

Új vírusok azonosítása és vizsgálata tumoros eredetű bőrelváltozásokban

Doktori (Ph.D.) értekezés téziszfüzet

dr. Horváth-Szógyi Katalin Barbara

Témavezető: Prof. Dr. Reuter Gábor^{1,2}

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Reglódi Dóra

Programvezető: Dr. Kerényi Mónika



¹Baranya Megyei Kormányhivatal, Népegészségügyi Szakigazgatási Szerve, Regionális Virologiai Laboratórium, Gastroenterális Vírusok Nemzeti Referencia Laboratóriuma

²Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

Pécs, 2022

BEVEZETÉS

A rosszindulatú daganatok kialakulásáért különböző endogén és exogén tényezők tehetők felelőssé. Az exogén tényezők között a karcinogén kémiai anyagok és a fizikai sugárzás mellett jelentős szerep jut a daganatkeltő mikroorganizmusoknak, elsősorban a vírusoknak. Emberben átfogó tanulmányok igazolják, hogy minden hatodik daganat háttérében bizonyítható fertőző ágens kóroki szerepe világszerte. Noha ez a gyakoriság csak egy átlag, és valószínűleg alulbecsült is, jelentős földrajzi különbségeket is láthatunk. Különösen a fejlődő országokat érintik súlyosabb mértékben a fertőző eredetű daganatos megbetegedések, ahol akár minden második daganatos megbetegedésben is szerepet játszhatnak és egyben a fiatalabb népet is érintik.

A ma ismert emberi daganatot okozó ún. onkogén vírusok között DNS és RNS genomú vírusok egyaránt megtalálhatóak. Az emberi onkogén DNS vírusok közé tartoznak az Epstein-Barr vírus (EBV, *Herpesviridae* család), a Kaposi-szarkómához asszociált herpeszvírus (KSHV, *Herpesviridae* család), a humán papillomavírus (HPV, *Papillomaviridae* család), a hepatitis B vírus (HBV, *Hepadnaviridae* család) és a Merkel-sejtes polyomavírus (*Polyomaviridae* család). Az emberi onkogén RNS genomú vírusok közé a hepatitis C vírus (HCV, *Flaviviridae* család), valamint a humán T-sejtes lymphotróp vírus 1 (HTLV-1, *Retroviridae* család) tartozik.

A Merkel-sejtes karcinóma és polyomavírus

A Merkel-sejtes karcinóma (MCC) ritka, agresszív, a hám stratum basale rétegéből kiinduló daganat, amelynek első leírója Toker volt 1972-ben. A Merkel-sejtek eredete a mai napig vitatott, hogy vajon epidermális keratinocita-szerű sejtekből vagy idegrendszeri eredetű migrált őssejtekből vagy pre/pro B-sejtekből származnak. A daganat elsősorban az időseket és az immunszuppresszált személyeket érinti. Az MCC gyorsan növő, szoliter, fájdalomtalan, általában pirosas-rózsaszínű, de lehet akár kékes-lilás vagy bőrszínű tumor, mely leggyakrabban a napsugárzásnak erősen kitett bőrfelületeken, különösen a fej-nyaki régióban jelenik meg. Mivel a klinikai megjelenés bár hordoz jellegzetességeket, könnyen összetéveszthető klinikai vizsgálat során más benignus, semimalignus, illetve malignus elváltozásokkal (például bazalióma, spinalióma, pyogén granulóma, keratoakantóma, amelanotikus melanóma, benignus ciszta, bőrlimfóma és egyéb metasztatikus neoplázia).

Az MCC-kből Feng és munkatársainak 2008-ban egy DNS tumorvírust, a Merkel-sejtes polyomavírust (MC) sikerült azonosítani, amely megnyitotta az utat a daganat valódi kóroki hátterének feltárásához. Tíz MCC mintából digitális transzkriptom szubtraktációs módszerrel 8 esetben azonosították a vírust. Nyolcból hat esetben sikerült igazolni, hogy a virális DNS integrálódott a tumorsejtek genomjába is. Az elváltozás immár valószínű fertőző - virális - kóreredete szemléletváltást eredményez az etiológia mellett, a patogenezis, a diagnosztika és reményeink szerint a jövőben a kezelés területén is. A prognózis jelentőségének súlyát növeli az, hogy az MCC letalitása több mint 3-szor nagyobb (46%), mint a melanómának (12%) az összes diagnózisra vetítve. Ezt követően a világ minden táján megindult kutatások - az alkalmazott módszertanok különbözősége ellenére is - azt mutatják, hogy az MC polyomavírus az MCC-k 71-94%-ban kimutatható. Az MCC növekvő incidenciája figyelhető meg, amely az idősök és az immunszuppresszált betegek növekvő számával, a napsugárzás növekvő expozíciójával (napozás) és részben a javuló diagnosztikus lehetőségekkel magyarázható. Mivel már kisméretű daganatként adhat áttétet, ezért különös jelentősége van a gyors felismerésének és egyéb bőrdaganatoktól (pl. pyogén granulóma, bazalióma) való elkülönítésnek, valamint a szakszerű kezelésnek.

Az MCC diagnózisa nagyon ritkán történik a klinikai kép alapján. Rendszerint mikroszkópos vizsgálattal erősödik a gyanú az MCC-re és immunhisztokémiai vizsgálatokkal lehet megalapozott diagnózist felállítani. Más neuroendokrin daganatokhoz hasonlóan gyakran megfigyelhetők kicsi, kerek vagy ovális sejtek hiperkromatikus sejtmagokkal. A daganatban számos mitotikus alak és apoptotikus test is látható. Három szövettani típust lehet megkülönböztetni, amelyek részben egymás mellett, egyazon tumorban is előfordulhatnak: a ritka trabekuláris, a kissejtes és a gyakori intermedier típust. Más kissejtes daganatoktól való elkülönítésben immunhisztokémiai vizsgálatok nyújtanak segítséget. Neuronspecifikus enolázal, synaptophysinnel, chromogranin A-val és citokeratin 20-szal (jellegzetes pontszerű mintázatban) pozitivitást és S100-al, a TTF-1-el és a CK-7-el pedig negativitást mutat.

Ugyan az MC polyomavírus jelenléte és a genomjának integrációja az MCC sejtek kromozómájában igazolni látszik szerepét a daganat kialakulásában, ennek pontos patomechanizmusa még sok kérdést vet fel és további vizsgálatokat igényel. Feltehetőleg összetett, több lépcsős, a gazdaszervezettől is függő folyamatról lehet szó, hiszen a vírus kimutatható MCC-s vagy egyéb bőrdaganatban szenvedő betegekben az egészségesnek tűnő bőrterületekről, de a szájüreg- és a légzőhámából is. Továbbá, az MCV - más polyomavírusokhoz hasonlóan - az egészséges populációban is

megtalálható. Ugyanakkor, az MCC-k együttdében nem mutatható ki az MC polyomavírus, amely esetek talán önálló kliniko-patológiai entitást jelenthetnek, amelyek szövettani képükben hasonlóak, de lefolyásukban elkülöníthetőek a vírust hordozó változattól. Az MCC kialakulásának fontos kezdő lépése lehet a virális DNS klonális integrációja, amely véletlenszerűen (random módon) számos helyen történhet a sejtek genetikai állományában.

