruktúra (19 minta) fordult elő, amelyekben a morbillivírus RNS teljes hiánya szignifikánsan ($p < 0,001$) eltért a 154 *stapes* talp 64%-os (99/154) morbillivírus RNS prevalenciájától.

Összesen 44 *stapes* talpmintában összevetettük a morbillivírus RNS előfordulását a *stapes* fixáció háttérében álló szövettani folyamattal. A mintáknak kb. a fele az *otosclerosis* aktív, csontátépüléssel jellemezhető fázisában volt, míg az egyötöde az *otosclerosis* késői inaktív stádiumában volt, amelyben a szklerotikus kötőszöveti állományban gazdag, sejtszegény állomány dominál. A morbillivírus RNS előfordulás igen fajlagos és szenzitív módon, 100-100 %-ban kötődött az *otosclerosis*hoz, míg az egyéb *stapes* fixációkban nem lehetett kimutatni.

TNF-alfa mRNS expresszió és a morbillivírus stapes ankylosisban

A előző fejezetben kifejtett módon, a szakirodalomban jelentékeny méretű tanulmányban mutattuk be a morbillivírus RNS előfordulását az *ankylosis* *stapes* talpmintákban. A morbillivírus pozitív *stapes* fixációs esetek 89 %-ában kimutatható volt a TNF-alfa mRNS expresszió, míg a morbillivírus negatív eseteknek csak 11 %-ában, ami szignifikáns különbségnek ($p < 0,01$) bizonyult. A

kontroll minták közül a folyamat közvetlen környezetében lévő *stapes* szuperstruktúrákban nem volt kimutatható TNF-alfa mRNS expresszió.

A morbillivírus pozitív *stapes ankylosis* esetek preoperatív audiometriai eredményeit összevetettük a TNF-alfa mRNS expresszióval. Az audiometriával meghatározott csontlégköz érték alacsony frekvencián (0,25-0,5 kHz) szignifikánsan alacsonyabb volt a TNF-alfa mRNS expressziót mutató esetekben, mint a TNF-alfa negatív csoportban (30 ± 10 dB vs. 50 ± 12 dB, $p < 0,001$). A halláscsökkenéses panaszok a TNF-alfa mRNS pozitív esetekben a műtét előtt $4,1 \pm 1,8$ évvel jelentkeztek először, szemben a TNF-alfa negatív csoporttal, ahol a műtét előtt $9,6 \pm 3,54$ tartamban állt fenn a halláscsökkenés. Az említett klinikai adatok arra utalnak, hogy a TNF-alfa pozitív csoport az otosclerosis aktív korai stádiumában, míg a TNF-alfa negatív csoport az előrehaladott késői stádiumában volt.

Megbeszélés

Humán papillomavírusok (HPV) és cervikális karcinogenezis

A méhnyakszűrés során költséghatékonysági szempontból megengedett olyan tesztek használata, amelyek csak az onkogén HPV típusokra szűrnék. Ha olyan HPV kimutatási eljárást alkalmaz a laboratórium, amely a magas kockázatú mellett alacsony kockázatú HPV fertőzéseket is azonosít, akkor diagnosztikai szempontból fel kell készülni a kizárólag alacsony kockázatú pozitívítás, valamint az alacsony kockázatú plusz magas kockázatú kettős pozitívítás interpretálására. Az előbbi ugyan önmagában nem jár onkogén kockázattal, de ugyanúgy szexuális úton terjed és az egyik szexuális úton terjedő fertőzés olyan életvitelre utal, amely fokozza bármely másik szexuális fertőzés pl. egy onkogén HPV fertőzés esélyét. A Hybrid Capture kettős pozitívításban az eredményeink szerint az onkogén HPV fertőzést kell figyelembe venni az teszteredmény interpretálásánál.

Ismert, hogy a magas onkogén kockázatú HPV fertőzés mellett kialakuló citológiai atípiá érzékeny egy pontos becslést nyújt arra, hogy a háttérben fejlődik-e CIN lézió. A mi tanulmányunkban is a legtöbb közepes/súlyos *cervicalis intraepithelialis neoplasia* (CIN-2+) lézió a magas kockázatú HPV plusz citológiai atípiá csoportban alakult ki, de a többi CIN-2+ lézió

kialakulására is igaz volt, hogy vagy magas kockázatú HPV fertőzés vagy citológiai atípiia jelen volt a követés kezdetén. A vakcinába szánt HPV-16/18 típusok onkogén kockázata mintegy háromszorosa volt az egyéb magas kockázatú típusokénak. A citológiai atípiia a HPV fertőzésben akkor alakul ki, ha a fertőzés perzisztál, azaz az összefüggés elemzés szempontjából a HPV pozitív citológiai atípiia a perzisztencia meghatározást helyettesítő, pótlólagos paraméter, amelynek mindaddig független kockázati tényező szerepe várható az elemzésekből, amíg a perzisztenciát közvetlenebbül nem lehet mérni.

