

Doktori (Ph. D.) értekezés

**NEWCASTLE BETEGSÉG VÍRUS-INDUKÁLT  
SEJTPUSZTULÁS *IN VITRO* VIZSGÁLATA  
DAGANATSEJTEKEN**

dr. Fábián Zsolt

Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Orvosi Biológiai Intézet

Pécs, 2006.

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezető: dr. Sümegi Balázs egyetemi tanár

Program- és témavezető: dr. Szeberényi József egyetemi tanár

# TARTALOM

ELŐSZÓ	3
TUDOMÁNYOS HÁTTÉR	5
Vírusvakcinák és daganatok	5
Genetikailag módosított vírusok	7
Herpes simplex vírus	7
Adenovírusok	8
Polio- és Vakcínia vírusok	10
Daganatsejtek iránti természetes affinitással rendelkező vírusok	12
Reovírus	12
A NEWCASTLE BETEGSÉG VÍRUS	13
Onkolitikus Newcastle betegség vírus variánsok	17
KÉRDÉSFELVETÉS, CÉLKITŰZÉSEINK	19
Kísérleti megközelítés	21
EREDMÉNYEINK	23
Aktív vírusreplikáció az MTH-68/H kiváltotta citotoxicitásban	28
Az MTH-68/H apoptózist indukál	31
Az MTH-68/H kiváltotta apoptózis p53 független	36
c-Myc és NF $\kappa$ B transzkripció faktorok aktivációja MTH-68/H fertőzés során	39
ÖSSZEFOGLALÁS	41
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	56
MÓDSZEREK	57
PUBLIKÁCIÓK	59
FELHASZNÁLT IRODALOM	61
MELLÉKLET	65

## ELŐSZÓ

A biológia tudományának a XX. században végbement fejlődése alapvetően változtatta meg gondolkodásunkat, lehetőségeinket illetve az élő anyagról alkotott világképünket. Az emberiséget évezredek óta foglalkoztató kérdések kerültek megválaszolásra, korábban nem is álmodott távlatokat nyitva meg. A tudományos megismerés sajátos folyamata azonban továbbra is megkerülhetetlen maradt, minden új válasz újabb kérdések tucatjainak felbukkanását idézi elő.

Az élő anyag viselkedését meghatározó szabályok megismerése, folyamatainak felderítése, lehetőséget teremtett számos, korábban leküzdhetetlen kór gyógyítására, esetenként végleges szanálására. Az elmúlt évtizedekben kifejlesztett molekuláris biológiai eljárások új frontvonalakat nyitottak meg, lehetővé téve a betegségek molekuláris szintű megközelítését, értékelését és reményeink szerint a nem túl távoli jövőben azok gyógyítását is. A medicina néhány területén azonban a hatalmas erőfeszítések ellenére sem sikerült mindeddig látványos áttörést elérni; antimaláriás gyógyszereink ellenére ma is pusztít a mocsárláz, rohamléptekkel tör előre az AIDS és néhány kivételtől eltekintve, továbbra sincs lehetőség a daganatos megbetegedések biztos sikerrel kecsegtető gyógyítására. Bár a molekuláris biológia gyakorlatba átültetett eredményei mára már betörték a mindennapi élet szinte valamennyi területére, kezdve a mezőgazdasági felhasználástól, a környezetvédelmen át a gyógyászatig, a folytatódó alapkutatások továbbra is megoldásokat keresnek az eddig még megválaszolatlan kérdésekre, köztük a daganatos megbetegedések hatékony preventív, diagnosztikai illetve terápiás problémáira. Az intenzív nemzetközi vizsgálatoknak köszönhetően világossá vált, hogy a daganatképződés többlépcsős mechanizmusában a fokozott sejtszaporodásért és a csökkent sejtpusztulásért felelős folyamatok egyaránt szerepet játszanak. Ma úgy tűnik, hogy a daganatos betegségek kérdéskörének tárgyalásakor, számos egyéb irányvonal mellett, növekvő hangsúllyal kell említenünk azon kutatásokat, amelyek a sejtek szabályozott pusztulása és a daganatok kialakulása közti kapcsolatokat próbálják tisztázni, tovább szélesítve felhasználható terápiás eszközeink tárházát [1, 2].

Magyarország a daganatok kérdésében sajnos különösen érintett, minthogy szomorúan előkelő helyet foglal el a daganatos megbetegedések okozta halálozások számának nemzetközi „ranglistáján”. Hazánkban a rosszindulatú daganatos megbetegedések halálozási aránya a szív- és keringési-rendszer eredetű halálokok mögött a második helyet foglalja el mintegy 25%-os gyakorisággal. Európában Magyarországon a legmagasabb a daganatos megbetegedések miatti halálozás; a betegségcsoport 36 európai ország kor szerint standardizált mortalitási rátájának elemzése alapján férfiaknál az első, nőknél pedig a második helyen állunk. A magyarországi rákmortalitási adatokat összehasonlítva az európai országok megfelelő adataival megállapítható, hogy a dohányzással összefüggő tüdő- és szájüregi daganatok esetében Magyarország vezet a férfi halandósági statisztikát, ugyanakkor a női daganatos halálozás tekintetében a vastagbél-daganatok és a leukémiák esetében az első, az emlő-daganatok esetében pedig a 9. helyen áll. Az egészségügyi kormányzat 2006. elején publikált adatai alapján 2000–2003. között a férfi daganatos megbetegedések száma 34 359-ről 40 366-ra növekedett.

A gyermekkori rosszindulatú daganatos megbetegedések bár lényegesen ritkábban fordulnak elő mint felnőttkorban, jelentőségük mégis kiemelkedő, mivel a halálokok között az 1–14 év közötti gyermekeknél a daganatos megbetegedések a balesetek után az első helyen állnak. A gyermekkori rosszindulatú daganatos megbetegedések gyakorisága hasonló a nyugat-európaihoz, viszont hazai sajátosság, hogy a daganatok közül a központi idegrendszer daganatos megbetegedéseinek gyakorisága eléri a leukémiás megbetegedések gyakoriságát. Minden egyéb gyermekkori daganattípus az összes bejelentett daganatos megbetegedés mintegy harmadát alkotja. 2004-ben az új megbetegedések száma 14/100 000 15 év alatti gyermek (mintegy évi 300 új eset), a kezelés alatt álló betegek száma 622, a gondozottak száma 2163 volt.

Amennyiben a fenti tendenciák nem változnak számottevően a közeljövőben, úgy egyes „életkor-specifikus” adatokra támaszkodó becslések alapján, a következő években 1000 fiú újszülöttből 313, míg 1000 leánygyermekből 149 rosszindulatú daganat miatt fog meghalni, még 75 éves kora előtt.

## TUDOMÁNYOS HÁTTÉR

### *Vírusvakcinák és daganatok*

A vírusfertőzések és a daganatos megbetegedések közti kapcsolat koncepciója nem újkeletű. Az első tudományos alaposságú beszámolók 1904-ben, majd 1912-ben jelentek meg a vírusfertőzések és a daganatos betegségek lehetséges kapcsolatáról [3, 4]. *Dock* és *DePace* tudósítása szerint cervix carcinomában szenvedő betegek között több esetben jelentős tumor-regresszió következett be Pasteur-féle veszettség elleni oltóanyag adását követően. A következő években a téma egyre nagyobb tudományos figyelmet kapott és az 1920-as években elvégzett állatkísérletek megerősítették a virális onkolízis jelenségének tényét. Az 1940-es és 50-es években az állatkísérleteket humán próbálkozások váltották fel és megjelentek az első közlemények többek között a Newcastle betegség vírus és az influenza vírusok onkolitikus képességeiről is. 1970-re már közel 40 olyan, kétharmad részben RNS, egyharmad részben DNS vírust tartottak számon (pl.: a mumpsz, vagy a rózsahimlő kórokozóját, a szarvasmarhák enterovírusát vagy az attenuált humán herpes simplex vírust), melyekkel kapcsolatban megfigyelhető volt valamilyen mértékű onkolitikus hatás [5-7]. Az elmúlt évtizedekben, klinikai vizsgálatok során több száz daganatos beteg esett át a legkülönbözőbb vírusterápiás beavatkozásokon – igen eltérő eredménnyel. E korai próbálkozások eredményeit értékelni, illetve összehasonlítani nagyon nehéz, hiszen a jórészt klinikai megfigyelések gyakran nehezen ellenőrizhető körülmények között zajlottak. A kezdeti vizsgálatokban rendszerint végstádiumú, más terápiákra nem reagáló, gyakran többszörös metasztázisokkal bíró betegek vettek részt. Elvesztésük sokszor a betegséghez társuló egyéb előrehaladott kórformák okán következett be, hangsúlyozva, hogy súlyos, terminális állapotokban – a primer daganat sok esetben tapasztalt makro-, és mikroszkópos regressziója ellenére is – egy hatékonynak tűnő kezelés is sikertelen maradhat. Annak ellenére tehát, hogy a megfigyelések szerint egyes vírusfertőzések nagymértékben befolyásolják a daganatos megbetegedések lefolyását [8, 9], a megfigyelt tumor-regressziós és egyéb pozitív hatások (járulékos tünetek csökkenése, jobb közérzet stb.) háttere tisztázatlan maradt. A hatásmechanizmusra vonatkozóan több elképzelés is napvilágot látott, melyeket döntően két csoportra oszthatunk.

Az egyik elképzelés szerint az alkalmazott vírusvakcinák a daganatos szövetekben replikálódnak és a tapasztalt klinikai hatásokért az e folyamatok során fellépő direkt citopátiás hatás a felelős. Az ez irányban végzett *in vitro* kísérletekben sikerült ugyan kimutatni egyes kórokozók fokozott szaporodását daganatsejtekben, a klinikailag jelentős daganatellenes hatásokkal bíró vírusok esetében azonban a vírusreplikációt bizonyítani többnyire nem lehetett [10].

A másik irányzat szerint a klinikai tapasztalatok mögött döntően immunológiai mechanizmusok állnak, az onkolitikus hatású vírusok pedig egyfajta adjuvánsként szerepelve segítik a beteg immunrendszerének a daganatszövettel szembeni fellépését [11-13]. A vírusfertőzések során bekövetkező onkolízis pontos mechanizmusa azonban e teória esetében is tisztázatlan maradt.

Már a korai vizsgálatok is rámutattak arra, hogy a jelentősebb mértékű onkolitikus hatás gyakorta erősen neurotrópikus vírusokhoz kapcsolható, használatuk tehát nemcsak előnyökkel, hanem igen komoly veszélyekkel is járhat. Nyilvánvalóvá vált, hogy a hatékony, ugyanakkor veszélytelen onkolitikus vírusterápiára alkalmas ágenseknek több szigorú feltételnek is meg kellene felelniük. Az alkalmazandó vírusnak szelektíven kell hatnia a daganatos szövetek sejtjeire, ideális esetben még a nyugvó tumorsejtekre is, míg az egészséges szövetekre gyakorolt citopátiás hatás mértékének a lehető legkisebbnek kell lennie. A terápiás ágens nem okozhat a vad típusra jellemző emberi megbetegedést (mint a HSV, vagy a mumpsz vírus esetében), illetve a vírusterápia során bekövetkező emberi megbetegedéseknek jól karakterizáltaknak és teljes mértékben kezelhetőeknek kell lenniük. Igen komoly elvárást jelent a genetikai stabilitás biztosítása, amely feltétele mind a biztonságos kezelésnek, mind a vírus hatékony és standardizált előállításának. Megfelelő eszközöknek kell rendelkezésre állniuk az alkalmazott víusrészecskéknek a beavatkozás bármely szakaszában történő inaktiválására. Az alkalmazásra kerülő vakcina legyen jól tolerálható a hagyományos beavatkozási módok (pl.: intravénás adagolás) során is, és a lehető legkisebb mértékű immunológiai választ váltsa ki.

A megfelelően veszélytelen, emberi megbetegedést nem okozó, nem neurotrópikus, de ugyanakkor magas onkolitikus aktivitású vírusok keresése drámaian csökkentette a potenciális fajok számát, csaknem lehetetlenné téve a gyakorlatban is felhasználható ágensek kifejlesztését. Ráadásul a klinikai próbálkozások nem vezettek áttörő sikerekhez és a vírusterápián átesett betegeknél a kezdeti regressziót követően tumorprogressziót lehetett tapasztalni [14]. Végül a daganatos betegek gyógyításának ilyen irányú megközelítése - részben a vad típusú vírusok okozta betegségek kifejlődésétől tartva, részben pedig az egyéb, ma általánosan alkalmazott onkoterápiás módszerek térnyerése okán - háttérbe szorult. Szerencsére, a virológia, a genetika és a molekuláris biológia elmúlt közel két évtizedes, robbanásszerű fejlődése lehetőséget teremtett a korábbi tapasztalatok új megvilágításban történő felülvizsgálatára, és olyan, "genetikailag tervezett", szelektíven a daganatsejtekben replikálódó és így azokat elpusztító, ugyanakkor biztonságos, nem patogén vírusok kifejlesztésére, melyek az említett, igen szigorú kritériumoknak is megfelelhetnek, újra felélesztve az eredményes onkolitikus vírusterápia reális lehetőségét.

### ***Genetikailag módosított vírusok***

#### *Herpes simplex vírus*

A fenti megfontolások alapján több irányban is vizsgálatok indultak olyan onkolitikus vírusvakcinák kidolgozására, melyek hatékony terápiás alternatívát kínálhatnak a jelenlegi gyógyító eszközökkel szemben, vagy épp azok mellett. Az ilyen irányú erőfeszítések alapját a molekuláris biológiai ismeretek és módszerek drámai fejlődése biztosította. Lehetőség nyílt olyan, erősen onkolitikus hatású, de vad típusú formájában humán patogének átalakítására, mint a Herpes simplex vírus (HSV). A HSV-vel végzett, az onkolitikus hatás fokozására irányuló első kísérletek során egy timidin kináz-defektív mutáns létrehozására került sor, mely a normál szövetekben alig, míg tumoros sejtekben képes volt replikálódni [15]. Sajnálatos módon a timidin kináz gén "elvesztésével" egyúttal megszűnt a lehetősége annak is, hogy a mutáns replikációját a herpesz ellen használatos szerekkel szabályozni lehessen.