A legfontosabb szerep a daganatképződésben azonban a virális LT-fehérje tumorbeli kifejeződés mértékének és módjának van. Ez az onkoprotein ugyanis konzervált szakaszokat hordoz (például a DnaJ, „pocket” fehérje-kötő LXCXE és pp2A-kötő domének), amelyek onkogén hatása egyéb polyomavírusokban (pl.: SV40) már bizonyított. Az UV-sugárzás segítheti elő a virális genom integrációját, és az LT-régiót csonkoló mutációt, amelyek együttesen megszüntetik a vírus replikációját. A daganatos sejtekben a vírus replikációra jellemző LT-fehérje helikáz aktivitása eltűnik (a „vírus” ilyenkor már nem fertőző), ugyanakkor a károsodott LT-fehérje a tumor kialakulása felé tereli a folyamatokat. Az LT-fehérje többek között a sejtek tumorszupresszor fehérjéire hatva gátolja azok funkcióját, e mellett a celluláris survivin (= baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5: BIRC5a) onkoprotein is megjelenik és expressziója a többszörösére emelkedik a sejtekben. Ennek az apoptózist gátló fehérjének a megjelenése a daganat fenntartásában játszik szerepet, a magi lokalizációja pedig rossz prognózissal társul.

Mivel az MCC más malignus, illetve semimalignus bőrdaganatokkal együtt is kialakulhat, mint például Bowen-kór, bazalióma, leggyakrabban laphámrák, ezért ezek jellegzetességei is színezhetik a szövettani képet. A laphámrák többnyire aktinikus keratózist vagy Bowen-kórt fedő elrendezésben tűnik fel, elhatárolódva a dermális MCC komponensstől. Átmenet a két sejtípus között általában nem látható. Feltételezhetően e társ-malignitás patomechanizmusa eltér a többi Merkel-sejtes karcinómáétól.

A daganat ritka előfordulása miatt jelenleg nincs standardizált, egységes kezelési protokoll az MCC kezelésére. Ez különösen a lokálisan előrehaladott esetekben jelent problémát. E daganatnak a növekvő előfordulása miatt azonban elengedhetetlen kérdés a kezelés korszerűsítése. A sebészeti kimetszés és a sugárterápia továbbra is a terápia fontos alappilléret képezi a kezdeti stádiumban.

Az MCC kezelése bőrtumor centrumokban, tapasztalt multidiszciplináris szemléletet követve javasolt. A jelenleg ajánlott eljárás primer tumor esetén, amennyiben a távoli metasztázis gyanúja nem merül fel, a teljes sebészi kimetszés, 1-2

cm-es sebési szélességgel, mélyen az izombőnyűig. Fontos prognosztikai jelentősége miatt javasolt az őrszemnyirokcsomó eltávolítása, amennyiben sem klinikailag, sem képalkotó eljárásokkal nem merül fel nyirokcsomóáttét. Amennyiben az őrszemnyirokcsomó érintett, terápiás limfadenektómia javasolt. Már 2 cm-nél kisebb átmérőjű primer tumor esetében is 66-75%-ra csökken az 5 éves túlélés. Amennyiben a primer tumor nagyobb, mint 2 cm 50-60% az ötéves túlélési ráta, nyirokcsomóáttétek jelenléte esetében pedig 42-52%. Távoli áttéttel rendelkező betegeknél 17-18%. 2016 előtt, az immunterápia bevezetését megelőzően a távoli áttéttel rendelkező betegek kemoterápiás kezelése a kissejtes bronchiális karcinóma terápiás protokollja szerint történtek. 2017-ben az avelumab (anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1)) bevezetése nagy áttörést jelentett az áttétes MCC-ben szenvedő betegek kezelésében, hiszen a betegek egy jelentős részében tartós remisszió érhető el.

Retrovírusok és szerepük az onkogenezisben

A *Retroviridae* család tagjai fontos jelentőséggel bíró emberi és állati patogének. A *Retroviridae* víruscsaládba tartozó retrovírusok kísérletes tumort indukáló képessége már a 20. század fordulója óta ismert. Már 1908-ban Ellerman és Bang bizonyította, hogy sejtmentes szűrlettel a csirke leukémia egyik egyedről a másikra átvihető. 1911-ben pedig ugyanezt sikerült bebizonyítani a csirke szarkóma esetén, amely Peyton Rous nevéhez fűződik. Rous retrovírusokkal kapcsolatos felfedezései megalapozták a későbbi onkogén retrovírus kutatások alapjait. Számos onkogén vírus került leírásra különböző állatokból, így macskákból, tehenekből, patkányokból, egerekből, juhokból, kecskékből, főemlősökből, de még néhány halfajból is. Bittner és Gross felfedezései rámutattak arra is, hogy a retrovírusok összefüggésbe hozhatóak egerekben epiteliális eredetű emlőtumorról és tímusz limfómával. A korábban Bittner vírusnak nevezett egér emlődaganat vírus (mouse mammary tumorvirus: MMTV) az emlődaganat kialakulásának egyik fő etiológiai tényezője a vadon élő és a kísérleti egerekben is. Az MMTV egyben a *Retroviridae* víruscsalád, *Betaretrovirus* nemzetség prototípusa is. Számos MMTV DNS-kópia található meg a leggyakrabban használt laboratóriumi egerek kromoszómális DNS-ében integrált formában, endogén provírusként. Az egerekben emlőrákot okozó retrovírus azonosítása nagy érdeklődést váltott ki, hogy vajon vannak-e hasonló vírusok más fajokban, különös tekintettel az emberben.

Számos tanulmány kimutatta, hogy az emberi mellrákos sejtek és szövetek olyan fehérjéket tartalmaznak, amelyek keresztreakcióba lépnek az MMTV elleni antiszérummal. Ezek a vizsgálatok azt is kimutatták, hogy bétaretrovírusok vannak jelen emlődaganatos betegek anyatejében. Az MMTV-vel 90–98%-ban homológ humán emlőtumor vírust (HMTV) az emlődaganatok 40%-ánál mutatták ki amerikai nőknél PCR vizsgálattal.

A humán genomban található endogén retrovirális elemek a genom 8%-át teszik ki. A mai exogén retrovírusok, valamint a genomban kódolt endogén retrovírusok (ERV) fertőző elődei bizonyítottan onkogén potenciállal is rendelkeznek. Az emberi rosszindulatú daganatos megbetegedésekre a humán ERV transzkripció aktiválása jellemző. Ezek a megfigyelések arra engednek következtetni, hogy az emberi daganatok fontos kóroki tényezői lehetnek a humán endogén retrovírusok.

A hörcsögök népszerű háziállatok. A leggyakrabban tartott fajok a szíriai (*Mesocricetus auratus*) és a dzsungáriai (*Phodopus sungarus*) hörcsögök. A házi hörcsögök spontán előforduló daganatairól ez idáig nagyon kevés közlemény született és a legtöbbjük is csak néhány egyedi esetről számol be. A hörcsögök retrovírusaival kapcsolatban csak korlátozott és régi (1960-1970 közötti) ismeretek állnak rendelkezésre.

CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásunk célja volt virális genomiális szekvenciák keresése egy-egy bőrre lokalizálódó humán és állati daganattípusban különböző molekuláris virológiai (PCR, gélelektroforézis, szekvenálás, virális szekvencia azonosítása metagenomikai, *in situ* hibridizáció) és patológiai (minta fixálása, festése, metszetkészítés, immunhisztokémia) módszerek segítségével. A vizsgálataink két részre bonthatóak: az MC polyomavírus vizsgálatára MCC daganatokból emberben, illetve egy új endogén retrovírus kimutatására hörcsög bőrdaganatból.

I. Az MC polyomavírus vizsgálata MCC daganatokban

- Cél volt a 2008-ban felfedezett Merkel-sejtes polyomavírus (MC) keresése és molekuláris biológiai kimutatása dél-dunántúli betegek 2007 és 2012 között archivált szövettanilag MCC-nek diagnosztizált mintáiból.