A műtétet követően a HPV pozitivitásnak két forrása lehet, új fertőzés ill. a premalignus elváltozás reziduumból rekuráló megbetegedés. Vizsgálatunkban új fertőzésre utalt, ha a műtét után a műtét előttihez képest másik HPV típus jelent meg. Az új fertőzések lefolyása tranziens jellegű volt és alig járt citológiai atípiával együtt. A műtét utáni HPV negativitás magas *negatív prediktív értéke* jó összhangban van más vizsgálatokkal.

A papillomavírus fertőzések következtében kialakuló premalignus és malignus méhnyaki megbetegedések kockázatát befolyásolja az egyén HLA összetétele. HPV indukált cervikális betegség, HPV-16 pozitív és non-16 HPV-pozitív cervikális betegség kategóriákban összesítettük az egyes HLA típusok betegség-specifikus halmozódását. Az összesített esélyhányados és konfidencia intervallum értékek alapján HPV indukált cervikális betegséggel szemben protektívnek bizonyult a DR13 HLA specificitás, HPV-16 pozitív cervikális betegségre emelkedett kockázatot jelentett a DR7 HLA specificitás, a DRB1*1501–DQB1*0602 haplotípus, valamint a DQB1*0302 és DQB1*0303 allélok. Non-16 HPV-pozitív cervikális betegséggel szemben protektívnek bizonyult a DR7 HLA specificitás.

A hazai populációban nem igazolódott egyik IL-10 promotor nt-1082 allél halmozódása sem a HPV indukált hámléziókban. Érdekes eredménynek tartjuk azonban a HPV fertőzéstől független hámelváltozásokban tett megfigyeléseinket. Az utóbbi elváltozásokban valószínűleg jóval gyakoribb a gyulladásnak a szerepe, amit viszont közvetlen függésben van az anti-inflammatorikus citokinnel ill. annak expressziós szabályzásával.

Vizsgálatainkban konzisztens CpG metilációs mintázatot figyeltünk meg *cervix carcinoma* eredetű sejtvonalakban és biopsziákban. A normál epiteliális sejteket primer keratinocitákkal és az immortalizált HaCaT keratinocita sejtvonallal modelleztük a különböző kísérletekben. Mivel ez utóbbi sejtek nem cervikális eredetűek, *ex vivo* exfoliált normál cervikális sejteket is bevontunk a CpG

metilációs vizsgálatba. A CpG metilációs eredményeket összegezve a legproximálisabb $_{10}$ CpG metilációja korrelált a legkövetkezetesebben az IL-10 expresszió hiányával, de a tőle disztálisan eső következő öt CpG hely metilációja is jó korrelált. A proximális IL-10 promoterhez kapcsolódó hisztonok acetilációs állapota szintén a 6 proximális CpG metilációjával korrelált. A funkcionális vizsgálatokat tranzienst transzfekciós rendszerben végeztük. A promoter kazetta CpG metilációja hatékonyan gátolta a promoter működését. A proximális 0,6 és 1,1 kb szakaszban funkcionális különbséget nem tudtunk kimutatni, ami arra utal, hogy transzkripciós kezdőhely szomszédságában elhelyezkedő szekvenciáknak kiemelkedő szerep jut a transzkripciós és az epigenetikai szabályozásban.

Irodalmi adatok értékelésével megállapítottuk, hogy a HPV genom fő szabályzó (LCR) régiójában a CpG metiláció nemcsak a gazdasejt transzformációja során következhet be, hanem az onkológiai elváltozásokkal nem járó fertőzések egy részében is megjelenik. Az utóbbi jelenséget látens fertőzési mechanizmusnak tulajdonítottuk. Az LCR régió CpG metilációját látens HPV fertőzésben később tőlünk függetlenül kísérletes klinikai tanulmányban célzottan is kimutatták. A jelentős prevalenciával bíró HPV-31 típusban a virális onkogén expresszióért felelős LCR szabályzó régióban a CpG metiláció elsődlegesen a disztális E2 kötő helyen jelent meg.

A humán papillomavírusok természetes szaporodási ciklusa érinti mind a proliferálódó bazális laphámsejteket, a felsőbb laphámrétegek differenciálódó sejtjeit. A projektben alkalmazott kísérleti rendszerünk alkalmas mindkét állapot modellezésére. A projektben azt vizsgáltuk, hogy a cervikális karcinogenezist elindító és fenntartó papillomavirális onkoproteinek milyen módon befolyásolják az Src non-receptor tirozinkinázok expresszióját és aktivitását. Az immortalizálódott sejtekben mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között kisselektálódnak legjobb proliferációs képességet biztosító szomatikus genetikai, génexpressziós elváltozások. Az utóbbiak zavaró hatásának minimalizálása miatt a kísérleteinket a transzdukciót követő 5-8 passzázs alatt végeztük, amely alatt nem volt várható az eredményeinket befolyásoló véletlen szomatikus elváltozás kisselektálódása. A keratinocitákban Src kinázcsaládon belül expressziós heterogenitást figyeltünk meg. A differenciálódás önmagában is fokozta a Yes és a Fyn transzkripcióját, a Yes esetében a fokozott transzkripció hatását fehérje szinten is ki lehetett mutatni. A papillomavirális onkoproteinek közül csak az E6, csak differenciálódó körülmények között és csak a Yes kinázra fejtett ki szignifikáns transzkripciós hatást. Protein szinten a

konstitutív Fyn expresszió mellett az Src és a Yes jelenlétére a papillomavirális onkoproteinek és a differenciálódás kombinált hatását figyeltük meg. Az expressziós heterogenitás mellett viszont a tirozin foszforilációs aktiválásban egységesen az E7 onkoprotein játszott szerepet.