Az így létrehozott HSV variánsok nem feleltek meg maradéktalanul a korábban említett követelményeknek, ezért a ribonukleotid reduktáz, illetve a neurovirulencia gének mutációi segítségével, kombinált HSV mutánsokat is (pl.: G207) létrehoztak [16]. A kombinált mutánsok magas tumor szelektivitásuk mellett megtartották ganciklovir-érzékenységüket is, így terápiás felhasználási lehetőségük újabb lendületet kapott. A HSV-n végzett genetikai módosítások nemcsak a vírusgenom egyes részeinek diszrupciójára vagy deléciójára vonatkoztak, hanem szövetspecifikus promoterek beépítésére is. *Miyatake* és munkacsoportja a hepatocelluláris carcinoma kezelésében alkalmazni kívánt, szövetspecifikus HSV partikulumok előállításánál az albumin génjének promoter/enhancer elemeit beépítve az eredeti vírusgenomba, egy specifikusan a hepatocitákban replikálódó vírust hozott létre [17]. A HSV-vel kapcsolatban tehát számos genetikailag "tervezett" variáns létezik, melyek klinikai kipróbálása jelenleg is folyamatban van. Az elsőként betegeken is alkalmazott HSV variáns a már említett G207 jelű mutáns volt, amelyet terápiaerezisztens malignus gliomákban szenvedő betegeken próbáltak ki. A kezdeti próbálkozások tanúsága szerint az alkalmazott nagy dózis ( $>10^9$  ún. plakk-formáló egység [PFU]) ellenére sem lehetett toxikus hatásokat megfigyelni, habár a betegcsoport kisszámú volt ( $n=21$ ), [18, 19]. Hasonló adatok lelhetők fel további első fázisú klinikai vizsgálatok kapcsán is [20], bár hangsúlyozni kell, hogy a vizsgálatok egyelőre kezdeti stádiumban vannak.

### *Adenovírusok*

Minthogy meglehetősen sokféle szöveti rendszerben bizonyultak hatékony vektornak, a genetikailag módosított mutánsok másik, igen széles körben tanulmányozott tagjai az adenovírusok. Az onkolitikus terápiában történő felhasználásra a genomjuk úgynevezett korai régiójában helyet foglaló E1A és E1B gének mutációival – többnyire részleges vagy teljes deléciójával – létrehozott variánsok tűnnek a legalkalmasabbnak. Az ilyen mutáns adenovírusok – mint például az ONYX-015 jelzésű – megfigyelések szerint a vad típust meghaladó mértékben replikálódnak egyes tumorsuppresszor gének (pl.: p53 vagy retinoblastoma [Rb]) szempontjából defektív gazdasejtekben, míg egészséges, az említett fehérjéket tartalmazó sejtekben alig.



Az első mutáns adenovírus variáns (dl1520) tumorspecifikus replikációját a virális genom E1B génjének deléciójával hozták kapcsolatba. Az E1B egy 55 kD-os fehérjét (E1B55K) kódoló, a fertőzés korai fázisában expresszálandó gén, melynek terméke igen fontosnak tűnik a vad típusú adenovírusok replikációja szempontjából. Az E1B55K képes kapcsolódni a gazdasejt p53 tumorszuppresszor fehérjéjéhez, blokkolva annak aktivitását. Az E1B55K fehérje hiányában azonban az adenovírus E1A fehérjei által stabilizált p53 a gazdasejt apoptózisát okozza, még a vírusreplikáció effektív befejezése előtt. Az E1B defektív mutánsok ennek értelmében tehát csak azokban a szövetekben lennének képesek replikálódni, ahol a gazdasejtek endogén p53 szintje alacsony. Ismereteink szerint a humán daganatok közel 50%-ában a p53 aktivitás csökkenése tapasztalható, így a defektív adenovírusok ígéretes daganatellenes ágenseknek tűntek. Az elmúlt években azonban több munkacsoport is közzétett a fentiekkel ellentmondani látszó eredményeket. Míg egyes vizsgálatokban endogén p53-függő, más kísérleti megközelítésekben p53-független onkolitikus hatás volt megfigyelhető [21-23]. Annak ellenére tehát, hogy az adenovírusok korai fehérjéinek hatásmechanizmusáról viszonylag sokat tudunk, a genetikailag módosított adenovírus-mutánsokkal végzett kísérletekből a Rb és p53 fehérjék szerepére vonatkozó adatok továbbra is ellentmondásosak. Minthogy humán daganatokban a p53 aktivitás csökkenése igen jelentős probléma, a replikációs szempontból defektív mutánsok, mint p53-vektorok I. fázisú klinikai kipróbálására vonatkozóan az irodalomban biztató adatokat találunk. *Dummer* és munkatársai vizsgálatai alapján például a p53-at hordozó replikatív-defektív mutánsok alkalmazása metasztatikus melanomában illetve emlődaganatban meglehetősen ígéretesnek tűnik [24].

Az fentiektől eltérő stratégiával *Yin* és kollégái egy p84N5 jelű, úgynevezett haláldomént tartalmazó fehérje génjét hordozó rekombináns adenovírust hoztak létre. Megelőző vizsgálataik szerint a p84N5-öt expresszáló transzfektáns sejtek, egyéb külső, apoptózist indukáló stimulus hiányában is elpusztulnak apoptózisra jellemző módon. A p84N5 fehérje génjét hordozó vírussal, mint vektorral, ovarium és emlőtumor, valamint osteosarcoma eredetű sejtvonalakon végzett kísérleteik szerint a proliferáció mértéke szignifikánsan csökkenthető volt és a hatás apoptotikus sejtpusztulás útján érvényesült [25].

Hasonlóan a HSV variánsokhoz, az adeovírusok genetikai manipulálása során is erőfeszítések történtek szövetspecifikusan replikálódó formák létrehozására. Prostata, emlő és hepatocelluláris daganatokra specifikus adenovírusok előállítására érdekében a prostata specifikus antigén (PSA), az  $\alpha$ -foetoprotein (AFP), illetve az MUC-1 gének promoter és/vagy enhancer régióit egyaránt beépítették adenovírusokba [26-28]. Az így létrehozott mutánsok egy része – hasonlóan a már említett HSV-hez – szintén átesett, vagy jelenleg esik át klinikai teszteken. A HSV-hez hasonlóan, igen magas partikulum szám esetén sem tapasztaltak toxikus mellékhatásokat, jóllehet az alkalmazott vakcinák különféle módokon (közvetlenül a tumorszövetbe, vagy testüregekbe juttatva) is kipróbálásra kerültek [29-31]. A HSV-vel végzett vizsgálatokkal ellentétben – ahol a vírusok bejuttatását követő vírusreplikációra vonatkozóan nem állnak rendelkezésre megbízható adatok – az adenovírusokkal végzett eddigi vizsgálatok, egyes daganattípusok (pl.: colorectalis daganatok) kapcsán, az alkalmazott vírusok daganatsejtekben megfigyelt replikációjáról számolnak be. Az eddigi adatokból az is kiderül, hogy a folyamatos vírusterápia során – különösen a hosszantartó kezelések alatt – a betegek többségében neutralizáló ellenanyagok alakulnak ki. Ugyancsak jelentős emelkedés figyelhető meg egyes citokinek szérumszintjeiben is (interleukin-1 illetve 6 [IL-1, IL-6], tumor nekrozis faktor- $\alpha$  [TNF- $\alpha$ ], interferon- $\gamma$  [IFN- $\gamma$ ]). Egyelőre azonban nem világos, hogy ezek a változások milyen mértékben befolyásolják a kezelések kimenetelét. Az alapbetegség kezelését illetően az adatok biztatóak, különösen a kemoterápiás eszközökkel történő kombinációk ígéretesek, jóllehet a vírus- és kemoterápia között kialakuló szinergizmus molekuláris mechanizmusának pontos háttere egyelőre szintén ismeretlen.

### *Polio- és a vakcína vírusok*

Végül, a rekombináns mutánsokkal végzett kísérletek között érdemes röviden megemlíteni a polio- és a vakcína vírus átalakítására irányuló erőfeszítéseket is. A vakcína vírussal kapcsolatban komoly előny, hogy alkalmazhatóságának biztonsági korlátaira vonatkozóan, a himlő elleni védőoltások miatt, nagy mennyiségű adat áll rendelkezésre, valamint, a közel 200 kb nagyságú genom, mely nagyobb inszertek elhelyezését is lehetővé teszi.

További előnyt jelenthet a vakcína vírusok erős immunválaszt kiváltó képessége is, mellyel elméletileg fokozható lenne a beteg anti-tumor immunitásának hatékonysága. A kísérleti körülmények között onkolitikus terápiára felhasznált vakcína vírusok szinte mindegyike a vírus timidin kináz (tk) génjébe inszertált különböző transzgéneket tartalmaz, melyek az osztódó sejtek iránti szelektivitás növekedését hivatottak előidézni. Impresszív kísérleti eredményekről számolt be *Puhlmann* munkacsoportja, akik egy tk-deletált, luciferáz gént hordozó mutánst alkalmaztak különböző, részben humán tumorsejtekkel beoltott egerekben [32]. Az egyes szövetekben illetve a megtapadt tumorsejtekben mérhető luciferáz aktivitások alapján a vakcína vírus mutánsok szintén ígéretes tumorspecifikus vektoroknak tűnnek [32]. *Mastrangelo* és kollégái kísérleteik alapján a rekombináns vakcína vírusokat a direkt citolitikus hatás elérése mellett a daganatszövet elleni immunreakciók kiváltásában is alkalmazhatónak vélik. Beszámolójuk szerint egy, a granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor (GM-CSF) génjét hordozó rekombináns vakcína vírust felhasználva [33, 34], inoperábilis cutan melanomában szenvedő betegeken végzett I. fázisú klinikai próbákban a viszonylag nagy koncentrációban, subcutan illetve a tumorba injektálva alkalmazott vakcina jól tolerálható, a virális GM-CSF mRNS pedig hosszú időn át (31 hét) kimutatható volt. Bár a perifériás fehérvérsejt szám szignifikánsan ugyan nem emelkedett a betegeken, az alkalmazás helyén eozinofília volt megfigyelhető, jelezve a rekombináns citokin expresszióját és hatékonyságát. A szövettani eredmények ellenére ugyanakkor a bevont betegeknek csak egy része reagált a kezelésre, melynek hátterében nem kizárt, hogy a minden betegben kimutatható neutralizáló antitestek állnak. Elképzelhető tehát, hogy ebben az esetben épp a vakcína vírus erős antigenitása vezetett az alacsonyabb terápiás hatékonysághoz [35, 36]. A GM-CSF mellett néhány egyéb rekombináns vakcína vírus előállítására is megtörtént, így *Mukherjee* és kollégái az IL-2 [37], míg *McCart* és munkacsoportja az 5-fluorouracil (5-FU) előanyagából az aktív hatóanyag létrehozására képes citozin deamináz enzim génjét hordozó vakcína vírus előállításáról számoltak be [38]. A poliovírusok esetében a genetikai módosítás elsősorban a poliovírus egyszálú RNS genomjának 5' végén elhelyezkedő, nem átíródó, de a genom transzlációja szempontjából fontos területét érinti. Az exogén szekvenciák nagymértékben befolyásolhatják a poliovírus szövet-specifitását, miközben tumorszelektivitását megtartva csökkentik neurovirulenciáját [39]. Sajnos klinikai kipróbálásukról egyelőre kevés adat áll rendelkezésre.

Név	Vírus	Genetikai változtatás	Daganattípus	Klinikai kipróbálás fázisa [forrás]
ONYX-015	Adeno 2/5 kiméra	E1B55K deléció	Fej és nyak, máj, ovarium, pancreas	I, II, III [21, 40-42]
CV706	Adeno 5	E1A gén PSA promoter szabályozás alatt, E3 deléció	Prostata	I, II [43, 44]
CV787		E1A gén patkány probasin, E1B PSA promoter szabályozás alatt, wt E3	Prostata (metasztázis is)	I, II [45]
G207	HSV-1	<i>lacZ</i> inszerció az ICP6 génben $\gamma_134.5$ deléció	Melanoma	Preklinikai [46-51]
Vakcína GM-CSF	Vakcína	GM-CSF és <i>lacZ</i> inszerció a tk lókuszbán	Melanoma	I, II [52, 53]

1. táblázat Genetikailag módosított onkolitikus vírusok.