- Cél volt az MC polyomavírus jelenléte (vagy hiánya) és az esetek klinikopatológiai jellemzői közötti összefüggések feltárása, elemzése.
- Cél volt a kimutatott MC polyomavírus vírusgenom meghatározása és tanulmányozása.
- Cél volt további, új polyomavírusok (HPyV6, HPyV7, TSV, HPyV9) keresése ugyanezen betegek bőrszövetmintáiban.

II. Új endogén retrovírus kimutatása hörcsög bőrdaganatából

- Cél volt egy ismeretlen etiológiájú hörcsög bőrdaganat virális metagenomikai vizsgálata.
- Cél volt a virális metagenomikai eredmények és a potenciális virális szekvenciák elemzése.
- Cél volt a mintából azonosított retrovírus teljes genomjának meghatározása molekuláris biológiai módszerekkel, a vírusgenom elemzése és filogenetikai összehasonlítása már ismert rokon retrovírus referencia szekvenciákkal.
- Cél volt a retrovírus genom (DNS és RNS) jelenlétének vizsgálata *in situ* hibridizációs módszer segítségével a daganatos szövetmintában.
- Cél volt az új retrovirális genomszekvencia keresése kvalitatív és kvantitatív PCR-módszerek segítségével további hörcsög egyedek különböző mintáiból.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

I. Merkel-sejtes karcinóma és Merkel-sejtes polyomavírus

Vizsgálati anyagok

Vizsgálataink során a Pécsi Tudományegyetem (PTE), Pathológiai Intézetében 2007-2012 között szövettani módszerekkel diagnosztizált MCC-ben szenvedőbetegek archivált szövetmintáit vizsgáltuk, retrospektívan. A szövettani diagnózis a hematoxilín-eozinnal festett metszet morfológiáján és immunfenotípusán alapult, monoklonális antitestek (CK20, CD56, Synaptophysin, ChromograninA és TTF1) felhasználásával. A metszeteket szövettanilag újra elemeztük. Nem csak a primer MCC-t, hanem ezek bőr- és nyirokcsomóáttéteit, valamint ezek szomszédságában előforduló bazalióma és

laphámrák mintákat is tanulmányoztunk. A nem megfelelő DNS minőségű mintákat nem vontuk be a tanulmányba.

Epidemiológiai és klinikai adatok

A Pécsi Tudományegyetem Klinikai központjának etikai engedélyével (iktatószám: KK/718-1/2020) a betegek epidemiológiai és klinikai adatai, valamint a patológiai leletek kigyűjtése és újraértékelése az eMedSolution (MedSol) medikai rendszer segítségével történt. Külön figyelmet fordítottam az anamnézis elemzése során a kórelőzmények, a társbetegségek, az esetleges immunszuppressziót okozó tényezők, az MCC megjelenési helyének, a tünetek jelentkezése és a diagnózis között eltelt időnek az összegyűjtésére. A klinikopatológiai jellemzőket (életkor, szövettani kép és lymphovascularis invázió, társbetegségek) összehasonlítottam az MC-pozitív és MC-negatív esetekben.

A paraffinba ágyazott szövetminták deparaffinálása

Lehetőség szerint nekrozismentes, tiszta tumor szövetet tartalmazó paraffinos blokkból készített 5-6 db 10-20 µm vastag metszeteket xylene és etil-alkohol segítségével deparaffináltam.

DNS-izolálás és PCR

A vírus DNS-t natív (N=6) és deparaffinált (N=9) szövetmintákból izoláltam a BK polyomavirusreal-time PCR-kithez (BKV Real-time PCR-kit, Shanghai Biotech, Shanghai, Kína) mellékelt extrakciós pufferrel a gyártó ajánlása szerint. Az MC polyomavirus kimutatása az MC polyomavirus nagy T-fehérje régiójára tervezett primer-párral történt, PCR-módszerrel. Egy nyirokcsomóáttét natív mintájából az MC polyomavirus teljes genomját meghatároztuk „primer-walking” módszerrel. Az újonnan felfedezett polyomavirus 6, 7, 9 és trichodysplasia spinulosa-asszociált polyomavirusok az MCC mintákból nem voltak PCR módszerrel kimutathatók.

Agaróz gélelektroforézis, szekvenálás és filogenetikai analízis

A PCR-termékeket 1.5%-os, Tris-Borát-EDTA puffert és etídium-bromidot tartalmazó agaróz gélben választottam el. A teljes genom meghatározáshoz a tisztított PCR-termékeket direkt módon, a laboratóriumunk automata kapilláris DNS szekvenátorával, a gyártó előírásai szerint szekvenáltam BigDye Terminator Kit segítségével. A filogenetikai elemzéshez GenBank adatbázist, ClustalX, GeneDoc és MEGA szoftvereket használtunk.

II. Fekete szíriai hörcsög bőrtumor vizsgálata és a BSHRV

Vizsgálati anyagok

A fekete szíriai hím hörcsögöt (*Mesocricetus auratus*) 2013 januárjában néhány napos korában vásárolták, majd ezt követően háziállatként tartották Pécsen, amelynek arca és a nyaka területén tumoros bőrelváltozásra lettek figyelmesek a gondozói a vásárlást követő három hónappal később. Az első elváltozás megjelenését követően 3 hét leforgása alatt 25 mm átmérőjűre nőtt és bőráttnak imponáló elváltozás jelent meg az állat mellkasán is. A kedvezőtlen prognózis miatt az állatorvos eutanáziát végzett el. A hörcsög összesen 6 hónapig élt. Az ismeretlen eredetű tumoros bőrelváltozásából származó mintát, valamint ugyanezen állat nem tumoros natív szövetmintáit (bőr, farok, máj és tüdő) vizsgáltunk molekuláris, kórszövettani, valamint immunpatológiai módszerekkel.

A kontroll vizsgálatokhoz mintákat gyűjtöttünk noninvazív módon további fekete szíriai hörcsög egyedektől. Ennek érdekében 2018 májusában és júniusában három különböző pécsi állattulajdonostól (orvostanhallgatók) további három, a mintavétel időpontjában klinikailag egészséges, háziállatként tartott, 12-21 hónapos fekete szíriai hörcsögtől (N=2 nőstény és N=1 hím) gyűjtöttünk friss székletmintákat. Az egyik nőstényállatnál 1,5 éves korában először a hasán, majd a mellkasán tumoros bőrelváltozások (szövettanilag igazolt, többszörös fibrómák) jelentek meg. Az állat elpusztulását (2018. november 22.) követően *post mortem* bőr (fibróma), tüdő és máj szövetmintákból kerestük a retrovírus jelenlétét (RT/) nested-PCR és valós-idejű PCR módszerekkel.

Virális metagenomika

Az arc területéről vett, natív bőrtumor szövetmintát virális metagenomikai és új generációs szekvenáló módszerekkel vizsgáltuk random nukleinsav amplifikáció segítségével a virális partikulák bekoncentrálását követően.

A teljes virális genom meghatározása

A friss daganatmintát, valamint a farokból, a bőrből, a májból és a tüdőből származó daganatmentes szöveti mintákat külön-külön homogenizáltuk a keresztkontamináció elkerülése érdekében. Az RNS-t és a DNS-t külön extraháltuk frissen homogenizált szövet- és bélsár mintákból.

A fekete szíriai hörcsögből azonosított retrovirális szekvencia teljes genomját (BSHRV/2013/HUN, GenBank azonosító: MK304634) „primer-walking” technikával határoztuk meg a tumorszövetből kinyert DNS-ből PCR-módszerrel. A szekvencia-specifikus oligonukleotid primereket a virális metagenomika segítségével meghatározott retrovirális read-ek és contig-ok felhasználásával terveztük. A genom két végét, valamint a provírus szomszédos kromoszómális régióit Thermal Asymmetric Interlaced PCR-(TAIL-PCR) módszerrel vizsgáltuk. A TAIL-PCR-módszerrel és a virális metagenomika segítségével meghatározott szekvenciát konvencionális PCR-el és „long range” PCR módszerekkel ellenőriztük.