Humán herpesvírusok és a periodontitis apicalis

A *periodontitis apicalis* és az EBV kapcsolatát korábban részben EBNA mRNS detektálásán keresztül részben pedig az LMP fehérjék immunhisztokémiai kimutatásával igazolták. Mind az EBNA mRNS, mind az LMP fehérjék jelenléte az EBV III. típusú látencia fázisára utal, amelyben ugyan vírusreplikáció nem folyik, de a B-limfocita gazdasejtben fokozódik a proliferáció és egyes citokinek, (pl. TNF-alfa, TGF-béta) termelődése. Saját tanulmányunk is kimutatta az EBV fertőzés ezen stádiumának nagyarányú előfordulását a vizsgált periapikális léziókban. A korábbi tanulmányokhoz képest az eredményeink abban jelentettek előrelépést, hogy kimutattuk a nagy lézióméret és a virális transzkripció együttes kockázati szerepét a panaszos megnyilvánulásban.

Humán herpesvírus (HHV)-6 orális jelenléte az EBV-hez hasonlóan jól ismert és az ínyszél felől kialakuló *parodontitis chronicában* többen is kimutatták. Azonban *periodontitis apicalisban* munkacsoportunk írta le a két HHV-6 species jelenlétét. A HHV-6A főként panaszmentes és kisméretű léziókban fordult elő, míg a HHV-6B szignifikánsan halmozódott a nagyméretű panaszos periapikális léziókban. Ugyan a HHV-6 tendenciaszerűen az EBV-vel koinfekcióban fordult elő, mégis valószínű, hogy a HHV-6 vírusok halmozódása klinikai manifesztáció mentén az EBV hatástól függetlenül jelentkezett, mivel minden EBV/béta herpesvírus koinfekcióban ott volt az EBNA expresszió, de a nagyméretű panaszos lézióval csak a HHV-6B fertőzés asszociált, a többi béta herpesvírus nem.

A periapikális léziókban folyó fokozott TNF-alfa és TGF-béta termelődést a jelen vizsgálatban mRNS expressziós szinten erősítettük meg. A *periodontitis apicalisban* elsődleges kóroki szerepet játszó Gram-negatív endodonto-patogén baktériumok kísérletesen körülmények között hatékonyan indukálják ezen citokinek termelődését. Vizsgálatainkban az endodontális mikrobiota virális komponensének szerepét tanulmányoztuk a periapikális léziók klinikai paramétereivel együtt. A vizsgált tényezők közül az EBV jelenlétéhez az alapfolyamatén túl további szignifikáns TNF-alfa emelkedés társult. Bár az EBV

jelenléte összefüggésben van a lézió méretével és a panaszos manifesztációjával, az utóbbi klinikai paraméterek nem befolyásolták a TNF-alfa expressziót, ami arra utal, hogy az EBV fertőzés közvetlenül hathat a TNF-alfa génexpresszióra. A HCMV és HHV-6 vírusok jelenlétében nem lehetett szignifikáns változást megfigyelni a TNF-alfa expresszióban.

Morbillivírus és az otosclerosis

Az első vizsgálati sorozatunkban olyan mintákat dolgoztunk fel, amelyek kivizsgálásánál *stapes* fixációt valószínűsítettek ill. a műtét során igazoltak. A *stapes* fixáció hátterében a klinikai adatok alapján otosclerosist lehetett feltételezni ill. *stapes* fixációt okozó folyamatok ismeretében a minták többségében valóban *otosclerosis*nak kellett lenni, bár ebben a vizsgálati sorozatban azt nem lehetett megmondani, hogy pontosan melyik mintában volt *otosclerosis*. Ez a vizsgálati sorozat mutatta meg, hogy a virális RNS-t közvetlenül a csontot érintő gócból lehetett kimutatni a *stapes* fixációs esetek nagyobb felében és nem lehetett kimutatni a középfül egyéb csontos elemeiből. Az első vizsgálati szakasz eredményei alapján a további tanulmányokban részben az otosclerosis definitív diagnózisát biztosító szövettani vizsgálatot végeztünk, részben a középfül, ontogenetikailag eltérő eredetű csontos elemeit kontroll minta minőségben gyűjtöttük. A kontroll csontminták számának növelése igazolta, hogy a középfül egyéb csontos elemeiben (42 kortikális csont, 19 *stapes* szuperstruktúra, 3 egyéb hallócsont) valóban nem fordul elő morbillivírus RNS, hiába alakult ki a *stapes ankylosis*, azaz a virális RNS előfordulása az *ankylosis* által érintett területre korlátozódott. A továbbiakban a definitív szövettani eredménnyel vetettük össze a morbillivírus előfordulását. Mind aktív, mind késői inaktív stádiumú *otosclerosis*ban minden esetben kimutattuk a virális RNS-t, míg az egyéb *stapes ankylosis*os esetek közül egyben sem.