## Daganatsejtek iránti természetes affinitással rendelkező vírusok

### Reovírus

A genetikai módosításokon átesett vírusok mellett létezik a terápiás lehetőségeket magukban rejtő vírusoknak egy másik csoportja is, melyek esetében nem beszélhetünk az onkolitikus hatás elérése érdekében tervezett genetikai változtatásokról. E vírusok tumorspecifikus viselkedése egyfajta "belső" tulajdonság, melynek háttere jórészt tisztázatlan. E vírusok között számos törzset tartanak számon a reovírus család tagjaitól kezdve a parvovírusokon át a paramyxovírusokig. A természetesen is humán patogénektől – mint pl.: a mumpsz vírusa – eltekintve, közös jellemzőjük, hogy a fertőződés embereken vagy tünetmentes, vagy enyhe lefolyású megbetegedés formájában zajlik. Az egyik legígéretesebb képviselője e vírusoknak a reovírus (RV). A RV egy ubiquiter előforduló, külső boríték nélküli, kettősszálú RNS genommal és minimális humán patogenitással rendelkező vírus. Az emberi fertőzés általában enyhe légúti vagy gastrointestinalis tünetek mellett zajlik. Bár a RV transzformált humán sejtek iránti affinitása régről ismert [54, 55], a tumorspecifikus hatás és a transzformált gazdasejtek IFN jelátviteli rendszerének egyes elemei közötti kapcsolatot csak az elmúlt években sikerült kimutatni. A RV-sal végzett kísérletek szerint, konstitutívan aktív epidermális növekedési faktor receptorral (EGFR) [56] vagy hasonló Ras fehérjével transzformált NIH3T3 egér fibroblasztok különösen fogékonyak a RV-sal történő fertőzésre, annak ellenére, hogy a vad típusú NIH3T3 sejtek nem fertőzhetők RV-sal [57, 58].

Egészséges sejtekben a protein kináz R (PKR), az antivirális védekezés központi elemeként, kettősszálú virális RNS-intermedierek megjelenésekor – a transláció egyik iniciációs faktorának (eIF2 $\alpha$ ) foszforilálásával – jelentősen módosítja a fertőzött sejt translációs mintázatát, a sejt pusztulását idézve elő. A transzformált sejtekben az aktivált Ras hatására a PKR konstitutívan gátolt, így a reovírusok szaporodásának kedvező intracelluláris körülmények jöhetnek létre. A megfigyelésnek az a tény ad különös hangsúlyt, hogy a humán daganatok közel 30%-ában épp a Ras vagy jelátviteli rendszereinek valamely eleme mutált. Minthogy a RV egészséges emberi szövetekben nem vagy csak alig szaporodik és a fertőzés több vizsgálat alapján is jellemzően aszimptomatikus, a RV onkolitikus hatásának a terápiában történő felhasználása igencsak kecsegtető lehetőségnek tűnik, hasonlóan a paramyxovírusok családjába tartozó Newcastle betegség vírushoz (NBV), mely szintén korán felkeltette a kutatók érdeklődését.

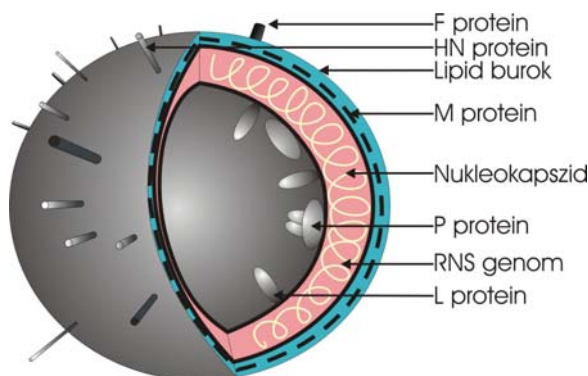
## **A NEWCASTLE BETEGSÉG VÍRUS**

A NBV, mely a Mononegavirales rend tagjaként ismert Paramyxovírusok családjába tartozik, habár nem humán patogén, közeli rokona a humán parainfluenza, illetve mumpsz vírusnak [59] (2. táblázat). A Rubula genusba sorolt NBV-k meglehetősen nagyfokú pleomorfitást mutatnak. A többnyire szférikus jellegű partikulumok 150-500 nm közötti átmérőjűek, de elektronmikroszkópos felvételeken gyakran láthatók filamentózus alakok, melyek jellemzően 100 nm átmérő mellett, változó hosszúságúak. A virionok - bár nem olyan kifejezetten, mint az influenza vírusok - számos felszíni molekulával rendelkeznek (1. ábra). A legáltalánosabbak az úgynevezett "tüskék", melyek 8-20 nm hosszú, egymástól 6-10 nm távolságra elhelyezkedő glikoproteinek. A jellemzően haemagglutinin-neuraminidázként (HN), illetve fúziós (F) fehérjeként azonosított "tüskék" közül az utóbbi fehérje hozható kapcsolatba a fertőzés kapcsán kialakuló sejtfúzióért, valamint hemolízisért, a fertőzés kezdetekor ugyanis e fehérjék segítik a vírus lipidburkolatának és a gazdasejt sejthártyájának összeolvadását. A HN fehérjék pontos szerepe nem tisztázott, jelenlétük azonban képessé teszi a virionokat a vörösvértestek (vvt) agglutinálására, nemcsak természetes gazdáik, hanem – pl.: NBV esetén – akár emberi vvt-k esetében is

<b>Paramyxoviridae</b>	
<p><b>Subfamilia Paramyxovirinae</b></p> <p><i>I. Genus Paramyxovirus</i></p> <p>humán parainfluenza vírus (1, 3 típusa) szarvasmarha parainfluenza vírus (3 típus) Sendai vírus (rágcsáló parainfluenza vírus 1 típusa) majom parainfluenza vírus (10 típus)</p> <p><i>II. Genus Morbillivirus</i></p> <p>kanyaró (Edmonston) vírus (humán) kutya szopornyica vírus delfin szopornyica vírus peste-des-petits-ruminants vírus fóka szopornyica vírus rinderpest vírus</p> <p><i>III. Genus Rubulavirus</i></p> <p>mumpsz vírus (humán) humán parainfluenza vírus (2, 4a, 4b típus)</p> <p><b>Newcastle betegség vírus (madár paramyxovírus 1)</b></p> <p>madár paramyxovírus (2-9 típus) disznó rubula vírus (La-Piedad-Michoacan-Mexico vírus) majom parainfluenza vírus (5, 41 típus)</p>	<p><b>Subfamilia Pneumovirinae</b></p> <p><i>I. Genus Pneumovirus</i></p> <p>humán respiratorikus syncytialis vírus szarvasmarha respiratorikus syncytialis vírus egér pneumonia vírus pulyka rhinotracheitis vírus</p> <p><i>A család egyéb, még nem besorolt tagjai</i></p> <p>Fer-de-Lance vírus (FDLV), Mapuera vírus (MPRV), Nariva vírus (NARV),</p>

2. táblázat A *Paramyxoviridae* család tagjai. (van Regenmortel et al., *The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 2000. alapján)

A HN fehérjék pontos szerepe nem tisztázott, jelenlétük azonban képessé teszi a virionokat a vörösvértetek (vvt) agglutinálására, nemcsak természetes gazdáik, hanem – pl.: NBV esetén – akár emberi vvt-k esetében is. A paramyxovírusok mindegyikében ugyancsak jelen lévő neuraminidáz aktivitás (mukopoliszacharid N-acetil neuraminil hidroláz) pedig valószínűleg alapvető a gazdasejt felszíni receptorainak eltávolításában. Feltehetőleg ez a mechanizmus akadályozza meg, hogy az újonnan képződött vírusrészecskék újra az eredetileg fertőzött

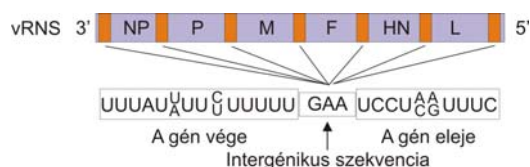


1. ábra A *Paramyxoviridae* család tagjainak általános szerkezete. (A szerző ábrája van Regenmortel et al., *The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 2000. alapján.)

gazdasejt felszínéhez tapadjanak. A virionokon belül további, legalább 3 különböző protein található (1. ábra). A mátrix fehérje (M) a virion lipidborítékának belső felszínén található, valószínűleg strukturális szereppel, míg az úgynevezett nukleoprotein (NP) a virion kapszidjának fő felépítője, de különösen fontos szerepet kap a virális replikáció és transzkripció irányításában (lásd később).

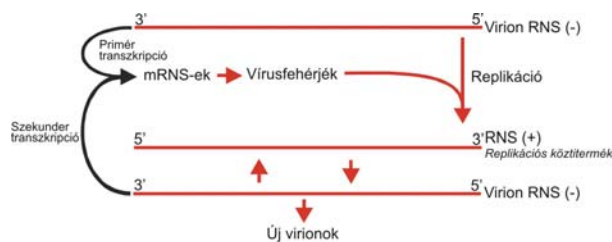
A NBV esetében ez a fehérje teljes egészében körbeveszi a vírusgenomot. Ugyancsak a nukleokapszidban található néhány kópia az L (large protein), illetve P (phosphoprotein) proteinekből, melyek együttesen alkotják a "virális-RNS-függő RNS polimerázt". Egyes paramyxovírusokra jellemző, hogy a P fehérje génjében található, úgynevezett átfedő "open reading frame"-ek átírásával további fehérjék expressziója is lehetséges (pl. a Sendai vírus "C" és "V" proteinjei). A NBV esetében a P gén transzkriptumának "átszabása" egy újabb, úgynevezett "V" fehérje transzlációjához vezet. Érdekes módon a P gén transzkriptumának ilyen típusú módosítása csak a virális polimeráz-komplex belső sajátossága, tehát nagymértékben függ a P és L fehérjék jelenlététől. A nukleokapszid általában 13-18 nm átmérőjű, gyakran mutat helikális szimmetriát. Magassága 5,5-7 nm közötti, filamentumai 600-800 nm hosszúak.

A virionok nukleinsav tartalma általában összetételük mintegy 5%-a, amely egy darab, lineáris, nem szegmentált, jellemzően negatív – mint pl. a NBV esetében is – ritkábban pozitív, egyszálú ribonukleinsav (RNS). A genom teljes nagysága 15-20 kb között mozog – a NBV esetében 15156-15186 nukleotid – melyben a kódoló szakaszokat rövid repetitív



2. ábra A Paramyxovírusok genomjának általános felépítése. (A szerző ábrája van Regenmortel et al., The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2000. alapján.)

szekvenciák választják el egymástól. Az egyes gének végén poliadenilációs szignál található (2. ábra). A génexpresszió, a génsorrend és a replikáció nagy fokban konzervált és igen nagy hasonlóságot mutat az ugyancsak a Mononegavirales rendbe tartozó Rhabdo- illetve Filovírusokkal. A replikáció eseményei a gazdasejt citoplazmájában játszódnak le (3. ábra). A folyamat során nagy mennyiségben jelennek meg a citoplazmában nukleokapszid fehérjék, melyek a fertőzött sejt citoplazmájában apró testecskéket formálhatnak, míg a szintén nagy mennyiségben megjelenő fúziós fehérjék – a paramyxovírusok okozta fertőzésekre igen jellemző – syntitiumokat hozhatnak létre. A replikáció korai fázisában a vírus negatív értelmű, egyszálú RNS molekulájáról egy rövid, nem transzlálódó "leader" RNS és hat, monocisztronos, szubgenomiális mRNS szintetizálódik, melyek transzlációja eredményezi a már említett vírusfehérjék citoplazmatikus megjelenését.



**3. ábra A Paramyxoviridae család tagjainak szaporodása.** (A szerző ábrája van Regenmortel et al., The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2000. alapján.)

A kódoló mRNS-ek a virális genomban található, meglehetősen konzervált szekvenciájú cisz-hatású start illetve stop szekvenciák segítségével (2. ábra), a genom diszkontinuos transzkripciója során jönnek létre. A fertőzés késői szakaszában megfelelő mennyiségű vírusfehérje jelenléte esetén a translációs folyamatok leállnak, és újra előtérbe kerülnek a replikációs folyamatok. A transláció és a replikáció közti váltás az újonnan szintetizált nukleoproteinek közvetítésével történik. A nukleoproteinek a polimeráz komplexszel együtt a naszcenz "leader" RNS-hez kötődnek, megindítva annak további szintézisét. A képződő replikatív intermedier RNS molekula újbóli translációját az ahhoz, a lánc növekedésével azonos ütemben, szekvenciálisan kapcsolódó nukleoproteinek akadályozzák meg. A szintézis végére létrejön egy pozitív, "anti-genomiális" RNS molekula (3. ábra – replikációs köztitermék), melyről további, az eredeti vírusgenom kezdeti átírásával ellentétben most már kontinuos transzkripciók ismétlődésével jönnek létre az új virionok negatív értelmű, "genomiális" RNS molekulái (3. ábra). A paramyxovírusok egyes tagjainak replikációja – köztük a NBV szaporodása is – nagyfokban függ a replikálódó genom méretétől. A vonatkozó vizsgálatok szerint effektív replikáció csak akkor megy végbe, ha a genom mérete 6 nukleotidnyi szakasz egész számú többszöröse [60]. A szakirodalomban "6-os szabály"-nak nevezett jelenség mögött, feltételezések szerint, a replikáció során köztiterméként megjelenő pozitív RNS 3' végén elhelyezkedő felismerési helyek és a nukleoproteinek pontos illeszkedése húzódik meg. A replikáció során a nukleoproteinek az 5' végtől kezdődően kapcsolódnak a pozitív RNS szálhoz. Az egyes nukleoproteinek 6 nukleotidonként foglalnak helyet a nukleinsav molekulán, így az utolsó, a 3' végen elhelyezkedő nukleoprotein pontos illeszkedése csak a genom megfelelő hossza esetén lehetséges. A fehérje-RNS komplex 3' végi pontos kapcsolódása pedig a megfigyelések szerint kulcsfontosságú a replikatív intermedier hatásossága szempontjából [61]. A vírusreplikáció következő szakaszában a létrejött vírusfehérjék beépülnek a plazmamembránba, majd az újonnan létrejött nukleokapszid-fehérjék az így módosított sejthártyához kapcsolódnak.



Az új partikulummá egyesült komponensek a módosult citoplazmamembrán egy darabjából képzett burokkal körülvéve lefűződnek a gazdasejtről. Az így létrejövő lipidburkolat a virionok összetételének 20-25%-át is elérheti, kialakítva az átlagosan mintegy  $5 \times 10^8$  D molekulasúlyú részecskét.