A PCR-termékeket direkt módon szekvenáltuk (Sanger módszer) specifikus primerekkel, majd automata szekvenátoron futtattuk.

Szekvencia- és filogenetikai elemzés

Az azonosított retrovirális szekvenciát és a GenBankban található más retrovírusok szekvenciáival ClustalX program segítségével illesztettük és GeneDoc programmal értékeltük. A filogenetikai vizsgálatok a *pol* és az *env* gén régiók által kódolt fehérjék aminosav szekvenciái alapján készültek MEGA 6 programmal. A filogenetikai ágrajz megrajzolásához neighbor-joining modelleket alkalmaztunk 1000-szeres ismétlés (bootstrap) mellett.

Szövettan

A kórszövetteni vizsgálatra szánt mintákat 10%-os formalinnal fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk. Ezt követően mikrotómmal 5 µm vastag szeleteket készítettünk, amelyeket hematoxilinnel és eozinnal megfestettünk.

***In situ* hibridizáció**

Két, Digoxigenin-11-UTP-vel jelölt, egyenként 191 nt hosszú szensz és 193 nt hosszú antiszensz RNS próbát állítottunk elő TranscriptAid T7 High Yield Transcription kit segítségével. A szensz próba a vírus dUTP régiójához, az antiszensz a retrovírus burokkészítmény kódoló régiójára lett tervezve. PCR-reakciónként az egyik primer 5' vége egy T7 RNS polimeráz promóterszekvenciát tartalmazott. Az így kapott PCR-termékeket horizontális gélelektroforézis után az agaróz gélből kivágtuk, majd szilikaoszlopos módszerre tisztítottuk. A tisztított, T7-promótert tartalmazó PCR-termékekről TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit segítségével *in vitro* Digoxigenin-tartalmú RNS-t szintetizáltunk. Az előállított DIG-jelölt RNS próbákat tisztítottuk. Az RNS extraktumok integritásának, hosszának és hozamának értékeléséhez a tisztított mintákat 1%-os agaróz gélben futtattuk etídium-bromiddal. Az előállított DIG-jelölt specifikus szensz és antiszensz RNS-próbákat retrovirális DNS és/vagy RNS kimutatására használtuk a formalinnal fixált paraffinba ágyazott szövetmintákon *in situ* hibridizációs módszer alkalmazásával.

Az integrált BSHRV bétaretrovírus genom kópiaszámának meghatározása qPCR-módszerrel

Az integrált vírus kópiaszám abszolút számszerűsítéséhez daganat, farok, máj és tüdő szövetmintákat használtunk SYBR Green alapú qPCR-módszert alkalmazva.

EREDMÉNYEK

I. Merkel-sejtes karcinóma és Merkel-sejtes polyomavírus

A Pécsi Tudományegyetem (PTE), Pathologiai Intézetében 2007-2012 között összesen 11 beteg esetében diagnosztizáltak MCC-t szövettani módszerekkel. Három beteget és a hozzájuk tartozó paraffinba ágyazott három szövettani mintát a rossz fixáltságuk miatt kizártuk a további vizsgálatokból és elemzésekből.

A 8 betegből 2 betegnek 3-3 mintája, 3 betegnek 2-2 mintája, míg 3 betegnek 1-1 különböző helyről vett szövettani mintáját vizsgáltuk. A 8 beteg közül három (37,5%) beteg primer tumorából (2 minta), bőr (1 minta) és nyirokcsomóáttéteiből (2 minta) sikerült MC polyomavírust PCR-módszerrel kimutatni. Egy beteg esetén a primer bőrtumorban, a nyirokcsomóáttétben és a bőrmetasztázisban is jelen volt a vírus. A további négy, újonnan felfedezett polyomavírus (HPyV6, HPyV7, TSV, HPyV9) jelenlétét a 15 minta egyikéből sem sikerült kimutatnunk PCR-módszerrel.

Klinikailag egyik esetünkben sem merült fel az MCC gyanúja a kórszövettani vizsgálatot megelőzően. Téves vagy nem teljes iránydiagnózisként pyogén granulóma, keratoakantóma, bazalióma és laphámrák szerepeltek. A 8 beteg közül 6 (75%) férfit és 2 (25%) nőt találunk, az MC polyomavírus PCR-pozitív betegeknél ez az arány 66% nő és 33% férfi. Évek szerint a szövettani diagnózis 1-1 esetben 2007-ben, 2008-ban és 2012-ben, 2 esetben 2010-ben és 3 esetben 2011-ben történt. A legfiatalabb beteg 55 éves, a legidősebb 86 éves, a betegek átlag életkora 73,8 év volt (az MC polyomavírus PCR-pozitív betegeknél az átlagéletkor 64,3 év volt). A daganat lokalizációját tekintve nem találtunk különbséget az MC-pozitív és MC-negatív eseteink között. Egy, a legfiatalabb beteg kivételével (akinél a lábszárán jelentkezett az MC-pozitív primer daganat), mindegyik esetben a tumor a fej-nyaki régióban (arc, homlok, orrszárny, nyak) helyezkedett el. Mindegyik betegnél találtunk az MCC-re hajlamosító tényezőket, mint az immunuszpresszió (például: tartós orális szteroid kezelés, krónikus limfoid leukémia, krónikus obstruktív tüdőbetegség) és/vagy az idős kor.

A szövettani mintázatban morfológiai különbségeket találtunk a két csoport között. Míg az MC polyomavírus pozitív esetekben sokkal rendezettebb összbenyomást mutatott a hematoxin-eozin festésű szövettani kép, kerek vagy ovális alakú sejtekkel, vezikuláris magokkal és egységes citoplazmával találoztunk, addig az MC polyomavírus negatív esetekben sokkal irregulárisabb összbenyomást mutatott a kép, változatos, polygonális magvú daganatsejtekkel, eltérő citoplazmával.

Ezenkívül a primer daganat limfovaskuláris inváziójának jelenléte között is különbségeket találtunk. Míg a vírussal nem társuló esetekben már a primer daganat megjelenésekor megfigyelhető volt a daganat széli részein a sejtek ér- és nyirokképletekbe való betörése, addig az MC pozitív esetek egyikében sem volt ez megfigyelhető.

Egy 70 éves nőbeteg nyirokcsomóáttétének natív szövetmintájából meghatároztuk az MC polyomavírus teljes, 5392 nukleotid hosszúságú genomját (GenBank: KC202810). A polyomavírus 10 nukleotidban (0,19%) tér el a prototípus MC polyomavírusról (EU375803). Megtaláltuk a virális onkogenezisben kiemelt szereppel bíró, a sejt kóros proliferációját előidéző, a vírus replikációját felfüggesztő stop kodont eredményező, csonkoló pontmutációt (citozinból→timin) a vírusgenom nagy T (LT)-fehérjét kódoló részében, az 1461. nukleotid pozícióban.

Az MC polyomavírus filogenetikailag elkülönül az eddig ismert emberi polyomavírusoktól és leginkább az elsőként felfedezett, egér fültőmirigy-daganat kiváltására képes polyomavírussal (MPyV) van rokonságban.