A perzisztens morbillivírus fertőzés tartós antigénstimulussal és a gyulladás tartós fenntartásával járhat. Az fentiek alapján a morbillivírus pozitív esetek mögött otosclerosis, míg a morbillivírus negatív mögött egyéb *stapes* fixáció (genetikus, disztrófiás meszesedés, egyéb gyulladásos eredetű) lehetett. A morbillivírus pozitív esetekben jellemzően fennálló TNF-alfa expresszió összhangban van az aktív reszorpciós gócot tartalmazó *otosclerosis*os *stapes* fixáció patomechanizmusával. A morbillivírus pozitív TNF-alfa negatív esetekben az otosclerosis valószínűleg már előrehaladott, inaktív stádiumban

volt. A morbillivírus negatív *stapes* fixációs esetek heterogenitását a TNF-alfa expresszió is alátámasztja, gyulladással járó patomechanizmus csak az esetek töredékében volt jelen.

Összefoglalás és új eredmények

Munkám során perzisztens fertőzések patogenetikai szerepét vizsgáltam három klinikai témában. A humán papillomavírusok szerepét a cervikális karcinogenezisben, a herpesvírusok szerepét a *periodontitis apicalis chronicában*, a morbillivírus szerepét az *otosclerosisban* molekuláris epidemiológiai módszerekkel, klinikai tanulmányokkal közelítettem meg. A vizsgált tárgyat képező perzisztensen fertőző mikroorganizmusokat érzékeny nukleinsav alapú vizsgálati módszerekkel lehetett detektálni. A jellemzően inhomogén klinikai mintákból megoldottuk a kórokozó és a gazdasejt eredetű nukleinsavak megfelelő feltárását és nukleinsav amplifikációs detektálását. A mikroorganizmusokra specifikus nukleinsav szekvenciák betegség specifikus halmozódását mindhárom klinikai területen szignifikáns mértékben mutatta ki kutatócsoportom. Mindhárom klinikai területen igazoltuk, hogy mikroorganizmus jelenlétéhez olyan patomechanizmusok társulnak, amelyek hozzájárulnak a vizsgált megbetegedés fenntartásához, progressziójához. A humán papillomavírusok patogenetikai szerepének vizsgálatában a molekuláris feltételrendszer időbeli és reverzibilitási pontjait is vizsgáltuk, amelynek eredményei konzisztensen illeszkedtek a betegség specifikus halmozódásra vonatkozó eredményekhez. A humán papillomavírusok kórokozó képességének molekuláris mechanizmusait *in vitro* kísérletes rendszerekben vizsgáltam. A vizsgált perzisztens fertőzések kórfolyamatainak megismerésében az alábbi új eredmények születtek:

Humán papillomavírusok patogenetikai szerepe

- A nukleinsav hibridizáción alapuló Hybrid Capture HPV® rendszer hatékonyan kiegészíthető PCR amplifikáción és restriktációs enzimhasításon alapuló tipizálással. A hibridizációs körülmények a tesztben validált HPV típusokon túl további HPV típusok kimutatására is alkalmasak. Az ebből adódó típusbővülés elhanyagolható mértékben érinti

az onkogén és nem onkogén HPV típusok elkülönítését és nem befolyásolja az eredmények klinikai interpretációját.

- Kutatócsoportom írta le, hogy az elsődleges vakcina típusok (HPV-16, HPV-18) onkológiai kockázata háromszorosan meghaladja az egyéb onkogén típusokét. Kóros citológiai elváltozás mellett az elsődleges vakcinatípusok háromszor nagyobb onkológiai kockázata legalább 30 hónapos időtávon fennáll.
- Az onkogén HPV csoporton belüli háromszoros különbség több mint húszszor alacsonyabb, mint az a kockázat, amelyet a csoport egésze jelent. A méhnyakszűrés hatékonyságát jelentős mértékben növeli az onkogén HPV csoport szintjén informatív diagnosztika, amelyhez képest a csoporton belüli további tipizálás szekunder prevenciók értéke elhanyagolható.

Eredményeim igazolták a papillomavírus kimutatás kiváló negatív prediktív értékét mind citológiai atípiában, mind a rákmegelőző elváltozások műtéti eltávolítása után. A gazdaszervezeti tényezők közül a kiviselt terhességek kockázati tényező szerepét igazoltuk

- Az IL-10 promoterben nt-1082(*rs1800896*) G allélt hordozó nők kevésbé fogékonyak a HPV fertőzéstől független citológiai atípiára, mint az AA homozigóták. Ugyanakkor a HPV által indukált citológiai eltérésekre nem hatott az IL-10 promoter nt-1082 polimorfizmusa.
- Az IL-10 gén proximális promoter szakaszán konzisztens CpG metilációs mintázat figyelhető meg cervix carcinoma eredetű sejtvonalakban, valamint exfoliált hámsejtekben és cervix carcinoma biopsziákban. A metilációs mintázat legspecifikusabb eleme a legproximálisabb -110 CpG, amelynek metilációs állapota korrelált a legkövetkezetesebben az IL-10 expresszió hiányával. Mind a fiziológiás, mind a neoplasztikus epiteliális sejtekben az IL-10 promoter CpG metilációja együtt jár a deacetilált hiszton (H3 és H4) struktúrával. Az IL-10 gén epigenetikusan inaktivált állapotát nem befolyásolja a HPV genom jelenléte vagy hiánya.
- A proliferálódó keratinocitákban a non-receptor Src tirozinkinázok közül a Fyn konstitutív módon jelen van, míg az Src és Yes szintje HPV-16 E6 és E7 onkoproteinek együttes jelenlétében növekszik meg. Az E7 onkoprotein további hatása, hogy tirozin foszforilációs mechanizmussal fokozza a jelenlévő Src kinázok aktivitását.