Jóllehet a természetes fertőzések kapcsán kialakuló kórformák elnevezése meglehetősen színes, a NBV a csirkepestis néven ismert, madarakban súlyos enterális fertőzéssel járó, megbetegedés kórokozója. Mint onkolitikus ágens, a NBV a paramyxovírusok családjába tartozó egyéb onkolitikus hatású vírusokkal szemben – mint például a mumpsz vírusa – több pozitív tulajdonsággal is büszkélkedhet. Ismereteink szerint meglehetősen stabil szerkezetű, embereket megbetegítő tulajdonsága nincs, a madarakkal foglalkozó farmereken, illetve a vírussal foglalkozó laboratóriumi személyzetén végzett megfigyelések szerint a vírusfertőzés egészséges személyeken nem, vagy csak minimális megbetegedést, főleg könnyebb conjunctivitist illetve laryngitist okoz. Klinikai tanulmányok szerint hatékonyak bizonyult több előrehaladott, terápiarezisztens emberi daganattípus kezelésében (pl. egyes glioblastomák, fej-nyaki és colorectalis daganatok, valamint melanomák esetén) [10, 62-71].

#### *Onkolitikus Newcastle betegség vírus variánsok*

Bár a NBV egyes onkoterápiás célra már alkalmazott formái - mint a PV701 vagy az MTH-68/H – onkolitikus hatásereőségük alapján szelektált variánsok, széles körű felhasználásuk, mint hatékony terápiás eszköz - hasonlóan a korábbiakban említett vírusterápiás ágensekhez - jelenleg még várat magára. Ennek hátterében több ismeretlen, vagy bizonytalan tényező áll. A NBV egyes variánsai kapcsán például nem ismert a fokozott onkolitikus hatás hátterében álló mutáció molekuláris mechanizmusa. Ennek következtében - jóllehet eddigi adatok szerint a NBV és variánsai csak rendkívül enyhe lefolyású emberi megbetegedések kiváltására képesek - nem ismert a valószínűsége azon mutációknak sem, melyek egy virulensebb, esetleg súlyos humán megbetegedést (is) előidéző vírust hozhatnának létre. Nem rendelkezünk továbbá olyan antivirális készítménnyel sem, amellyel sikeresen fel lehetne venni a harcot egy, az embereket is megbetegíteni képes NBV ellen.

A PV701 jelű NBV variánssal végzett 1-es fázisú klinikai vizsgálatban a bevont mintegy 80, előrehaladott tumoroktól szenvedő beteg esetében eltérő eredményeket sikerült elérni. A láztól és nátha-szerű tünetektől eltekintve, a betegek egyikénél sem jelentkeztek komolyabb mellékhatások a kezelés során. A kezelésben részt vett betegek mintegy harmada reagált a PV701-re pozitívan, ugyanakkor többségükben a kezelés során PV701-ellenes antitestek jelentek meg [72].

A „pilot-study”-kban már ugyancsak kipróbált, **MTH-68/H** jelzésű vírusvakcina a NBV Hertfordshire-i, úgynevezett Herts’33 típusából származtatott, attenuált, mezogén vírusvariáns. A Herts’33 vonalat elsőként az 1930-as években írták le Angliában [73], amelyből számos passzázst követően izolálták a később fokozott onkolitikus aktivitást mutató és általunk is felhasznált MTH-68/H formát. Az elmúlt években több országban – köztük hazánkban is – klinikai vizsgálatoknak alávetett készítmény számos – jellemzően szolid – daganattípusban is hatékonynak bizonyult. Egy, a közelmúltban megjelent közlemény alapján az MTH-68/H-ról elmondható, hogy hosszú idejű, több éves kezelésre is alkalmas, a betegek által jól tolerálható, relatíve magas onkolitikus aktivitású készítmény. A beszámoló szerint végstádiumú, a konvencionális terápiákra nem reagáló glioblastomákban szenvedő betegek esetében igen impresszív eredményeket sikerült elérni, az e betegcsoportban tapasztalt néhány hónapost messze meghaladó, több éves túlélést biztosítva [71].

Annak ellenére, hogy az onkolitikus NBV-variánsok klinikai megfigyeléseken alapuló irodalma meglehetősen gazdag [10, 62, 66, 70, 71], a NBV kiváltotta kedvező onkológiai hatás mechanizmusáról sem rendelkezünk pontos információkkal. Bár a NBV saját gazdaszervezetei egyes sejtjeiben apoptózist képes előidézni, nem bizonyított, hogy az onkolitikus hatásért humán szövetekben is hasonló folyamatok lennének a felelősek. Továbbra is kérdés, hogy milyen kapcsolat áll fenn a NBV és az egyébként gazdasejtjeiként nem számon tartott humán tumorsejtek között, illetve, hogy mire vezethető vissza e vírusok daganatsejtek iránti fokozott affinitása.

Vírus	Előny	Hátrány	Vektor (kb)	Inszert (kb)
Adenovírus	Osztódó és nem osztódó sejteket egyaránt fertőz Hatékony géntranszfer Nagy vírusítterek alkalmazhatóak Nem toxikus Antigenitása immunválaszt vált ki	Antigenitása immunválaszt vált ki Kisméretű inszertet hordozhat	36	7,5
HSV-1	Osztódó és nem osztódó sejteket egyaránt fertőz Elhúzódó génespresszió lehetősége Nagy transzgén kapacitás Gancyclovir/acyclovir érzékenység Nagy vírusítterek alkalmazhatóak Antigenitása immunválaszt vált ki	Antigenitása immunválaszt vált ki Herpes encephalitis lehetősége	152	40-50
Vakcína	Hatékony géntranszfer és expresszió Tranziens géntranszfer Nagy transzgén kapacitás Antigenitása immunválaszt vált ki	Antigenitása immunválaszt vált ki Biztonsági aggályok	187	25
Reovírus	Enyhe humán patogenitás Jelentős immunválasz Nem transzformált sejteket nem képes fertőzni	Csak aktivált ras jelátviteli úttal rendelkező sejteket fertőz	RNS	?
NBV	<b>Nem humán patogén</b> <b>Nincs permanens fertőzés</b> <b>Nagy potenciál</b>	<b>Transzgén nem bevihető</b> <b>Tisztázatlan onkolitikus mechanizmus</b>	RNS	?

3. táblázat A klinikailag releváns onkolitikus vírusok főbb jellemzői.

## KÉRDÉSFELVETÉS, CÉLKITŰZÉSEINK

### 1. Befolyásolja-e a NBV fertőzés a sejtek proliferációját szövettanyszerzési körülmények között? Igazolható-e a NBV fertőzés proliferáció-gátló hatása?

A NBV-sal kapcsolatban korábban megjelent tanulmányok elsősorban klinikai próbák összefoglalói. A részt vevő betegek általában már más, konvencionális antitumor terápiát/terápiákat követően vettek részt a vizsgálatokban, így nem lehet egyértelmű kapcsolatot kimutatni a betegek állapotában bekövetkező változás és az alkalmazott vírusterápia között. A klinikai vizsgálatok során nehéz a standardizált körülmények kialakítása és fenntartása, hiszen e vizsgálatokban leggyakrabban végstádiumú, multidrog-rezisztens betegek kerülnek kezelésre, eltérő kórelőzménnyel és genetikai variációkkal. A kérdés standardizált, *in vitro* rendszerekben végzett vizsgálatára vonatkozóan viszont csak elenyésző számú közlemény áll rendelkezésünkre többnyire a NBV állategészségügyi vonatkozásai és nem a humán egészségügyi felhasználás céljából végzett kísérletekből származnak. Kísérleti programunk elsődleges célja volt *in vitro* környezetben modellezni, bemutatni és jellemezni a NBV *in vivo* tapasztalt onkolitikus hatását.

## **2. Kimutatható-e eltérő hatás daganatosan transzformált illetve daganatos jellegűnek kevésbé tekinthető sejtkultúrák fertőzésekor?**

A közelmúltig elvégzett, illetve folyamatban lévő humán vírusterápiás próbálkozásokról készült beszámolók és közlemények alapján még ma sem egyértelmű, hogy az alkalmazott infektív ágensek az egészséges szövetekre milyen mértékű és minőségű, rövid- és/vagy hosszútávú hatást fejtettek ki. Az ilyen információk hiánya részben érthető is, hiszen a klinikai próbák egyrészt elsősorban az onkolízis hatásfokának megállapítására koncentrálnak, másrészt a betegek nagyságrendekkel nagyobb számú nem transzformált sejtjében zajló akár komolyabb terápia-indukált reakciók is rejtve maradhatnak. Az *in vivo* kezelések tapasztalatai szerint a NBV-hoz hasonló, onkolitikus hatású vírusok magasabb dózisban illetve hosszabb távon, akár éveken át is jól tolerálhatók a betegek részéről. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy az onkolitikus vírusok feltehetően nem fertőznek egészséges sejteket.

## **3. Az egyes daganattípusok között felfedezhetők-e érzékenységbeli eltérések? . Mely típusok fogékonyabbak és melyek rezisztensebbek?**

Az egyes általános célra fejlesztett, vagy saját onkolitikus hatással bíró vírusokkal (így a NBV-sal) végzett klinikai vizsgálatok gyakori konklúziója, hogy az adott vakcina bizonyos típusú daganatokban nagyobb hatásfokú, mint más tumorokban. Néhány onkolitikus ágens esetében – mint pl.: a reovírus kapcsán – sikerült az egyes daganattípusok érzékenységét meghatározó molekuláris szintű kapcsolatot találni. Jóllehet a NBV-sal végzett klinikai vizsgálatok elsősorban szolid daganatok (pl.: glioblastomák) kapcsán számolnak be figyelemre méltó eredményekről, az egyes onkoterápiás célra használni tervezett NBV variánsok esetében mind a potenciálisan érzékeny daganattípusok köre, mind az érzékeny tumorsejtek és a NBV kapcsolata tisztázatlan.

## **5. Milyen folyamatok lehetnek felelősek a citotoxicitásért?**

A végső kérdés bármely onkolitikus infektív ágens esetében a hatásmechanizmus.

A vírusterápiás ágens jelenlétét követi-e immunválasz, és ha igen, milyen mértékben támaszkodik az onkolitikus folyamat az immunválaszra? A fertőzés során mely intracelluláris folyamatok vezetnek a daganatos szövet sejteinek pusztulásához? Zajlik-e hagyományos értelemben vett fertőzés, újonnan szintetizált, további onkolízisre képes partikulumokat létrehozva?

### *Kísérleti megközelítés*

Kísérleteinket egy klinikai próbákban már alkalmazott NBV variánssal, az MTH-68/H onkoterápiás készítménnyel hajtottuk végre. Vizsgálatainkat a hazai és a nemzetközi tudományos közösség által egyaránt elfogadott *in vitro* szövettényészeti modellrendszereket és molekuláris biológiai eljárásokat felhasználva végeztük. Biokémiai jellegű vizsgálataink során „kiindulási” modellrendszerként több alkalommal támaszkodtunk a PC12 patkány phaeochromocytoma sejtvonalra. E sejtvonal egyes szignalizációs folyamatainak főbb komponensei jól definiáltak, morfológiai változásai könnyen megfigyelhetők és értékelhetők. Vizsgálatainkat több alkalommal, egymástól független kísérletek formájában végeztük el, míg a külső laboratóriumokban, kooperáció keretében végzett mérések során az általunk előkészített minták analízise vakon, kizárólag kódszámok alapján történt.

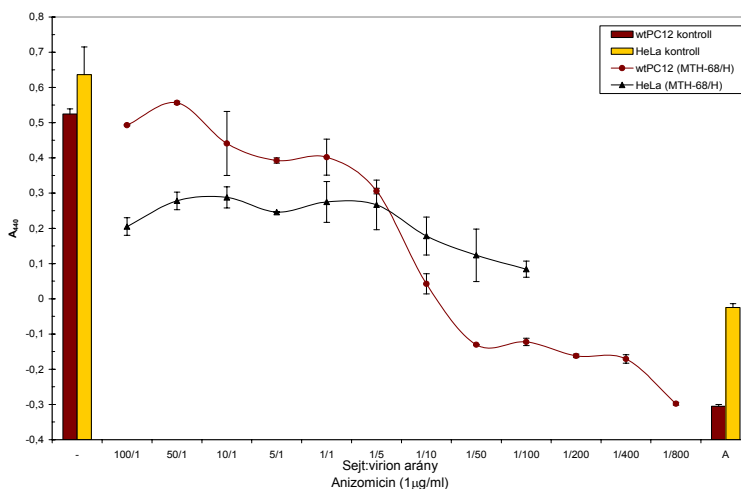
Bár az MTH-68/H fertőzés molekuláris szintű folyamatait igyekeztünk egységes modellrendszerben nyomon követni, a rendelkezésünkre álló antitestek fajspecifikussága ezt nem minden esetben tette lehetővé (pl.: a kaszpáz-8 aktivációjára irányuló kísérleteinkben). Így eredményeink bemutatásánál természetesen megjelöltem azt a modellrendszert is, amelyben az adott vizsgálati eredményt észleltük. Az MTH-68/H hatékonyságára irányuló kísérleteinkhez alapvetően humán, kisebb részben más emlős – egér, patkány – eredetű szövettényészeti rendszereket alkalmaztunk, melyek közül a humán vonalak részletesebb összefoglalását a 4. táblázat, míg az elvégzett kísérletek részleteit és eredményeit a következő fejezet tartalmazza.