II. Fekete szíriai hörcsög bőrtumor vizsgálata és a BSHRV

Esettanulmány és kliniko-patológia

A *post mortem*-patológus által elvégzett - boncolás során a fekete szíriai hörcsög testtömege 40 g volt. A tumor kemény, tömör tapintatú, körülírt, fehér és bőr színű volt. A vágott felületen homogén, szürkés szövetek által körülírt nagy központi nekrosis volt látható. A mellkason, több, jól körülírt, 0,7 cm átmérőjű, kemény tapintatú áttétek voltak megfigyelhetőek, vágott felületen fehér színnel. A test más részein nem észleltünk szemmel látható áttéteket.

Virális szekvencia azonosítása metagenomikai módszerekkel

Az állat arcáról származó primer daganatos szövetet virális metagenomikai módszerrel vizsgáltuk. *In silico* és *de novo* analízist követően kevés, összesen 5593 szekvencia leolvasást kaptunk, amelyek vírusokkal mutattak hasonlóságot (BLASTx cut-off E-érték $\leq 10^{-10}$). Ezek közül 2284 leolvasás a *Retroviridae* víruscsaláddhoz, 613 a humán endogén retrovírus elemekhez, 1622 egyéb, illetve 1074 nem osztályozott

vírusokkal mutattak hasonlóságot. A *Retroviridae* víruscsaládhoz tartozó leolvasásokat kiválasztottuk és elemeztük.

Retrovirális szekvencia meghatározása

A metagenomikai módszerekkel azonosított retrovirális szekvenciák alapján tervezett szekvencia-specifikus primerpárok felhasználásával a retrovirális DNS szekvenciát kimutattuk a tumoros szövet DNS-éből, valamint a máj, tüdő, farok szövetmintáiból is PCR-módszerrel. Ezek az eredmények azt mutathatják, hogy a retrovirális szekvencia integrált formában lehet jelen a gazdaszervezet genomjában, mint endogén retrovírus. Megjegyzendő, hogy a virális RNS csak a „nested” PCR-vizsgálat második PCR-körében volt kimutatható a daganat DNáz-zal kezelt RNS-mintájában, a tumor nélküli szervek többi RNS-mintájából azonban nem.

A tumorszövet DNS mintájából „primer walking” módszerrel, TAIL-PCR-módszerrel és többszörös kontroll PCR-reakciók segítségével meghatároztuk a teljes retrovirális genomot, amelyet fekete szíriai hörcsög retrovírusnak (BSHRV=black Syrian hamster retrovirus, GenBank: MK304634) neveztünk el. A BSHRV genom teljes hossza 8784 nt. A genomszerkezet tipikus retrovirális genomszerveződést mutat: 5'LTR-*gag-pro-pol-env*-3'LTR. A BSHRV kódolja a kapszid/nukleokapszid (*gag*) fehérjét, a genom replikációjához szükséges reverz transzkriptáz és integráz enzimeket (*pro/pol*) és a burokfehérjét (*env*). Mivel a BSHRV genom az eddig ismert összes alapvető retrovírus genom elemét és fehérjét kódolja, ezért a genomja alapján teljes bétaretrovírusnak tekinthetjük.

Filogenetikai analízis

A BSHRV *pol* és *env* fehérjéken alapuló filogenetikai elemzéseket a MEGA6 program neighbor-joining módszerével és a bétaretrovírusok referencia szekvenciáinak felhasználásával végeztük el. Filogenetikai szempontból a BSHRV a MMTV bétaretrovírussal egy ágon helyezkedik el, a MMTV bétaretrovírushoz áll legközelebb, ugyanakkor a BSHRV új bétaretrovírus fajt képviselhet, más ismert bétaretrovírus fajok rokonsági kapcsolataival összehasonlítva.

Szövetteni lelet

A primer és a metasztatikus daganat hematoxin-eozinnal festett szövettani metszete jól differenciált laphámsejtes karcinómát mutatott. A szövettani metszeteken a fibroblasztikus neostróma lángnyelvszerű infiltrációja figyelhető meg, centrálisan keratinizált tumorsejt fészekkel.

***In situ* hibridizáció**

A BSHRV-specifikus hibridizáció elsősorban a laphám proliferáló daganatsejtjeire korlátozódott, amelyek számos koncentrikus keratin csomót képeztek. A hibridizációkat a tumorsejték magjában lehetett megfigyelni, mind szekvenciális, mind antiszensz próbával hibridizált metszetekben. Ezenkívül a hibridizációs szignálok lokalizációja lényegében azonos volt a szensz és az antiszensz próbákkal jelölt metszetekben. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a próbák a BSHRV integrált provirális DNS-ét mutatták ki, nem pedig a virális RNS-t.

A BSHRV béta retrovírus kimutatása további hörcsög mintákból

A három állattól összegyűjtött székletminták egyikének DNS extraktumából a BSHRV béta retrovírus szekvencia nested-PCR és szekvenálás módszereivel kimutatható volt. A felsokszorozott 538nt hosszú *gag* génszekvencia 99,4%-os nukleotid hasonlóságot mutatott a BSHRV/2013/HUN megfelelő régiójával. A BSHRV-pozitív bélsárral rendelkező nőstény állat természetes pusztulását (2018. november 22.) követően a *post mortem* fibróma, tüdő és máj szövetmintákból a BSHRV genomszekvencia ugyancsak kimutatható volt PCR és szekvenálás módszereivel.

A qPCR-vizsgálat eredményei alapján a laphámsejtes bőrdaganatos fekete szíriai hörcsög (1. állat) tumor, máj és tüdő mintái hasonló mennyiségű (integrált) vírus kópiát tartalmaztak ($\sim 1,18 \times 10^4$ /ng DNS), míg a fark mintában majdnem kétszer akkora volt a vírusgenom kópiaszáma ($2,03 \times 10^4$ /ng DNS). Érdekes módon a vírusgenom kópiaszáma a 2. nőstény állat szövetmintáiban egy nagyságrenddel magasabb ($1,11 \times 10^5$ /ng és $1,76 \times 10^5$ /ng DNS között) volt, mint a laphámsejtes bőrdaganattal rendelkező állatnál (1. állat).

Az onkogén vírusok a daganatos megbetegedések egyik kóroki tényezőiként szerepelhetnek. Becslések alapján az emberi daganatos megbetegedések 15–20%-át mikroorganizmusok, ezen belül vírusok okozzák. A jelenleg ismert onkogén vírusok között DNS (EBV, HPV, HBV, HHV-8 és MCV) és RNS (HCV és HTLV-1) genomú vírusok egyaránt vannak. Feltehetően az ismert emberi onkogén tumor vírusok sora még nem teljes. Jelenleg is számos kutatás foglalkozik már ismert, potenciálisan daganatkeltő vírusok, illetve eddig még ismeretlen daganatkeltő vírusok vizsgálatával és leírásával, emberi és állati eredetű tumoros megbetegedésekben. Jelentősen nehezíti a virális fertőzés és az adott daganat közötti ok-okozat összefüggés bizonyítását, hogy sok esetben hosszabb idő is eltelhet az események között, a daganatkeltő hatás az események előrehaladtával többfaktorossá válhat, még ha a daganatos folyamatok megindításában az adott feltételezett vírusnak szerepe is lehetett. Külön színesíti, izgalmasság teszi, egyben meg is nehezíti a helyzet tisztán látását, hogy az adott virális genom sok esetben exogén vírusként és endogén, a gazdasejt genetikai állományába integrálódott genomszekvenciaként is jelen lehet, illetve funkcionálhat.

Munkánkban egy emberi és egy állati daganatos bőrbetegség virális etiológiai hátterét kerestük különböző, korszerű szekvenciafüggetlen és szekvenciafüggő molekuláris biológiai módszerek segítségével. Az emberi Merkel-sejtes karcinóma esetében egy frissen leírt daganatkeltő vírus, az MC polyomavírus klinikopatológiai szerepét vizsgáltuk bőrdaganatos humán beteganyagunkban; a szíriai hörcsög ismeretlen eredetű bőrdaganata esetében pedig a szekvenciafüggetlen virális metagenomika eszközével igyekeztünk - a lehetőségekhez képest – az esetleges virális eredetű etiológiát feltárni.