Humán herpesvírusok patogenetikai szerepe

- Az endodonto-patogén baktériumok által kiváltott *periodontitis apicalis chronica* kórfolyamatban magas gyakorisággal előfordul az EBV vírus. Az EBV fertőzések mintegy kétharmadában megfigyelhető a transzformáló EBNA gének transzkripció aktivitása, amely a lézió radiológiai méretével együtt a panaszos manifesztáció kockázati tényezője.
- Kutatócsoportom írta le a HHV-6 vírusok előfordulását a periapikális léziókban, valamint a HHV-6B vírus halmozódását a nagyméretű, panaszos manifesztációjú periapikális léziókban.
- A periapikális léziókban az alapfolyamatra jellemző fokozott citokin termelődésen túl, az EBV jelenlétéhez a TNF-alfa génexpresszió további emelkedése társul.

Morbillivírus patogenetikai szerepe

- Az morbillivírus RNS jelenléte specifikusan társul az *otosclerosis* által okozott *stapes* fixációhoz és csak a megbetegedést okozó gócban fordul elő, a környező, eltérő fejlődéstani eredetű csontokban nem.
- A TNF-alfa mechanizmus aktiválódása jellemzően a *stapes ankylosis* morbillivírus pozitív, *otosclerosis* formájának aktív stádiumában jelenik meg.

Az értekezést megalapozó közlemények

Kónya J, Veress G, Juhász A, Szarka K, Sáy T, Hernádi Z, Gergely L
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: pp. 408-411. (2000)
IF: 3.503

Kónya J, Dillner J
Immunity to oncogenic human papillomaviruses
ADVANCES IN CANCER RESEARCH 82: pp. 205-238. (2001)
IF: 11.192

Szőke K, Sáy T, Krasznai Z, Hernádi F, Szládek G, Veress G, Dillner J, Gergely L, Kónya J
Moderate variation of the oncogenic potential among high-risk human papillomavirus types in gynecologic patients with cervical abnormalities
JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 71:(4) pp. 585-592. (2003)
IF: 2.371

Karosi T, **Kónya J**, Szabo LZ, Sziklai I
Measles virus prevalence in otosclerotic stapes footplate samples
OTOLOGY & NEUROTOLOGY 25:(4) pp. 451-456. (2004)
IF: 1.219

Szőke K, Szalmás A, Szládek G, Veress G, Gergely L, Tóth FD, Kónya J
IL-10 promoter nt-1082A/G polymorphism and human papillomavirus infection in cytologic abnormalities of the uterine cervix
JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH 24:(4) pp. 245-251. (2004)
IF: 2.593

Hernádi Z, Szőke K, Sáy T, Krasznai ZT, Soós G, Veress G, Gergely L, Kónya J
Role of human papillomavirus (HPV) testing in the follow-up of patients after treatment for cervical precancerous lesions
EUROPEAN JOURNAL OF OBSTETRICS GYNECOLOGY AND REPRODUCTIVE BIOLOGY 118:(2) pp. 229-234. (2005)
IF: 1.141

Karosi T, **Kónya J**, Szabo LZ, Pytel J, Jori J, Szalmás A, Sziklai I
Codetection of measles virus and tumor necrosis factor-alpha mRNA in otosclerotic stapes footplates
LARYNGOSCOPE 115:(7) pp. 1291-1297. (2005)
IF: 1.617

Karosi T, **Kónya J**, Petko M, Sziklai I
Histologic otosclerosis is associated with the presence of measles virus in the stapes footplate
OTOLOGY & NEUROTOLOGY 26:(6) pp. 1128-1133. (2005)
IF: 1.340

Hernadi Z, Gazdag L, Szoke K, Sapy T, Krasznai ZT, **Kónya J**
Duration of HPV-associated risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia
**EUROPEAN JOURNAL OF OBSTETRICS GYNECOLOGY AND REPRODUCTIVE
BIOLOGY** 125:(1) pp. 114-119. (2006)
IF: 1.273

Kónya J, Molnar S, Magyar M T, Szekeres C C, Kerenyi L, Csiba L
Severity of carotid atherosclerosis unrelated to Chlamydia pneumoniae infection in acute
ischemic stroke patients: A clinicopathological study
CEREBROVASCULAR DISEASES 25:(1-2) pp. 170-175. (2008)
IF: 3.041

Szalmas A, Banati F, Koroknai A, Laszlo B, Feher E, Salamon D, Gergely L, Minarovits J,
Kónya J
Lineage-specific silencing of human IL-10 gene expression by promoter methylation in
cervical cancer cells
EUROPEAN JOURNAL OF CANCER 44:(7) pp. 1030-1038. (2008)
IF: 4.475