Sejtípus	Szöveti eredet	p53 státusz [forrás]	Genotípus <sup>2</sup>
Primér fibroblaszt	Humán	NA <sup>1</sup>	Diploid
NIH3T3	Egér embrionális fibroblaszt	NA <sup>1</sup>	Diploid
Rat-1	Patkány embrionális fibroblaszt	NA <sup>1</sup>	Diploid
HT-25	Humán colon carcinoma	NA <sup>1</sup>	Diploid
HT-29	Humán colorectális adenocarcinoma	CGT/CAT mutáció a p53 gén 273 kodonjában [74] Fokozottan termelt p53 antigén	Hypertriploid c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, Myb, sis, fos +; N-myc, abl, ros, src -; CEA+ TGFβBP +
HCT-116	Humán colon carcinoma	wtp53+/+ [75]	Diploid „közeli”; mutáció a ras gén 13. kodonjában; Keratin + TGFβ 1/2 +
DU-145	Humán prostata adenocarcinoma agyi metasztázisa	Mindkét allél mutált: Pro <sup>223</sup> Leu és Val <sup>274</sup> Phe [76]	Hypotriploid
PC-3	Humán prostata adenocarcinoma csont-metasztázisa	Az egyik p53 allél deletált; Frame shift-et okozó pont mutáció a 138-as kodonban, amely korai terminációhoz vezet [76]	Hypotriploid
PANC-1	Humán ductális epithelioid pancreas carcinoma	CGT/CAT mutáció a p53 gén 273 kodonjában [77]	GGT/GAT mutáció a K-ras gén 12. kodonjában p16 gén metilált Hypertriploid
MCF-7	Humán breast adenocarcinoma	wtp53+/+ [78]	N-ras amplifikáció [79] Tx-4 onkogénre + Ösztrogén receptor + Ösztrogén dependens Kaspáz 3 -
HeLa	Humán cervix adenocarcinoma	HPV16 E6+; alacsony p53 expresszió [80]	Keratin+
NCI-H460	Humán nagysejtes tüdő carcinoma pleurális metasztázisa	Emelkedett p53 mRNS expresszió. <sup>2</sup>	Hypotriploid Keratin + Vimentin +
U373	Humán astrocytoma	CGT/CAT mutáció a p53 gén 273 kodonjában [81]	Diploid/hypotriploid; TNFα +; Substance P rec. +; HSP28 +
LNZTA3WT4	Humán glioblastoma	Az endogén p53 kromoszóma-átrendeződés következtében inaktivált. A sejtvonal stabil transzfektánsa egy CMV promoter és tetraciklin represszor vezérelt wtp53 cDNS-nek. <sup>2</sup>	
A431	Humán epidermoid carcinoma	CGT/CAT mutáció a 273 kodonban [82]	Hypertriploid
HT-168-M1/9	Humán melanoma	NA <sup>1</sup>	NA <sup>1</sup>
WM983B	Humán melanoma	NA <sup>1</sup>	NA <sup>1</sup>
HT199	Humán melanoma	NA <sup>1</sup>	NA <sup>1</sup>

4. táblázat Az alkalmazott sejtvonalak fontosabb tulajdonságai. <sup>1</sup>NA: Nincs adat; <sup>2</sup>Az American Tissue Culture Collection adatai, valamint a feltüntetett publikációk alapján. Az egyes sejtvonalak tenyésztési körülményei az Alkalmazott anyagok és módszerek c. fejezetben (57. oldal) találhatóak.

## EREDMÉNYEK

Kísérleteinkben vad típusú PC12 (wtPC12) kultúrákat fertőztünk különböző sejt:virion arányok felhasználásával. Úgy tűnt, e sejtvonal alkalmazásával választ kaphatunk mind az MTH-68/H vakcina fajspecifikitására, mind az esetleges citotoxikus hatás jelenlétére. A citotoxicitási vizsgálatok során a fertőzést 72 órás inkubáció követte, mely alatt biztosítottuk



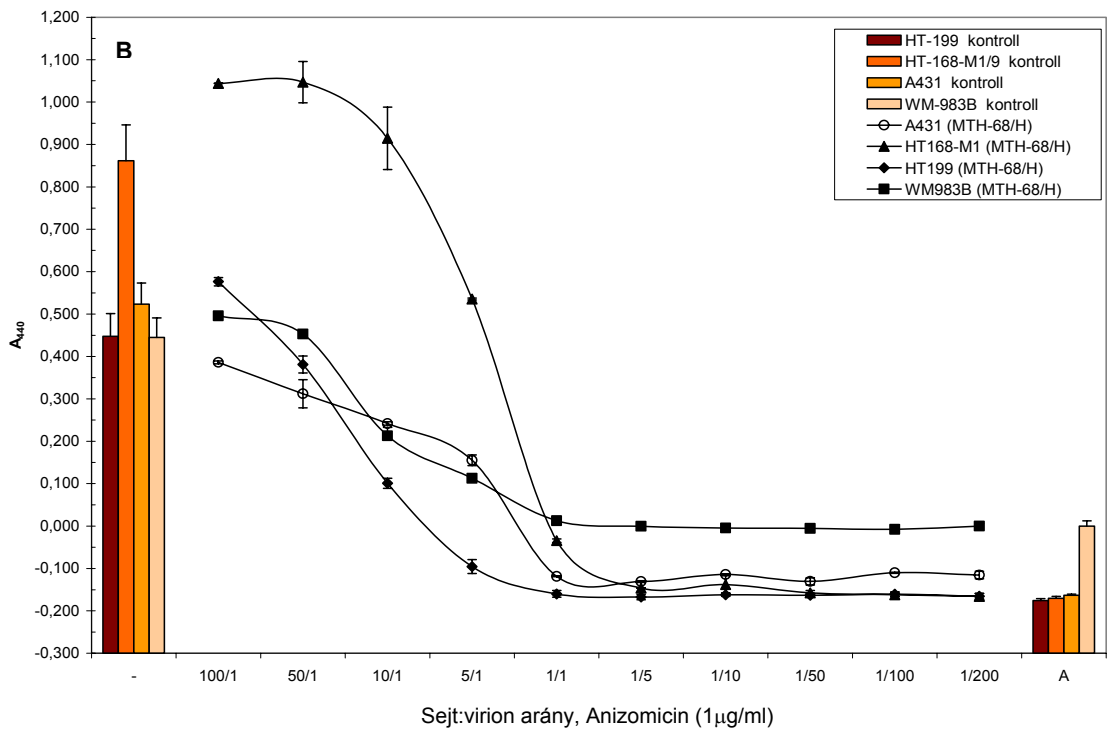
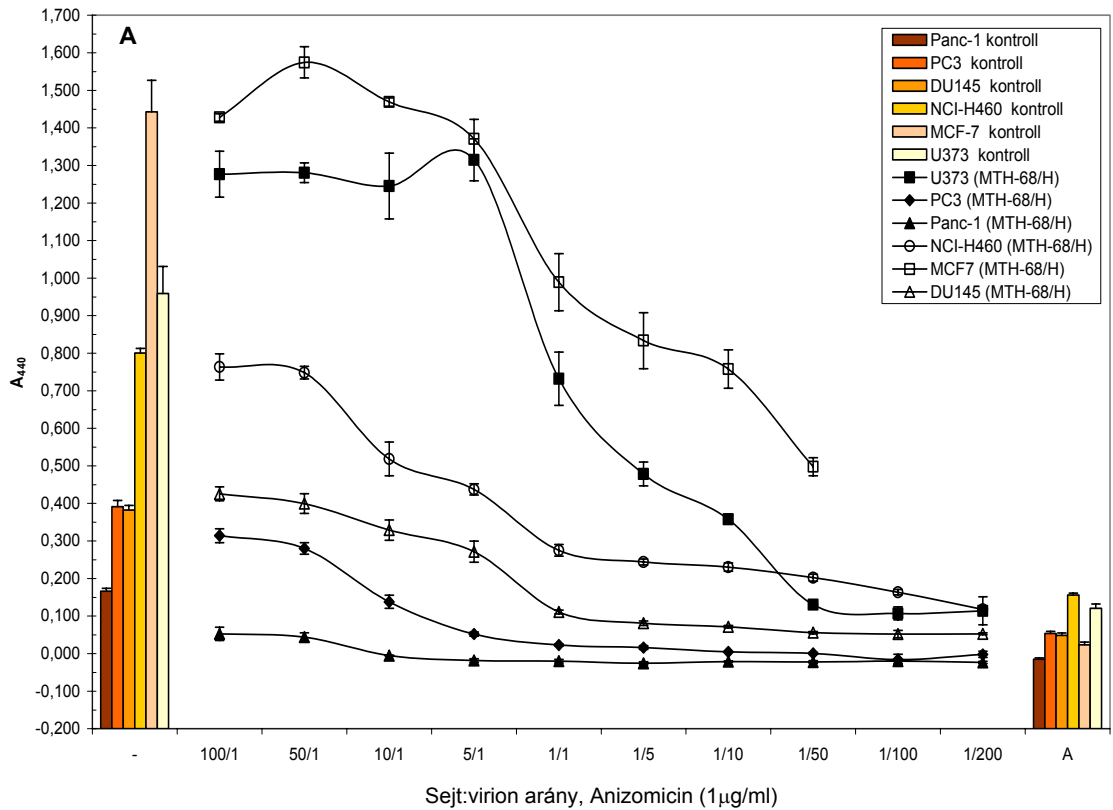
4. ábra PC12 patkány phaeochromocytoma és HeLa humán cervix karcinóma sejtvonalak viabilitása. MTH-68/H fertőzést követően. A „A” jelzésű oszlopdiaagrammok a kezeletlen sejtek 72 órás tenyésztését követően mérhető mitokondriális oxido-reduktáz aktivitását mutatja. A nagy dózisú anizomicinnel kezelt sejtek - "A" jelzéssel - pozitív kontrollként szolgálnak.

a sejtek túléléséhez és proliferációjához szükséges körülményeket. Az inkubáció alatt további virionokat nem juttattunk a rendszerbe. Az inkubációt követően WST-1 kolorimetriás módszerrel mértük az egyes minták mitokondriális oxido-reduktáz rendszereinek aktivitását, mely előkísérleteink szerint  $10^4$ - $10^5$  közötti induló sejtszám esetén jól korrelál az egyes mintákban jelen lévő élő sejtek számával. A fertőzés 72 óra alatt a teljes sejtenyészet pusztulását idézi elő. A citotoxikus hatás dózisfüggőnek bizonyult; 72 órás fertőzés során az 50%-os sejtpusztulás 1:5-1:10 titernél következik be. 1:800-as titer esetében a totális fehérje-szintézis gátlást előidéző nagy dózisú anizomicin kezeléssel azonos mértékű sejtpusztulás mérhető (4. ábra). Habár a NBV és a patkány eredetű sejtek közötti kapcsolatra nincs korábbi irodalmi adat, PC12 sejtek esetében sikerült kimutatnunk, hogy a vírus nem természetes gazdasejtek esetében is képes hatást gyakorolni a célsejtekre ellenőrizhető *in vitro* körülmények között. Ugyanakkor, a PC12 tenyészetekkel végzett méréseinkből mégsem vonhattunk le az irodalomban fellelhető klinikai megfigyeléseket alátámasztó vagy cáfoló következtetéseket, a célsejtek eltérő rendszertani jellemzői miatt. A PC12 sejtekkel végzett mérések eredményei nem szolgálhattak egyértelmű bizonyítékkal a NBV és a humán sejtek lehetséges kapcsolatát illetően.