I. Merkel-sejtes karcinóma és Merkel-sejtes polyomavírus

A Merkel-sejtes karcinóma ötven éve ismert, ritka emberi daganatos megbetegedés. Ebben az esetben is a megszorodott, szerzett immunszuppresszív állapotok vezettek előbb a kórkép számának megnövekedéséhez, majd ezt észlelve, a kórkép fertőző eredetének bizonyításához. Az MCC szövettani diagnózisát követően, tumoros szövetből vett mintáiból MC polyomavírust tudtunk kimutatni molekuláris

módszerekkel és egy esetben meghatároztuk a daganatkezelésben kulcsszereppel bíró csonkoló pontmutáció helyét is.

Eseteinket tanulmányozva megállapítottuk, hogy klinikailag egyik esetünkben sem merült fel az MCC gyanúja a kórszövettani vizsgálatot megelőzően, azaz az elváltozás a klinikai gyakorlatban differenciáldiagnosztikai problémát okoz. Téves vagy nem teljes iránydiagnózisként leggyakrabban pyogén granulóma, bazalióma, laphámrák és keratoakantóma szerepeltek. Ezen elváltozások közül azonban több olyan is megtalálható, amelyek nem igényelnek sürgős, széles sebészi kimetszést, szemben a gyorsan progrediáló Merkel-sejtes karcinómával. E daganat esetében különösen fontos a korai felismerés és az adekvát kezelés, hiszen amennyiben a korai stádiumban (I/A) a várható 5 éves túlélés 60-79%, addig az első távoli áttét megjelenésekor (IV. stádium) ez csak 18%.

Munkánk egyik legfontosabb célkitűzésének éppen azt tartjuk, hogy az MCC kórképpel kapcsolatos új ismeretek, eredmények és terápiás lehetőségek a hazai klinikai gyakorlatba mielőbb átkerüljenek. Úgy a kockázati tényezők ismerete és lehetőség szerinti csökkentése, mind az elváltozás korai felismerési és kezelési bizonytalanságainak csökkentése hozzájárul – véleményünk szerint már most is – az érintett betegek túlélésének növekedéséhez. Különösen tanulságosnak tartjuk a fiatal, 55 éves férfi betegünk történetét. Hiszen egy alapvetően nem halálos alapbetegség (pszoriázis) minden bizonnyal orvosi (PUVA) kezelése (az MCC rizikót közel 100X-ára növeli!) vezethetett az MCC kialakulásához, majd a beteg (korai) halálához. Ez felhívja a figyelmet, egyrészt arra, hogy pszoriázisos betegeknél ezt az erős rizikófaktort ismerni (és lehetőség szerint kerülni) kell, valamint az ezzel a módszerrel kezelt betegeket követni szükséges és gyanús bőrelváltozás esetén mielőbb be kell avatkozni. Ez azt is jelenti, hogy más daganatos megbetegedéshez hasonlóan, az MCC esetén is fontos az egyes társszakmák közötti együttműködés („team munka”). Az észlelő orvoson kívül, elsődlegesen a bőrgyógyász, a patológus, az onkológus, a sugárterapeuta, a radiológus, a sebész és adott esetben a mikrobiológus tudására és összehangolt munkájára is szükség van.

Bár vizsgálatunk kis mintaszámú és eredményei retrospektív adatokra és archivált szövettani mintákra támaszkodnak, de mégis levonhatók fontos következtetések. Az epidemiológiai jellegzetességek közül ki kell emelni, hogy az átlagéletkor a nemzetközi irodalmi adatoknak megfelelő (70 év) volt a betegeinknél (73,8 év). A nemi arány az általunk vizsgált betegek körében enyhe férfi dominanciát mutatott (66%) az irodalomban olvashatókhoz hasonlóan (59%). A daganat

lokalizációját tekintve nem találtunk különbséget a vírussal társuló és nem társuló esetek között. Egy, a legfiatalabb beteg kivételével (akinél a természetes fénytől rendszerint védett bőrterületen, a lábszárán jelentkezett a primer daganat) mindegyik esetben a tumor a fej-nyaki régiókban (arc, homlok, orrszárny, nyak), napsugárzásnak erősen kitett bőrfelszíneken helyezkedett el, szintén az irodalmi adatokhoz hasonlóan. Mindegyik betegnél találtunk az MCC-re hajlamosító tényezőket, mint az immunszuppresszió és/vagy az idős kor. A metasztázisok leggyakoribb helyei az eseteinknél is a bőr és a nyirokcsomó voltak, azonban az irodalmi adatoktól eltérő gyakoriságban talákoztunk a nyirokcsomóáttétellel. Nyolcból hat (75%) esetben volt ez megfigyelhető. Ez részben azzal magyarázható, hogy a daganatok későn kerültek felismerésre, illetve a kezelések sem voltak kellően adekvátak.

Vizsgálataink eredményei közvetlenül hasznosíthatók a laboratóriumi diagnosztika területei mellett a klinikai betegellátásban is. Véleményünk szerint egy beteg(ség)csoport jól definiált elkülönítése az első lépés egy kórkép valódi megismeréséhez és ez vezethet el a korai felismeréshez, a hatékony kezeléséhez, megelőzéséhez. Az MCC diagnosztikája szövettani vizsgálaton alapul, az MC vírus kimutatása azonban még nem képezi a rutin diagnosztika részét. Tapasztalataink alapján, már a szövettani vizsgálattal gyanítani lehet, hogy a mintában jelen van-e az MC polyomavírus. A vírus negatív daganatok szövettani képén sokkal irregulárisabb, változatos, polygonális magvú daganatsejteket láthatunk, helyenként világos, kevésbé egységes citoplazmával. Az MC polyomavírus pozitív daganatok típusos morfológiát mutató kerek vagy ovális alakú, vezikuláris magokkal és egységesebb citoplazmával rendelkező sejtekből állnak. Vizsgálataink támogatják azt az elképzelést is, miszerint az MC polyomavírus jelenléte a szövettanilag MCC-ák (egységesebb szövettani mintázat, limfóvaszkuláris invázió hiánya) körében jobb prognózissal társul. A halálozás az MC-pozitív és MC-negatív csoportunkban 33%, illetve 80% volt. Egyre biztosabban kijelenthető a külföldi és hazai tapasztalataink alapján, hogy a vírussal nem társuló esetek önálló kliniko-patológiai entitások lehetnek, amelyek klinikai megjelenésükben hasonlóak, de szövettani képükben és lefolyásukban elkülöníthetőek a vírust hordozó változatoktól. Ez a jövőben meghatározó jelentőséggel bírhat, amennyiben célzott terápiás eszközök állnak a rendelkezésre. Az MC polyomavírus negatív esetekben gyakran találkozhatunk más bőrdaganatokkal is, amelyek patogenezisének megértésében segíthet az a kutatási eredmény, miszerint a Merkel-sejtek epidermális (és nem crista neuralis) eredetűek, azaz elvben az epidermális premalignus progenitor sejtek hám vagy neuroendokrin irányba is fejlődhetnek. Tehát ezen esetekben a daganat

feltehetően éretlen sejtekből indulhat ki, ami már önmagában magyarázatul szolgálhat az MC polyomavírus negatív esetekben megfigyelhető kedvezőtlenebb prognózisra. Ugyan az MC polyomavírus jelenléte és a genomjának integrációja az MCC sejtek kromoszómájában igazolni látszik szerepét a daganat kialakulásában, ennek pontos patomechanizmusa még sok kérdést vet fel és további vizsgálatokat igényel.