Szalmas A, **Kónya J**
Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis
SEMINARS IN CANCER BIOLOGY 19:(3) pp. 144-152. (2009)
IF: 6.918

Hernádi K, Szalmás A, Mogyorósi R, Czompa L, Veress G, Csoma E, Márton I, **Kónya J**
Prevalence and activity of Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in symptomatic and
asymptomatic apical periodontitis lesions.
JOURNAL OF ENDODONTICS 36:(9) pp. 1485-1489. (2010)
IF: 3.291

Hernádi K, Csoma E, Ádám B, Szalmás A, Gyöngyösi E, Veress G, Márton I, **Kónya J**
Association of human herpesvirus 6 subtypes with symptomatic apical periodontitis
**ORAL SURGERY ORAL MEDICINE ORAL PATHOLOGY ORAL RADIOLOGY AND
ENDODONTICS** 112:(3) pp. 401-406. (2011)
IF: 1.457

Hernádi K, Gyöngyösi E, Mészáros B, Szakács L, Szalmás A, Csoma E, Mogyorósi R,
Czompa L, Veress G, Varga I, Márton IJ, **Kónya J**
Elevated Tumor Necrosis Factor-alpha Expression in Periapical Lesions Infected by Epstein-
Barr Virus
JOURNAL OF ENDODONTICS 39:(4) pp. 456-460. (2013)
IF: 2.788

Szalmás A, Gyöngyösi E, Ferenczi A, László B, Karosi T, Csomor P, Gergely L, Veress G,
Kónya J
Activation of Src, Fyn and Yes non-receptor tyrosine kinases in keratinocytes expressing
human papillomavirus (HPV) type 16 E7 oncoprotein
VIROLOGY JOURNAL 10: Paper 79. 9 p. (2013)
IF: 2.089

Egyéb idegennyelvű közlemények a PhD fokozatszerzés után

Szarka K, Veress G, **Kónya J**, Gergely L

Frequency of p53 codon 72 genotypes in human papillomavirus associated squamous intraepithelial lesions and cervical cancer

ANTICANCER RESEARCH 19: pp. 2377-2379. (1999)

Sapy T, Hernadi Z, **Kónya J**, Lukacsko L

Poor clinical outcome in early stage cervical cancer with human papillomavirus-18 positive lymph nodes

EUROPEAN JOURNAL OF OBSTETRICS GYNECOLOGY AND REPRODUCTIVE BIOLOGY 90:(1) pp. 93-95. (2000)

Szarka K, Veress G, Juhász A, **Kónya J**, Sápy T, Soós G, Hernádi Z, Gergely L

Integration status of virus DNA and p53 codon 72 polymorphism in human papillomavirus type 16 positive cervical cancers

ANTICANCER RESEARCH 20: pp. 2161-2167. (2000)

Bacsi A, Csoma E, Beck Z, Andirko I, **Kónya J**, Gergely L, Toth FD

Induction of HIV-1 replication in latently infected syncytiotrophoblast cells by contact with placental macrophages: role of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha

JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH 21: pp. 1079-1088. (2001)

Juhász A, Remenyik E, **Kónya J**, Veress G, Bégány A, Andirkó I, Medgyessy I, Hunyadi J, Gergely L

Prevalence and age distribution of human herpesvirus-8 specific antibodies in Hungarian blood donors

JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 64: pp. 526-530. (2001)

Juhász A, **Kónya J**, Beck Z, Remenyik E, Veress G, Bégány A, Medgyessy I, Hunyadi J, Gergely L

HHV-8 ELISA based on a one-step affinity capture of biotinylated K8.1 antigen

JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS 94: pp. 163-172. (2001)

Szöke K, Szládek G, Szarka K, Juhász A, Veress G, Gergely L, **Kónya J**

Human cytomegalovirus load in the peripheral blood determined by quantitative competitive polymerase chain reaction

ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 48: pp. 313-321. (2001)

Veress G, Murvai M, Szarka K, Juhász A, **Kónya J**, Gergely L

Transcriptional activity of human papillomavirus type 16 variants having deletions in the long control region

EUROPEAN JOURNAL OF CANCER 37: pp. 1946-1952. (2001)

Csoma E, Bácsi A, Liu X, Szabó J, Ebbesen P, Beck Z, **Kónya J**, Andirkó I, Nagy E, D. Tóth F

Human herpesvirus 6 variant A infects human term syncytiotrophoblasts in vitro and induces replication of human immunodeficiency virus type 1 in dually infected cells

JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 67: pp. 67-87. (2002)

Banhegyi D, Bacsi A, Toth FD, Prohaszka Z, Horvath A, Beck Z, **Kónya J**, Fust G
 Significant decrease of the enhancement/neutralization index in HIV patients during highly active antiretroviral therapy (HAART)
 IMMUNOLOGY LETTERS 89:(1) pp. 25-30. (2003)

BECK Z, BÁCSI A, LIU X, EBBESEN P, ANDIRKÓ I, CSOMA E, **KÓNYA J**, NAGY E, TÓTH FD
 Differential patterns of Human Cytomeglaovirus gene expression in Various T-cell lines carrying human T-cell leukemia-lymphoma virus Type I: role of Tax-activated cellular transcription factors
 JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 71: pp. 94-104. (2003)