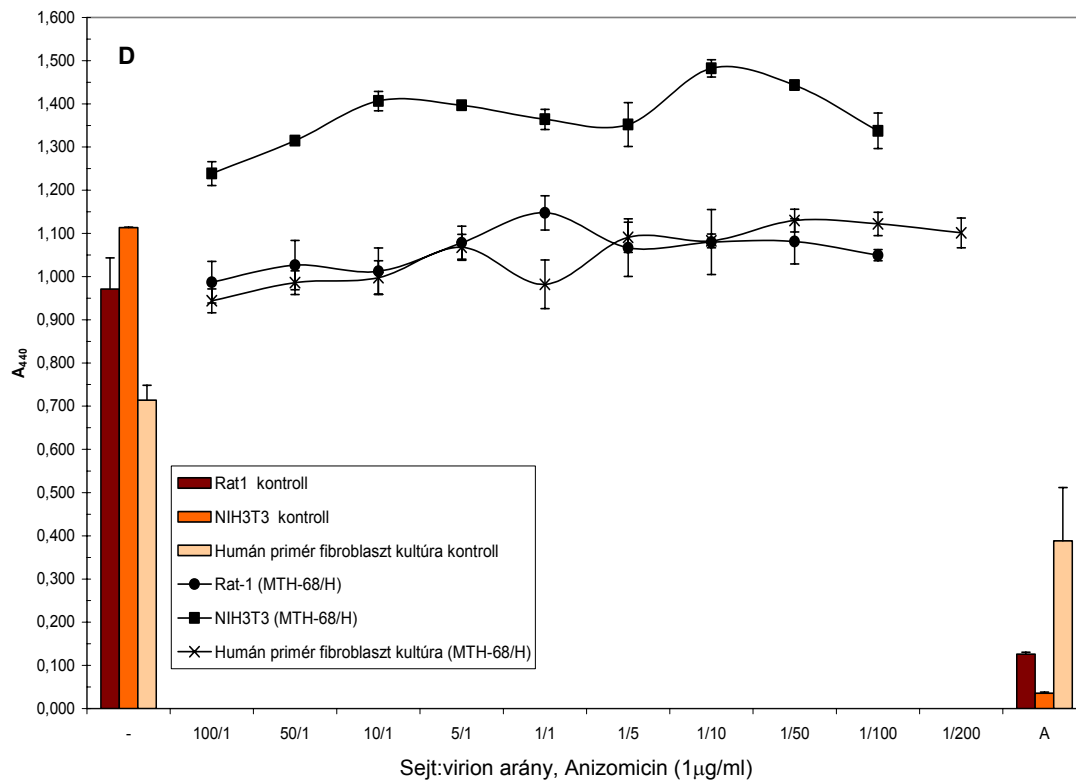
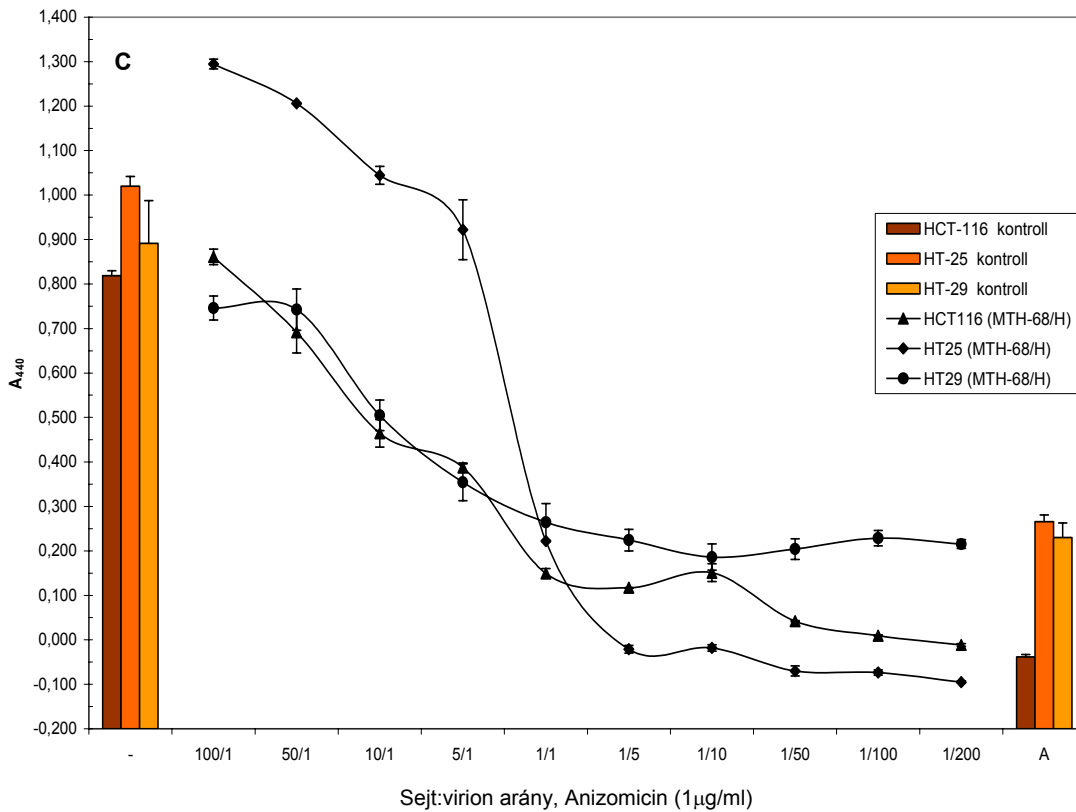
A kérdés tisztázása érdekében, hasonló körülmények, között HeLa humán cervix carcinoma sejtek proliferációs aktivitását is megvizsgáltuk MTH-68/H fertőzést követően. A NBV fertőzés drámai hatásúnak bizonyult HeLa sejtek esetén. A legkisebb általunk megvizsgált sejt:virion arány alkalmazásakor is közel maximális mértékű sejtpusztulást tapasztaltunk a fertőzést követő 72 óra alatt (4. ábra). Az MTH-68/H riasztó mértékű citopátiás hatását tapasztalva citotoxicitási méréseinket kiterjesztettük néhány további tumorosan transzformált humán eredetű sejtvonalra is. A felhasznált sejtípusok fontosabb jellemzőit a 4. táblázatban foglaltam össze (21. oldal). Az 5. ábra B paneljén melanoma, C paneljén colorectalis, míg A paneljén további, egymástól eltérő szöveti eredetű humán daganatos sejtvonalak 72 órás MTH-68/H fertőzést követően mérhető proliferációs aktivitása látható.

A vizsgált tumorsejtvonalak mindegyike fogékonynak bizonyult a fertőzéssel szemben, jóllehet az egyes daganattípusok kapcsán az MTH-68/H kiváltotta hatásban jelentős eltérések is felfedezhetők. A melanoma sejtvonalak esetében a tenyészetek teljes pusztulását tapasztaltuk 72 órával a fertőzést követően akkor, ha az alkalmazott vírus titer elérte, vagy meghaladta az 1:1-1:5 sejt:virion arányt, míg az átlagosan 50%-os sejtpusztulás a 10:1-5:1 titertartományban volt megfigyelhető (5. ábra B panel). Igen hasonló eredményekre vezettek a colorectalis eredetű sejtvonalakkal végzett kísérleteink. Ez esetben a maximális hatás elérése 1:5 vagy e feletti titer esetén jelentkezett, mellyel összhangban az 50%-os pusztulás eléréséhez is magasabb, jellemzően 5:1-1:1 sejt:virion arány volt szükséges (5. ábra C panel). Ezzel szemben az 5. ábra A paneljének eredményei jóval árnyaltabbak. Az itt bemutatott eltérő eredetű tumorsejtvonalak között néhány, a HeLa sejtek abszolút fogékonyására jellemző típus (pl.: Panc-1) mellett, az MTH-68/H fertőzésre kevésbé érzékeny (pl.: MCF-7) sejtvonalakat is találunk. Érdekes eredményt hoztak az U373 astrocytoma tenyészetekkel végzett méréseink. Amíg alacsony titerek esetén az U373 sejtek inkább a legkisebb érzékenységet mutató MCF-7 sejtekre jellemző citotoxicitást figyeltünk meg, addig 1:1 sejt:virion arány felett az U373 kultúrákban mért citotoxicitási értékek gyorsan növekvő mértékű sejtpusztulást jeleznek. Az U373 sejtek viabilitása az 1:1 sejt:virion tartománytól kezdve inkább közelít a nagy érzékenységű sejtvonalak esetén tapasztaltakhoz. A sejtpusztulás mértéke 1:50 sejt:virion arány felett már teljes, nem fokozható tovább, míg MCF-7 kultúrákban ez az érték csak a sejtek valamivel több, mint 50%-ának pusztulását idézi elő.





**5.A és B ábrák Humán eredetű tumorsejtvonalak MTH-68/H érzékenységének vizsgálata.** A panel: hasnyálmirigy (Panc-1), prosztata (DU145 és PC-3), glioblastoma (U373), tüdő (NCI-H460) és emlő (MCF-7) eredetű sejtvonalak. B panel: melanoma eredetű sejtvonalak. A "-" jelzésű oszlopdiaagrammok a kezeletlen sejtek 72 órás tenyésztését követően mérhető mitokondriális oxido-reduktáz aktivitást mutatják. A nagy dózisú anizomicinnel – "A" jelzéssel – kezelt sejtek a totális sejtpusztulásra vonatkozó pozitív kontrollként szolgálnak.



**5.C és D ábrák Humán eredetű tumorsejtvonalak MTH-68/H érzékenységének vizsgálata.** C panel: colorectalis eredetű sejtvonalak. D panel: tumorosan nem transzformált humán, egér (NIH3T3) és patkány (Rat-1) fibroblasztok. A "–" jelzésű oszlopdiagrammok a kezeletlen sejtek 72 órás tenyésztését követően mérhető mitokondriális oxido-reduktáz aktivitást mutatják. A nagy dózisu anizomicinnel – "A" jelzéssel – kezelt sejtek a totális sejtpusztulásra vonatkozó pozitív kontrollként szolgálnak.

Ugyanakkor az egér, patkány és primér humán fibroblasztokkal végzett kísérleteink során (5. ábra D panel) a bármely korábbi sejtvonalban maximális sejtpusztulást előidéző titerek esetén sem tapasztaltunk szignifikáns sejtpusztulást, sőt, egészséges, konfluens tenyészetet létrehozó folyamatos proliferációs aktivitás volt mérhető.

Az egyes sejtvonalak esetében mérhető, a 72 órás inkubáció után a sejtek 50%-ának pusztulását előidéző vírustiterek összehasonlításával meghatároztuk az egyes sejtvonalak relatív MTH-68/H érzékenységét (5. táblázat). A relatív érzékenység alapján MTH-68/H rezisztens megjelölést kaptak a vizsgált fibroblaszt kultúráink. Alacsony relatív MTH-68/H érzékenységet mutatnak PC12 és MCF-7 sejtkultúráink is, jóllehet a hosszabb, több napos MTH-638/H fertőzések során mindkét sejtvonal teljes pusztulását tapasztaltuk. Közepes érzékenységűnek bizonyultak egyes colon (HT-25, HCT-116), prostata (DU-145), tüdő (NCI-H460) és idegrendszeri (U373) eredetű vonalak, míg kifejezett MTH-68/H érzékenységet mutatnak bőr (A431, HT-168-M1/9, WM983B, HT199), glioblastoma (LNZTA3 WT4), cervix (HeLa) és pancreas (Panc-1) adenocarcinoma eredetű sejtek (5. táblázat).

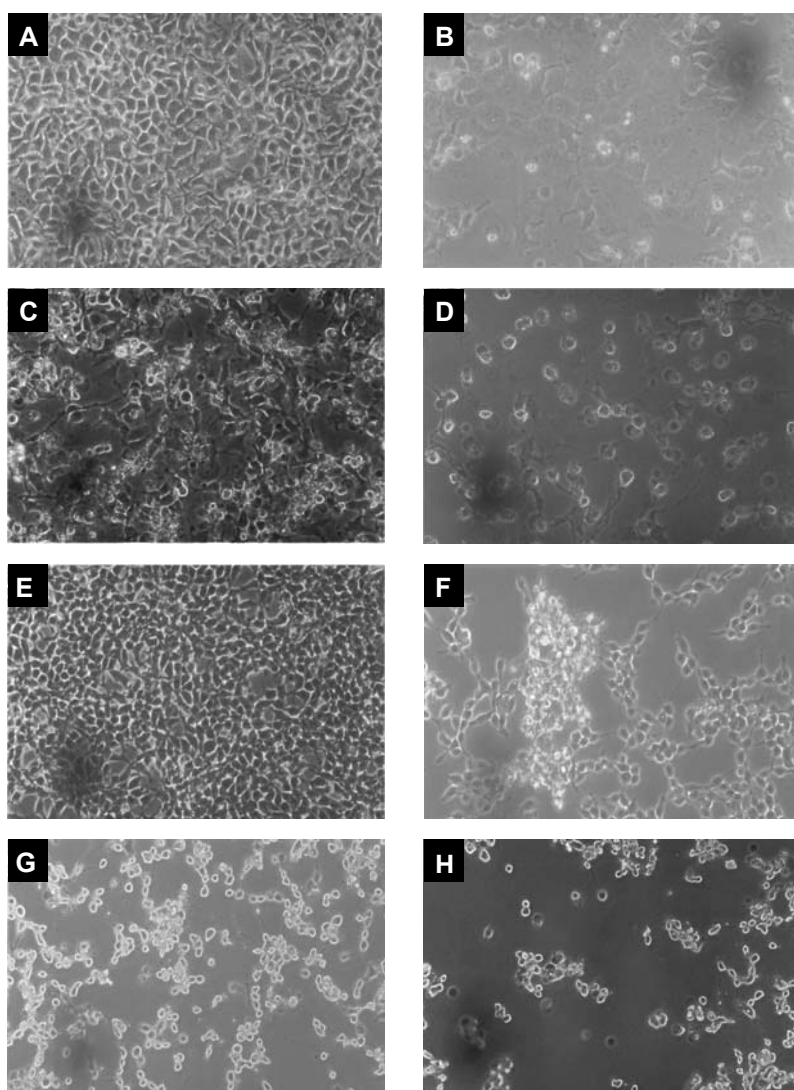
Sejttípus	Szöveti eredet	Relatív MTH-68/H érzékenység <sup>1</sup>
Primér fibroblaszt	Humán	Nincs
NIH3T3	Egér embrionális fibroblaszt	Nincs
Rat-1	Patkány embrionális fibroblaszt	Nincs
HT-25	Humán colon carcinoma	+++
HT-29	Humán colorectalis adenocarcinoma	++++
HCT-116	Humán colon carcinoma	+++
DU-145	Humán prostata adenocarcinoma agyi metasztázisa	+++
PC-3	Humán prostata adenocarcinoma csont-metasztázisa	++++
PANC-1	Humán ductalis epithelioid pancreas adenocarcinoma	+++++
MCF-7	Humán emlő adenocarcinoma	++
HeLa	Humán cervix adenocarcinoma	+++++
NCI-H460	Humán nagysejtes tüdőcarcinoma pleurális metasztázisa	+++
U373	Humán astrocytoma	+++
LNZTA3WT4	Humán glioblastoma	++++
A431	Humán epidermoid carcinoma	++++
HT-168-M1/9	Humán melanoma	++++
WM983B	Humán melanoma	++++
HT199	Humán melanoma	++++

5. táblázat Az alkalmazott humán sejtvonalak relatív MTH-68/H érzékenysége. A relatív MTH-68/H érzékenység meghatározása az 50%-os sejtpusztulást előidéző MTH-68/H titerek alapján az alábbiak szerint történt:

Relatív MTH-68/H érzékenység	50%-os citotoxicitást okozó sejt:virion arány
+++++	100:1 – 10:1
++++	10:1 – 5:1
+++	5:1 – 1:1
++	1:1 - 1:10
+	1:10 - 1:200
Nincs	< 1:200

## Aktív vírusreplikáció az MTH-68/H kiváltotta citotoxicitás során

A virális onkolízis molekuláris mechanizmusára felállított – korábban (6. oldal) röviden összefoglalt – elméletek szerint alapvetően két mechanizmus állhat a jelenség hátterében; szelektív vírusreplikáció a daganatsejtekben és/vagy egyéb immunológiai folyamatok. Minthogy *in vitro* rendszereinkben nincsenek jelen immunkompetens sejtek, a kérdés megválaszolása érdekében megpróbáltuk az aktív vírusreplikáció jelenlétét igazolni. E kísérleteinkhez a legnagyobb és a legkisebb MTH-68/H érzékenységet mutató HeLa és MCF-7 sejtvonalakat fertőztük 100:1 és 10:1 titerekkel, 24 órán át a korábbiakkal azonos körülmények között. A fertőzést



**6. ábra MTH-68/H fertőzött HeLa (A-D panelek) és MCF-7 sejtek (E-H panelek) médiumának hatása egészséges sejtekre.** A és E panel: kezeltlen sejtek 24 órás inkubációt követően, B és F panel: 1 µg/ml anizomicinnel kezelt sejtek 24 órás inkubációt követően, C és G panel: 100:1 sejt:virion titer alkalmazásával prekondicionált médiumban tenyésztett sejtek 24 órás inkubáció után, D és H panelek: 10:1 sejt:virion titer alkalmazásával prekondicionált médiumban tenyésztett sejtek 24 órás inkubáció után. Olympus CK-2 inverz fáziskontraszt mikroszkóppal készült felvételek, 20x objektív.

követően a sejtenyészetek médiumait összegyűjtöttük, 150x g-vel 5 percig centrifugálással megtisztítottuk a sejtes elemektől, majd a felülúszót friss HeLa illetve MCF-7 tenyészetekre vittük át és újabb 24 órán át inkubáltuk. Az új sejtenyészetek 24 órás inkubációját követően mindkét sejtvonal esetében súlyos sejtpusztulást tapasztaltunk (6. ábra). A friss sejtkultúrákban megfigyelt sejtpusztulás mértéke drámaibbnak bizonyult, ha az elsőként fertőzött tenyészeteknél magasabb kiindulási MTH-68/ titer alkalmaztunk (6. ábra. C, G és D, H panelek).