Figyelmet érdemel az is, hogy önmagában az MC polyomavírus nukleinsav kimutatása nem jelent egyet a karcinóma diagnózisával. A jelen ismeretek szerint csak a gazdasejt genomjába integrálódott, majd mutációt szenvedett virális eredetű nukleinsav tehető felelőssé a daganatos elfajulásért. Ez hasonló, mint amit az MC polyomavírus legközelebbi rokon vírusainál, a humán papillomavírusoknál már jól ismerünk. A vírus „ártatlanul” jelen lehet (azaz kimutatható) pl. a méhnyakon, de csak a megfertőzött gazdasejt genomjába integrálódott papillomavírus tehető felelőssé a méhnyakrákéért.

Az eddig megismert, különböző földrajzi térségekből izolált MC polyomavírusok genomjaiban egymáshoz képest csak igen kevés nukleotid eltérés található. Betegünkből meghatározott MC polyomavírus is átlagosan csak minden 540. nukleotidja különbözik a prototípus vírustól (benne a csonkoló pontmutációval). Feltehetően e kettősszálú DNS genomú vírusok evolúciós mutációs rátája – a teljes genomra vonatkoztatva – alacsony lehet. Ez azt is jelentheti, hogy a molekuláris diagnosztikai kimutatásuknál a genom változatosságából következő nehézségekkel kevésbé kell számolni, mint a nagy mutációs rátával jellemezhető RNS vírusoknál. Bízunk benne, hogy a jövőben, a kidolgozott, megfelelő érzékenységű, differenciáló (akár mennyiségi és mutáció mérésen alapuló) molekuláris biológiai technikák, mind a vírus kimutatása, mind pedig a biomarkerként szolgáló nagy T-antigén elleni antitest kimutatása esetén fontos diagnosztikai és prognosztikai jelentőséggel bírhatnak majd.

Az MC polyomavírus az első igazolt emberi daganatkeltő polyomavírus, amelyet mai tudásunk szerint a MCC kórokaként tekintünk. Az agresszív karcinóma fertőző kóreredete szemléletváltást eredményez a patogenezis, a diagnosztika és reményeink szerint a jövőben a kezelés és a megelőzés területén is. Az MCC patomechanizmusának részletes feltárása elvezethet specifikus kezelési módszerek megalkotásához. A virális eredetből értelemszerűen az is következik, hogy ez a súlyos kimenetelű daganatos betegség – a hepatitis B vírus és a papillomavírus okozta daganatokhoz hasonlóan - a jövőben talán vakcinával megelőzhető vagy célzottan kezelhető lehet.

II. Fekete szíriai hörcsög bőrtumor vizsgálata és a BSHRV

Szövetteni elemzés, virális metagenomikai/új generációs szekvenálás, *in situ* hibridizáció, PCR és RT-PCR módszerek felhasználásával egy fekete szíriai hörcsög (*Mesocricetus auratus*) differenciált laphámsejtes bőrtumor mintájából egy új endogén retrovírus szekvenciát azonosítottunk és határoztunk meg, amelyet black Syrian hamster retrovirus-nak (BSHRV, MK304634) neveztünk el.

A BSHRV bétaretrovírus DNS-szekvenciája kimutatható volt PCR és szekvenálás módszereivel a tumorszövet DNS-kivonataiból, valamint az ugyanazon fekete szíriai hörcsög összegyűjtött máj-, tüdő- és farok szövetmintáiból. Érdekes módon, a virális RNS csak a nested-PCR vizsgálat második PCR-körében volt kimutatható a daganat DNáz-zal kezelt RNS-mintájában, a tumor nélküli szervek többi RNS-mintájában azonban nem, amely alacsony szintű virális RNS-expresszióra utal a daganatos szövetben. A BSHRV bétaretrovírus jelenlétét és elterjedtségét három további hörcsög mintáinak bevonásával vizsgáltuk. A BSHRV retrovírus DNS-szekvenciáját sikerült kimutatni egy további hörcsög székletmintájában (valószínűleg a székletben lévő gazdasejtekből), majd ugyanennek az állatnak *post mortem* gyűjtött szövetmintáiból. Érdekes módon ez az állat is daganatos elváltozásokat mutatott, ennek az állatnak a hasán és mellkasán alakultak ki többszörös fibrómák. A BSHRV és a hörcsög bőrdaganata közötti ok-okozati kapcsolatot egyelőre még nem tisztáztunk. Annak bizonyítására vagy kizárására, hogy a BSHRV, hasonlóan más onkogén retrovírusokhoz, befolyásolja vagy hozzájárul az onkogén transzformációs folyamatok kialakulásához és így képes normál sejteket rosszindulatú sejtekké alakítani, további vizsgálatok szükségesek.

A BSHRV, tipikus bétaretrovirális genomhosszal és genomszerkezettel (5'LTR-*gag-pro-pol-env*-3'LTR) jellemezhető. Mivel a BSHRV genom az eddig ismert összes alapvető retrovírus genom elemet és fehérjét kódolja, ezért a genomja alapján teljes bétaretrovírusnak tekinthetjük. A prototípus MMTV bétaretrovírussal ellentétben azonban a *sag* (szuperantigén) gén az 3'LTR-ben nem található meg. A kódoló régióban a *gag* tartalmazza a p10 és p24 strukturális bétaretrovírus fehérjéket, az ún. „zinc knuckle”-t és az ún. „zinc-finger” proteineket. A *pro* gén tartalmazza a dUTPáz és a retropepszint. A *pro/pol* szakasz a retropepszint (aszpartát proteáz), az alapvető retrovírus enzimeket, így a reverz transzkriptáz (RT), az RNáz H-t és az integráz enzimeket kódolja. Az *env* gén a vírusburok glikoproteinjét kódolja. A BSHRV teljes és

gyakorlatilag épnek tűnő LTR/kódoló genomrégiói a vírus replikációjának és potenciálisan életképes retrovírusok előállításának egyik előfeltétele.

A szekvencia- és filogenetikai elemzések azt mutatták, hogy a különböző BSHRV fehérjék csak kevéssé, 50-63%-ban hasonlítanak más, eddig ismert bétaretrovírusok adott fehérjéihez. Így a BSHRV távoli rokonságban áll az ismert bétaretrovírusokkal, de feltehetően egy új bétaretrovírus fajt képvisel. A legközelebbi hasonlóságot a bétaretrovírusok között, az egér emlőtumor vírushoz (MMTV) találtunk. Ez azért tartható érdekesnek és fontosnak, mert az MMTV egerekben az onkogén bétaretrovírusok fontos prototípusát képviseli, és amelyet összefüggésbe hoztak az emberi emlőrakkal is. Egy új MMTV-szerű bétaretrovírus teljes szekvenciájának meghatározása, egy új emlős gazdafajban növeli az ismereteket a bétaretrovírusok genomdiverzitásáról, a lehetséges gazdafaj spektrumról, illetve a fertőzés lehetséges forrásáról is. Az új bétaretrovírus nukleotid szekvencia variáns ismeretében érdemes lenne az „MMTV” PCR-szűrővizsgálatokban alkalmazott primereket és próbákat újratervezni, és ezeket kipróbálni mind emberi, mind pedig a különböző állati prevalencia vizsgálatokban. Ez újabb adatokkal és eredményekkel szolgálna az MMTV-szerű vírusok és az emberi emlőtumorokkal kapcsolatos kérdéskörben.