Nagy E, Beck Z, Kiss A, Csoma E, Telek B, **Kónya J**, Olah E, Rak K, Toth FD
 Frequent methylation of p16(INK4A) and p14(ARF) genes implicated in the evolution of chronic myeloid leukaemia from its chronic to accelerated phase
 EUROPEAN JOURNAL OF CANCER 39:(16) pp. 2298-2305. (2003)

SZLÁDEK GY, JUHÁSZ A, ASZTALOS L, SZŐKE K, MURVAI M, SZARKA K, VERESS GY, GERGELY L, **KÓNYA J**
 Persisting TT virus (TTV) genogroup 1 variants in renal transplant recipients
 ARCHIVES OF VIROLOGY 148: pp. 841-851. (2003)

Murvai M, Borbély AA, **Kónya J**, Gergely L, Veress G
 Effect of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes on the activity of the transforming growth factor-beta (TGF-beta 2) promoter
 ARCHIVES OF VIROLOGY 149:(12) pp. 2379-2392. (2004)

Karosi T, **Kónya J**, Petko M, Szabo LZ, Pytel J, Jori J, Sziklai I
 Two subgroups of Stapes fixation: Otosclerosis and pseudo-otosclerosis
 LARYNGOSCOPE 115:(11) pp. 1968-1973. (2005)

Szladek G, Juhasz A, Kardos G, Szoke K, Major T, Sziklai I, Tar I, Marton I, **Kónya J**, Gergely L, Szarka K
 High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma
 JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY 58:(4) pp. 402-405. (2005)

Borbély AA, Murvai M, **Kónya J**, Beck Z, Gergely L, Li F, Veress G
 Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression
 JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 87:(Part 2) pp. 287-294. (2006)

Csoma E, Deli T, **Kónya J**, Csernoch L, Beck Z, Gergely L
 Human herpesvirus 6A decreases the susceptibility of macrophages to R5 variants of human immunodeficiency virus 1: Possible role of RANTES and IL-8
 VIRUS RESEARCH 121:(2) pp. 161-168. (2006)

Karosi T, Jokay I, **Kónya J**, Petko M, Szabo LZ, Pytel J, Jori J, Sziklai I
 Activated osteoclasts with CD51/61 expression in otosclerosis
 LARYNGOSCOPE 116:(8) pp. 1478-1484. (2006)

- Karosi T, **Kónya J**, Petko M, Szabo LZ, Pytel J, Jori J, Sziklai I
Antimeasles immunoglobulin G for serologic diagnosis of otosclerotic hearing loss
LARYNGOSCOPE 116:(3) pp. 488-493. (2006)
- Karosi T, Jokay I, **Kónya J**, Szabo LZ, Pytel J, Jori J, Szalmas A, Sziklai I
Detection of osteoprotegerin and TNF-alpha mRNA in ankylotic stapes footplates in connection with measles virus positivity
LARYNGOSCOPE 116:(8) pp. 1427-1433. (2006)
- Borbély AA, Murvai M, Szarka K, **Kónya J**, Gergely L, Hernádi Z, Veress G
Survivin promoter polymorphism and cervical carcinogenesis
JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY 60:(3) pp. 303-306. (2007)
- Karosi T, Jokay I, **Kónya J**, Petko M, Szabo LZ, Sziklai I
Expression of measles virus receptors in otosclerotic, non-otosclerotic and in normal stapes footplates
EUROPEAN ARCHIVES OF OTO-RHINO-LARYNGOLOGY 264:(6) pp. 607-613. (2007)
- Karosi T, Szalmas A, Csomor P, **Kónya J**, Petko M, Sziklai I
Disease-Associated Novel CD46 Splicing Variants and Pathologic Bone Remodeling in Otosclerosis
LARYNGOSCOPE 118:(9) pp. 1669-1676. (2008)
- Sapy T, Poka R, Szarka K, **Kónya J**, Huga S, Hernadi Z
Age-specific prevalence of high-risk human papillomavirus infection in a Hungarian female population with positive cytology
EUROPEAN JOURNAL OF OBSTETRICS GYNECOLOGY AND REPRODUCTIVE BIOLOGY 138:(2) pp. 194-198. (2008)
- László B, Nyúl Z, Kisfali P, Deák J, Kovács J, **Kónya J**, Mészner Z, Molnár P, Pátri L, Schneider F, Tóth A, Melegh B, Iturriza-Gomara M, Gray J, Martella V, Szucs G, Bányai K
First detection of P[6],G9 rotaviruses in Hungary - An imported strain from India?
JOURNAL OF TRAVEL MEDICINE 16:(2) pp. 141-143. (2009)
- Szabó J, Dombrádi Zs, Dobay O, Orosi P, **Kónya J**, Nagy K, Rozgonyi F
Phenotypic and genetic characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from the university hospitals of Debrecen
EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY & INFECTIOUS DISEASES 28:(2) pp. 129-136. (2009)
- Csomor P, Szalmas A, **Kónya J**, Sziklai I, Karosi T
Restriction analysis of otosclerosis-associated CD46 splicing variants
EUROPEAN ARCHIVES OF OTO-RHINO-LARYNGOLOGY 267:(2) pp. 219-226. (2010)
- Szalmas A, **Kónya J**, Sziklai I, Karosi T
Detection and identification of CD46 splicing isoforms by nested RT-PCR
METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY 630: pp. 83-95. (2010)
- Csoma E, Mészáros B, Asztalos L, **Kónya J**, Gergely L
Prevalence of WU and KI polyomaviruses in plasma, urine, and respiratory samples from renal transplant patients

JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 83:(7) pp. 1275-1278. (2011)

Csoma E, Mészáros B, Gáll T, Asztalos L, **Kónya J**, Gergely L
Dominance of variant A in Human Herpesvirus 6 viraemia after renal transplantation
VIROLOGY JOURNAL 8: Paper 403. 5 p. (2011)

Karosi T, Csomor P, Szalmas A, **Kónya J**, Petko M, Sziklai I
Osteoprotegerin expression and sensitivity in otosclerosis with different histological activity
EUROPEAN ARCHIVES OF OTO-RHINO-LARYNGOLOGY 268:(3) pp. 357-365. (2011)

Otvos R, Skribek H, Kis LL, Gloghini A, Markasz L, Flaberg E, Eksborg S, **Kónya J**,
Gergely L, Carbone A, Szekely L
Drug sensitivity patterns of HHV8 carrying body cavity lymphoma cell lines
BMC CANCER 11: Paper 441. 11 p. (2011)

Gyöngyösi E, Szalmás A, Ferenczi A, **Kónya J**, Gergely L, Veress G
Effects of human papillomavirus (HPV) type 16 oncoproteins on the expression of involucrin
in human keratinocytes
VIROLOGY JOURNAL 9: Paper 36. 12 p. (2012)

László B, **Kónya J**, Dandár E, Deák J, Farkas Á, Gray J, Grósz G, Iturriza-Gomara M, Jakab
F, Juhász Á, Kisfali P, Kovács J, Lengyel Gy, Martella V, Melegh B, Mészáros J, Molnár P,
Nyúl Z, Papp H, Pátri L, Puskás E, Sántha I, Schneider F, Szomor K, Tóth A, Tóth E, Szűcs
Gy, Bányai K
Surveillance of human rotaviruses in 2007-2011, Hungary: exploring the genetic relatedness
between vaccine and field strains
JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY 55:(2) pp. 140-146. (2012)

Ferenczi A, Gyongyosi E, Szalmas A, Hernadi Z, Toth Z, **Kónya J**, Veress G
Sequence variation of human papillomavirus Type 31 long control region: Phylogenetic and
functional implications
JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 85:(5) pp. 852-859. (2013)

Kovacs R, Czudar A, Horvath L, Szakacs L, Majoros L, **Kónya J**
Serum interleukin-6 levels in murine models of *Candida albicans* infection.
ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 61:(1) pp. 61-69. (2014)

Otvos R, Juhasz A, Szalai E, Ujvari D, Otvos K, Szabo K, Remenyik E, Szekely L, Gergely
L, **Kónya J**
Molecular typing of human herpesvirus 8 isolates from patients with Kaposi's sarcoma in
Hungary.
ANTICANCER RESEARCH 34:(2) pp. 893-898. (2014)

Paholcsek Melinda, Fidler Gabor, **Kónya Jozsef**, Rejto Laszlo, Mehes Gabor, Bukta Evelin,
Loeffler Juergen, Biro Sandor
Combining standard clinical methods with PCR showed improved diagnosis of invasive
pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies and prolonged
neutropenia
BMC INFECTIOUS DISEASES 15: Paper 251. 10 p. (2015)

Gyongyosi E, Szalmas A, Ferenczi A, Poliska S, **Kónya J**, Veress G
 Transcriptional regulation of genes involved in keratinocyte differentiation by human papillomavirus 16 oncoproteins.
ARCHIVES OF VIROLOGY 160:(2) pp. 389-398. (2015)

Tudományos és oktatási munkásság összefoglalása

Tudományos és oktatási közlemények	Szama		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk²	80	---	---	---
szakcikk, összefoglaló nemzetközi folyóiratban	---	60	735	906
szakcikk, összefoglaló, hazai idegen nyelvű	---	3	7	7
szakcikk, összefoglaló, magyar nyelvű	---	16	12	16
rövid közlemény	---	1	2	4
II. Könyv	1	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, tankönyv szerkesztőként	1	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
Felsőoktatási tankönyv	---	1	---	---
III. Könyvrészlet	11	---	---	---
idegen nyelvű	---	1	5	6
magyar nyelvű	---	2	0	0
Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	8	0	0
IV. Konferenciaközlemény³	0	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.-III.)		9	0	0
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)⁴	92	---	761	939
Összesített impakt faktor⁴	147,2	---	---	---
Idézetség száma^{1,4}	---	---	761	939
Hirsch index¹	17	---	---	---

¹ disszertáció és egyéb típusú idézők nélkül, ² lektorált, tudományos folyóiratban, ³ konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben, ⁴ a sokszerzős és/vagy csoportos szerzőségű közlemények adatai nélkül