Megfigyeléseink arra utalnak, hogy az első tenyészet fertőzését követően szolubilis, sejtpusztulást kiváltó „anyag” van jelen a tenyésztőfolyadékban, amely a friss vírusfertőzéshez hasonló sejtpusztulást képes kiváltani. Kísérleti eredményeinkre két magyarázat is adódott. Egyrészt elképzelhető, hogy a fertőzés hatására a célsejtekben a tenyésztőfolyadékba szekretált szolubilis, sejtpusztulást előidéző molekulák szintézise indul meg. Ezt látszottak alátámasztani azok az irodalmi adatok is, amelyek szerint a különböző NBV fertőzések során jelentős mértékű IFN $\alpha$  illetve TNF $\alpha$  termelés fokozódás mérhető [83, 84]. Másfelől nem zárható ki, hogy a tapasztalt jelentős sejtpusztulás mögött a fertőzött tenyészetekben meginduló aktív vírusreplikáció húzódik meg. Így, a tenyésztőfolyadékba kijutó új virionok is felelősek lehetnek a második tenyészet pusztulásáért.

A kérdés tisztázása érdekében megvizsgáltuk a citotoxicitási kísérletek során 72 órán át fertőzött vad típusú (wt) PC12 patkány phaeochromocytoma, HeLa humán cervix carcinoma, NIH3T3 egér és Rat-1 patkány fibroblaszt sejtek (4. és 5. ábra) tenyésztőfolyadékainak fertőzőképes vírus tartalmát (6. táblázat).

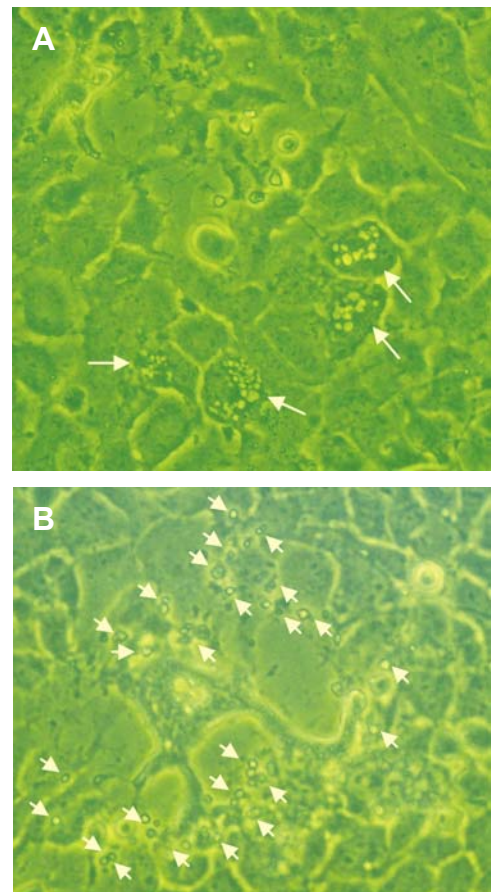
Sejttípus	wtPC12		HeLa		NIH3T3		Rat-1	
Kezelés (sejt:virion arány)	Mérhető vírus titerek (MTH-68/H partikulum/ml)							
	Az inkubáció kezdetén	72 órával később	Az inkubáció kezdetén	72 órával később	Az inkubáció kezdetén	72 órával később	Az inkubáció kezdetén	72 órával később
<i>Kezeletlen</i>	-	< 10 <sup>1</sup>	-	< 10 <sup>1</sup>	-	< 10 <sup>1</sup>	-	< 10 <sup>1</sup>
<i>Anizomycin (1 µg/ml)</i>	-	<10 <sup>1</sup>	-	<10 <sup>1</sup>	-	<10 <sup>1</sup>	-	<10 <sup>1</sup>
<i>100:1</i>	4x10 <sup>2</sup>	4x10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	6.3x10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	<10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>1</sup>
<i>50:1</i>	8x10 <sup>2</sup>	4x10 <sup>3</sup>	2x10 <sup>2</sup>	1.5x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>2</sup>	<10 <sup>1</sup>	2x10 <sup>2</sup>	<10 <sup>1</sup>
<i>10:1</i>	4x10 <sup>3</sup>	4x10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	1.5x10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	<10 <sup>1</sup>	10 <sup>3</sup>	<10 <sup>1</sup>
<i>5:1</i>	8x10 <sup>3</sup>	4x10 <sup>3</sup>	2x10 <sup>3</sup>	2.5x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>3</sup>	<10 <sup>1</sup>	2x10 <sup>3</sup>	<10 <sup>1</sup>
<i>1:1</i>	4x10 <sup>4</sup>	2.5x10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	1.5x10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	<10 <sup>1</sup>	10 <sup>4</sup>	<10 <sup>1</sup>
<i>1:5</i>	2x10 <sup>5</sup>	2.5x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>4</sup>	1.5x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>4</sup>	1.3x10 <sup>2</sup>	5x10 <sup>4</sup>	6x10 <sup>1</sup>
<i>1:10</i>	4x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	2.1x10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>	8x10 <sup>1</sup>
<i>1:50</i>	2x10 <sup>6</sup>	1.5x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>5</sup>	1.4x10 <sup>3</sup>	5x10 <sup>5</sup>	7.5x10 <sup>2</sup>
<i>1:100</i>	4x10 <sup>6</sup>	1.5x10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	1.5x10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	1.9x10 <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup>	7.2x10 <sup>2</sup>

6. táblázat A wtPC12, HeLa, NIH3T3 és Rat-1 sejtek 72 órás fertőzését követően a tenyésztő médiumban mérhető virionok száma.

Az egér és patkány (NIH3T3 és Rat-1) kötőszöveti sejtek 3 napos fertőzését követően, 100:1 - 1:1 közötti induló titerek esetén gyakorlatilag nem volt kimutatható, visszatitrálnak mennyiségű infekció partikulum a sejtek tenyésztőfolyadékában. 1:5 illetve magasabb alkalmazott titereknél ugyan mérhető a visszatitrált virionok száma, azonban az induló titerekkel összevetve úgy gondoljuk, hogy az e mintákban, a 3 napos inkubáció után is kimutatható virionok valójában a kezdeti fertőzéshez használt populáció „maradványainak” tekinthetők. A fibroblaszt sejtekkel végzett kísérleteink tehát egyértelműen arra utalnak, hogy a vírusreplikáció e sejtekben nem megengedett. A megegyező körülmények között, transzformált sejteken (HeLa illetve wtPC12) végrehajtott méréseink viszont érdekes eredményekre vezettek. A 72 órás fertőzést követően wtPC12 és HeLa sejtekben az induló titerekkel összevethető, vagy annál jelentősen nagyobb mennyiségű fertőzőképes részecske volt kimutatható a médiumokban, eredményeink helyes értékeléséhez azonban figyelembe kell vennünk az MTH-68/H vakcina fertőzőképességére vonatkozó adatainkat is.

Előkísérleteink szerint ugyanis az alkalmazott MTH-68/H készítmény 37°C-on 48-72 óra alatt teljesen inaktiválódik (ugyanakkor 4°C vagy alacsonyabb tárolási hőmérsékleten hosszú ideig fertőzőképes). A 72 órás, fiziológias körülmények között végrehajtott fertőzést követően visszatitrálnak, az induló részecskeszámnál nagyobb mennyiségű virion jelenlétét tehát csak aktív vírusreprodukciónak magyarázhatja. Eredményeink ugyanakkor azt mutatják, hogy az egyre magasabb induló titerek csak korlátozott mértékben növelik a visszatitrálnak virionok számát; wtPC12 sejtek esetén 10:1, HeLa sejtek esetén 1:1 sejt:virion arány feletti titer alkalmazásakor – a kisebb induló titereknél tapasztalható képest – már nem nő tovább a 72 óra elteltével a médiumban található, fertőzőképes partikulumok száma. A jelenségért egyaránt felelős lehet a növekvő induló titerek következtében a célsejtek egyre gyorsabban bekövetkező pusztulása, illetve a vírusreplikációban szerepet játszó intracelluláris mechanizmusok funkcionális kapacitásának kimerülése. További érdekesség, hogy a citotoxicitási esszéekben a legérzékenyebbnek bizonyult HeLa sejtek fertőzésakor mérhető virion képzés mintegy százszorosa a jóval kevésbé fogékony wtPC12 esetén mérhető vírusreplikációnak.

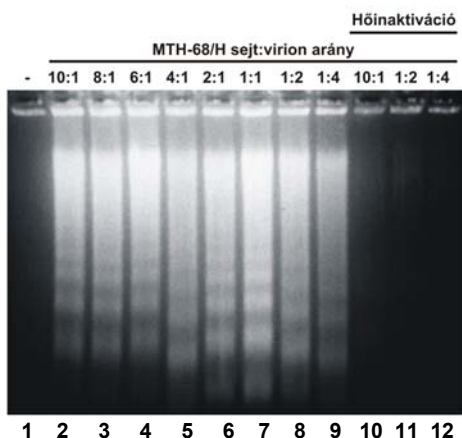
Mindez jól korrelál a korábban bemutatott viabilitási esszék eredményeiből levezetett relatív érzékenységbeli különbségekkel, utalva az onkolitikus hatásereőség és a vírusreprodukciós kapacitás közti szoros kapcsolatra. Bár eredményeink alátámasztják azokat a korábbi klinikai jellegű megfigyeléseket, melyek szerint a NBV-k képesek lehetnek proliferáció gátló hatást gyakorolni emberi daganatsejtekre, nem adnak pontosabb választ a fertőzés utáni események hátterére. A NBV természetes gazdái, a madarak fertőzését követő folyamatokat korábban több munkacsoport is vizsgálta. *Lam* és kollégái szerint a NBV a madarak egyes sejtjeiben (pl.: macrophagokban, perifériás vér lymphocitáiban) igen jelentős mértékű pusztulást idéz elő, és a munkacsoport által tapasztalt citopátiás hatás hátterében pedig apoptotikus folyamatok húzódnak meg [85-88]. Joggal felmerülő kérdés tehát, hogy az általunk megfigyelt sejtpusztulás vajon összevethető-e a természetes gazdasejtekben lezajló apoptotikus folyamatokkal, vagy egy attól eltérő mechanizmus útján valósul meg. A kérdés megválaszolása érdekében különböző sejteket fertőztünk MTH-68/H-val, majd az apoptózisra jellemző markereket kerestünk. Érdekes megfigyelés, hogy a Sindbis vírusfertőzések kapcsán leírt nagyfokú vakuolizáció az MTH-68/H fertőzött tenyészetek többségénél szintén megfigyelhető volt (7. ábra A). A vizsgált sejt kultúrákban röviddel a vakuolizációt követően zsugorodó sejtek jelennek meg, környezetükben pedig az apoptotikus testekre jellemző objektumok sokasága látható (7. ábra B). A morfológiai jellemzőkhöz hasonlóan (7. ábra és 27. ábra később), biokémiai vizsgálatok is megerősítették, hogy a fertőzést követően a humán daganatsejtekben apoptotikus folyamatok indukálódnak (7-12.,  $M_1$ ,  $M_2$  ábrák). A 8. ábrán HeLa, a 9. és 10. ábrákon wtPC12 sejtek MTH-68/H indukálta DNS fragmentációja látható.



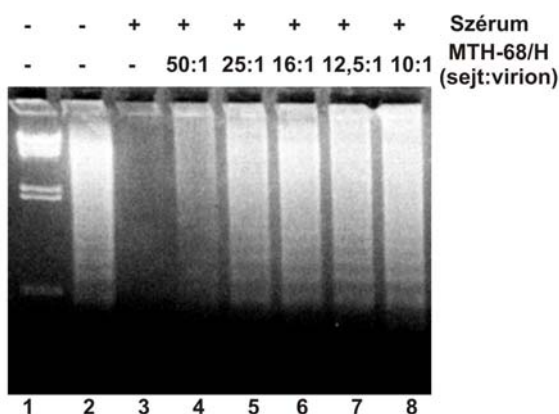
7. ábra A panel: LNZA3WT4 glioblastoma sejtek masszív vakuolizációja 9 órával az MTH-68/H fertőzést követően. B panel: Apoptotikus testek megjelenése a fertőzés 10. órájában. Olympus CK-2 100x objektív.