A BSHRV azonosításával és teljes genomjának meghatározásával azonban számos további nyitott kérdés merül fel. A BSHRV potenciális exogén formáját (virion) és ha van, átvitelének módját/módjait nem határoztuk meg. További vizsgálatokra van szükség a BSHRV és a BSHRV-szerű bétaretrovírusok prevalenciájának, a gazdafajok sokféleségének, szerepének és biológiai jelentőségének meghatározásához hörcsögökben, és ha vannak közvetlen virális rokonai, más emlősökben is.

A mikroorganizmusok szerepe és a fertőző betegségek jelentősége korántsem tekinthető lezárt kérdésnek. Szinte naponta szembesülünk a mikrobiális világ újabb és újabb, korábban nem ismert aspektusaival. A mikroorganizmusok és a daganatos megbetegedések kapcsolata ebből a szempontból mindig is bővelkedett az ellentmondásokban, az eredmények lassú elfogadásában vagy elfelejtésében, a dogmákban és a zsákutcákban is. Sokfaktoros, időben elnyúlt és összetett kórfolyamatok révén az ok-okozat bizonyítása nehéz. Vizsgálatainkban preconcepciók nélkül igyekeztünk az ismereteket bővíteni egy frissen leírt emberi daganatot okozó vírussal kapcsolatban, illetve potenciálisan virális hátteret kerestünk egy hobbiállatként tartott hörcsög daganatos elváltozásából. A körülöttünk lévő világ tudományos igényű feltérképezése vezethet el minket a körülöttünk álló élővilág leírásához és megértéséhez.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani mindazoknak, akik a munkámat segítették és hozzájárultak ahhoz, hogy ez a dolgozat megszülethessen.

Legnagyobb hálával témavezetőmnek, Prof. Dr. Reuter Gábornak tartozom, aki szakmai tanácsain, ötletein túlmenően munkámhoz szükséges anyagi feltételeket is megteremtette. Köszönettel tartozom önzetlen segítségéért, töretlen támogatásáért, a szakmai elméleti és gyakorlati ismeretek átadásáért és a megelőlegezett, belém vetett bizalomért.

Szeretném megragadni az alkalmat, hogy kifejezzem köszönetemet a támogatásért, amelyet munkám gyakorlati kivitelezésében Dr. Boros Ákostól és Dr. Pankovics Pétertől kaptam. Köszönettel tartozom a Baranya Megyei Kormányhivatal, Népegészségügyi Szakigazgatási Szerve, Regionális Virologiai Laboratórium, valamint a Pécsi Tudományegyetem (PTE), Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetének valamennyi szakdolgozójának is.

Köszönettel tartozom Dr. Kálmán Endre patológus főorvos úrnak (PTE KK Pathologiai Intézet), aki mindkét témámat szakmai tanácsaival, észrevételeivel, ötleteivel segítette, és a boncolás és szövettani munkák elkészítésében nyújtott szakmai segítséget, valamint Horváth Eszternek, aki a Pathologiai Intézetben a háttérmunkák elvégzésében volt a segítségemre.

Köszönettel tartozom Dr. Kádár Zsolt főorvos úrnak és Prof. Dr. Battyányi Zita bőrgyógyász szakorvosoknak a betegminták, fényképek és a klinikai munkájuk tapasztalatainak megosztásáért.

Köszönet illeti Dr. Eric Delwart laboratóriumvezetőt (Vitalant Research Institute, San Francisco, CA, USA), aki lehetőséget biztosított laboratóriumában a virális metagenomikai és az új generációs szekvenáláson alapuló vizsgálatok elvégzésére.

Végezetül pedig köszönöm szüleimnek, Szlukovinyi Ildikónak és Horváth Gyulának a támogatást, férjemnek Dr. Szógyi Donátnak a szerető gondoskodást, a sok támogatást és biztatást és gyermekünknek, Szógyi Viktóriának a megértést és türelmet.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Horváth KB**, Pankovics P, Battyáni Zita, Kálmán E, Reuter G. Merkel-sejtes polyomavírus, mint a Merkel-sejtes carcinoma valószínű kóroka.
Orvosi Hetilap 2013;154(3):102-112. doi: 10.1556/OH.2013.29525
(Impakt faktor:0)
2. **Horváth KB**, Pankovics P, Kálmán E, Kádár Z, Battyáni Z, Lengyel Z, Reuter G. Epidemiological, clinicopathological and virological features of Merkel Cell Carcinomas in Medical Center of University of Pecs, Hungary (2007-2012).
Pathology and Oncology Research, 2016;22(1):71-77. doi: 10.1007/s12253-015-9974-z.
(Impakt faktor:1,736)
3. **Horváth KB**, Boros Á., Kálmán E, Pankovics P, Delwar E, Reuter G. Characterization of an integrated, endogenous mouse mammary tumor virus-like (MMTV) betaretrovirus genome in a black Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*).
Infection, Genetics and Evolution, 2019;75:103995. doi: 10.1016/j.meegid.2019.103995.
(Impakt faktor:2,773)

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ ABSZTRAKTOK, ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK

1. **Horváth KB**. A Merkel-sejtes polyomavírus, mint a Merkel-sejtes karcinóma valószínű kóroka – kliniko-patológiai és virológiai vizsgálataink tapasztalatai. Tudományos Diákköri Konferencia (TDK), Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, 2013. február 7-8, Pécs (bőrgyógyászat szekció: I. helyezés)

2. **Horváth KB.** A Merkel-sejtes polyomavírus, mint a Merkel-sejtes karcinóma valószínű kóroka – kliniko-patológiai és virológiai vizsgálataink tapasztalatai. XXXI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia (OTDK), Szegedi Tudományegyetem, 2013. április 2-5, Szeged (mikrobiológia szekció: I. helyezés)
3. **Horváth KB.** A Merkel-sejtes polyomavírus, mint a Merkel-sejtes karcinóma valószínű kóroka – kliniko-patológiai és virológiai vizsgálataink tapasztalatai. V. Nemzetközi és XI. Országos Interdiszciplináris Grastyán Konferencia, 2013. április 17-19, Pécs (a legközérhetőbb előadás díja).
4. **Horváth KB,** Pankovics P, Kálmán E, Reuter G. A Merkel-sejtes polyomavírus, mint a Merkel-sejtes karcinóma valószínű kóroka – kliniko-patológiai és virológiai vizsgálataink tapasztalatai. Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság, Fial Infektológusok Fóruma, 2013. június 6, Budapest (I. helyezés).
5. **Horváth KB,** Pankovics P, Kálmán E, Reuter G. A Merkel-sejtes polyomavírus, mint a Merkel-sejtes karcinóma valószínű kóroka – kliniko-patológiai és virológiai vizsgálataink tapasztalatai, Amerikai Magyar Orvosszövetség (HMAA) Konferenciája, 2013. augusztus 17, Balatonfüred. (poszter)
6. **Horváth KB,** Pankovics P, Kálmán E, Reuter G. A Merkel-sejtes polyomavírus, mint a Merkel-sejtes karcinóma valószínű kóroka – kliniko-patológiai és virológiai vizsgálataink tapasztalatai. Magyar Onkológusok Társasága XXX. Kongresszus, 2013. november 14-16, Pécs.
7. **Horváth KB** A Merkel-sejtes karcinóma, kliniko-patológiai és virológiai vizsgálatainak tapasztalatai. Doktoranduszok Országos Szövetsége, Tavaszi Szél Konferencia, 2014. március 22.

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1. Pankovics P, Boros Á, Bíró H, **Horváth KB,** Phan TG, Delwart E, Reuter G. Novel picornavirus in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus var. domestica*). **Infection, Genetics and Evolution;** 2016;37:117-22. 10.1016/j.meegid.2015.11.012. (Impakt faktor: **2,885**)