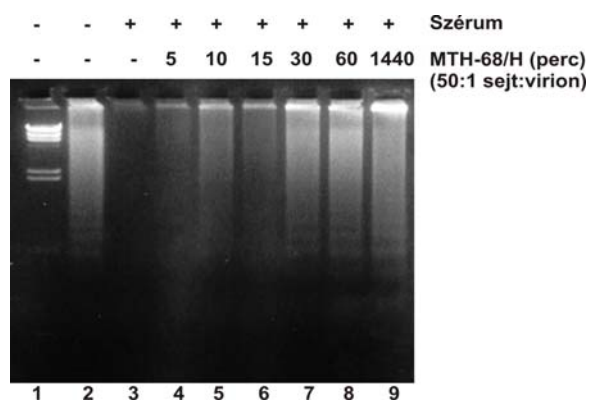
Az apoptózisra jellemző „DNS-létra” megjelenéséhez minimálisan szükséges



8. ábra MTH-68/H fertőzött HeLa sejtek internukleoszomális DNS-fragmentációja. Minták: 1.: kezeletlen sejtek, 2-9.: az ábrán jelzett MTH-68/H titerrel fertőzött sejtek, 10-12.: 30 perces forralással hőinaktivált MTH-68/H-val fertőzött sejtek.



9. ábra MTH-68/H fertőzött wtPC12 sejtek internukleoszomális DNS-fragmentációja. Minták 1.:  $\lambda$  Hind III marker, 2.: széruméheztetett sejtek, 3.: szérum jelenlétében tenyésztett kezeletlen sejtek, 4-8.: az ábrán jelzett MTH-68/H titerrel fertőzött sejtek.



10. ábra MTH-68/H indukált DNS-fragmentáció dinamikája wtPC12 sejtekben. Minták 1.:  $\lambda$  Hind III marker, 2.: széruméheztetett sejtek, 3.: szérum jelenlétében tenyésztett kezeletlen sejtek, 4-9.: MTH-68/H fertőzött sejtek.

MTH-68/H titer jól korrelál a HeLa sejtek relatív érzékenységgel, jelezve az MTH-68/H kiváltotta citotoxicitás és a beinduló apoptotikus folyamatok közti szoros összefüggést. DNS fragmentációs vizsgálataink a legtöbb sejtípus esetében szintén szoros összefüggést mutattak a DNS-fragmentáció megjelenéséhez minimálisan szükséges MTH-68/H titer és az adott sejtípus kapcsán meghatározott relatív érzékenység között. A 8. ábrán bemutatott kísérlet 10-12. mintái, melyben a HeLa sejteket 30 perces forralással inaktivált MTH-68/H-val fertőztük, egyértelműen jelzik,

hogy az apoptózis indukációs képesség alapvetően a kísérleti vakcina élő vírustartalmától függ, annak hiányában a DNS-fragmentáció elmarad. Eredményeink alapján arra a következtetésre juthatunk, hogy az MTH-68/H fertőzés okozta sejtpusztulásnak és a sejtekben beinduló apoptotikus folyamatoknak egyaránt a fertőzőképes vírusok jelenléte a feltétele. Az MTH-68/H által kiváltott apoptózis és sejtpusztulás folyamatainak további elemzése céljából az apoptózis kinetikájára vonatkozó kísérleteket végeztünk (10-11. ábrák). A 10. ábrán bemutatott kísérlet során wtPC12 sejteket különböző ideig fertőztünk, majd a tenyészeteket friss médiummal átmostuk és további 24 órán át inkubáltuk.



Megfigyeléseink szerint a célsejtek 30-60 perces, alacsony titerű (50:1) MTH-68/H expozíciója is elegendő ahhoz, hogy a folyamatos 24 órás fertőzésre jellemző mértékű DNS-fragmentációt tapasztaljunk. Figyelembe véve, hogy a sejtpusztulást vírusreplikáció kíséri feltételezhetjük, hogy a virionoknak ennyi időre van szükségük ahhoz, hogy *in vitro* rendszerünkben a sejtekbe jussanak. HeLa sejtek MTH-68/H fertőzését időben nyomon követve (*M<sub>1</sub> ábra a Mellékletben*) azt tapasztaltuk, hogy amíg az apoptózist befejezett, TUNEL pozitív sejtek aránya a fertőzés első 12 óráját követően csak 25-30% között mozog (*M<sub>1</sub> ábra D<sub>1</sub> panel*), addig a következő 6 órában közel megkétszereződik (kb. 70%, *M<sub>1</sub> ábra E<sub>1</sub> panel*), majd 24 órával a fertőzést követően eléri a teljes populáció közel 90%-át (*M<sub>1</sub> ábra F<sub>1</sub> panel*).

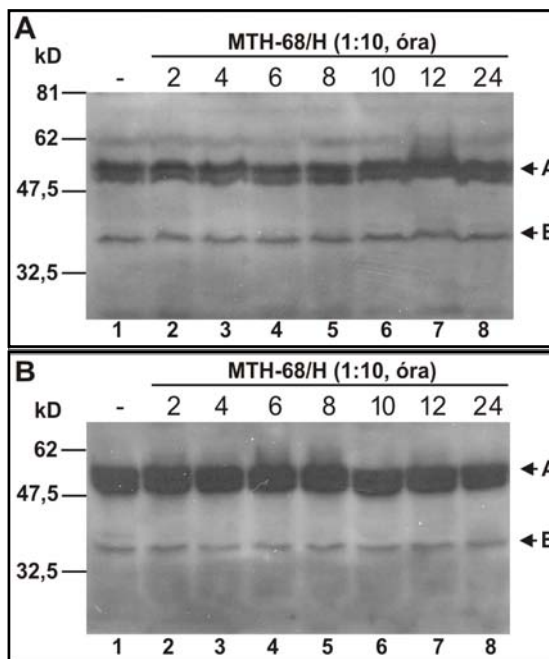
A fentiekkel összecsengő eredményt kaptunk wtPC12 fertőzését követően a kaszpáz-3 aktivációra vonatkozóan is (*11. ábra*). Az MTH-68/H fertőzést követően 10 órával a sejtekben igen jelentős mértékben emelkedik a hasított kaszpáz-3 mennyi-

sége, míg hasonlóan kiugró változást a hasított, citoplazmatikus elhelyezkedésű kaszpáz-9 kapcsán nem sikerült kimutatni (*11. ábra*). Sőt, az



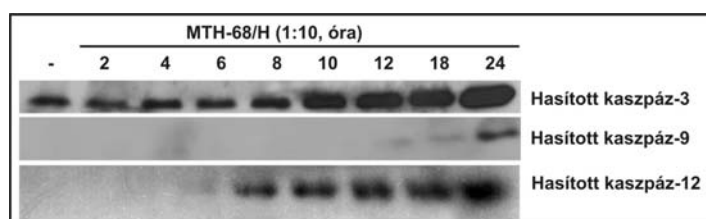
11. ábra Kaszpáz-3, és -9 aktiváció kinetikája MTH-68/H fertőzött wtPC12 sejtekben.

iniciátor típusú kaszpáz-9 hasított formájának megjelenését csak a fertőzés nagyon késői stádiumaiban figyelhetjük meg, amelyet messze megelőz az effektor típusú kaszpáz-3 hasítási termékeinek akkumulációja. A fertőzést >18 órával követő kaszpáz-9 aktiváció tehát inkább csak következőképpen lehet az apoptotikus folyamatoknak. Érdekes módon a receptor-aktivált kaszpáz-8 kimutatására irányuló kísérleteink is negatív eredményre vezettek. Ezirányú kísérleteinkhez kaszpáz-3 deficiens MCF-7, valamint kaszpáz-3 pozitív DU-145 sejteket használtunk (*12. ábra*).



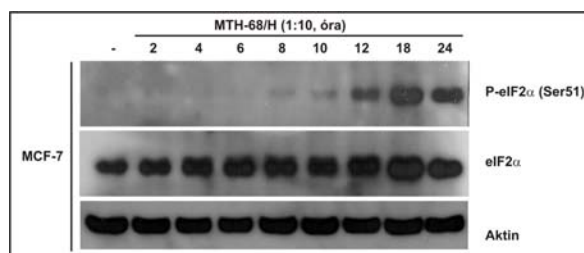
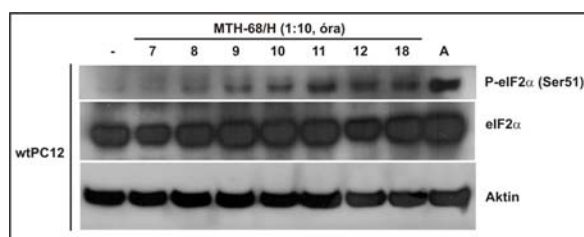
12. ábra A kaszpáz-8 aktiváció Western-blot analízise MCF-7 (A panel) és DU-145 (B panel) sejteken. Mindkét panelen az "A" sávban az inaktív 55-57 kD-os pro-kaspáz-8, míg a "B" sávban a 41kD-os hasítási termékek láthatók.

Az irodalmi adatok szerint a prokaspáz-8 inaktivált formája egy 55-57 kD látszólagos molekulasúlyú fehérje, mely hasítását követően az immunoblot analíziseken egy 41kD-os pre-domén mellett egy 18 kD-os aktív termékként jelenik meg. Amint az a 12. ábrán látható, sem az MTH-68/H fertőzött MCF-7 (12. ábra A), sem a DU-145 sejtekkel (12. ábra B) végzett vizsgálatainkban sem a kaszpáz-8 inaktív formájának mennyiségében, sem az aktivált kaszpáz-8 fragmentumok akkumulációjában nem tudtunk érdemi változásokat kimutatni.



13. ábra A kaszpáz-12 aktiváció PC12 sejteken.

(13. ábra). A hasított kaszpáz-12 megjelenése 8 órával a fertőzés kezdetét követően már egyértelműen kimutatható, amelyet időben a kaszpáz-3 aktivációja követ. A kaszpáz-12 lehetséges szerepét támasztja alá a molekula endoplazmatikus retikulumból történő felszabadulása és az ezt követő nukleáris transzlokációja ( $M_2$  ábra a Mellékletben). Immuncitokémiai vizsgálataink szerint a kaszpáz-12 nukleáris megjelenése a PC12 sejtek MTH-68/H fertőzését követő 10. órától már egyértelműen kimutatható ( $M_2$  ábra d és e panelek). Az endoplazmatikus retikulumba (ER) lokalizált kaszpáz-12 aktivációja az ER-stressz hatások következtében jön létre, melyet



14. ábra Az eIF2α foszforiláció vizsgálata MTH-68/H fertőzött wtPC12 és MCF-7 sejtekben.

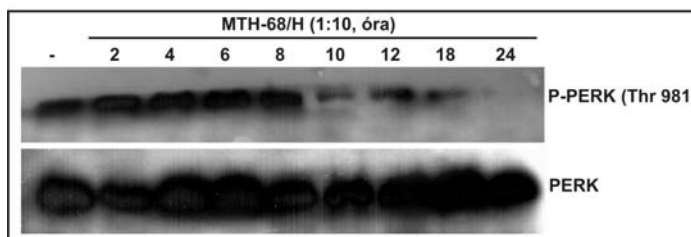
A kaszpáz-8 és -9 aktivációval ellentétben az MTH-68/H fertőzött PC12 sejtekben a 11. ábrán bemutatott kaszpáz-3 aktivációval korreláló kaszpáz-12 aktivációt sikerült azonosítanunk

jellemzően az adott sejt transzlációs gépezetének a transzláció iniciációján keresztüli leállítása követ. Minthogy korábbi eredményeink az MTH-68/H kiváltotta sejtpusztulást egyértelműen az aktív vírusreplikációhoz kötik, és a vírusfehérjék szintézise könnyen okozhat túlterhelést a célsejtek ER-ban, megvizsgáltuk az ER-stressz mediálásában szerepet játszó néhány további molekula lehetséges szerepét.

Az ER-stressz reguláció egyik központi molekulája az eukarióta transláció iniciációját szabályozó eIF2 $\alpha$ . Az eIF2 $\alpha$  51. szerin oldalláncán végrehajtott foszforiláció a fehérje inaktiválódásához, ezen keresztül pedig a poliszómákon zajló fehérjeszintézis leállításához vezet [89]. Kísérleteink szerint az eIF2 $\alpha$  gátlása PC12 sejtekben a fertőzés 10-11. órájában válik kifejezetté (14. ábra). Így az eIF2 $\alpha$  inaktiváció néhány órával a kaszpáz-12 aktivációt követően történik és időben inkább a kaszpáz-3 aktivációval esik egybe. A legkevésbé MTH-68/H érzékeny MCF-7 sejtek esetében az eIF2 $\alpha$  foszforiláció kezdete néhány órával későbbre, a fertőzést követő 12., míg maximuma a 18. órára tehető (14. ábra).

Az eIF2 $\alpha$  szabályozásában számos fehérje kináz vesz részt. Ezek közül az ER-stressz regulációban a protein kináz R-szerű ER-lokalizált kináz (PERK) tűnik különösen fontosnak [90]. A PERK immunoblot vizsgálata PC12 sejtekben érdekes, de korántsem váratlan eredményre vezetett. MTH-68/H fertőzés alatt a PERK egy relatíve gyengébb nyugalmi

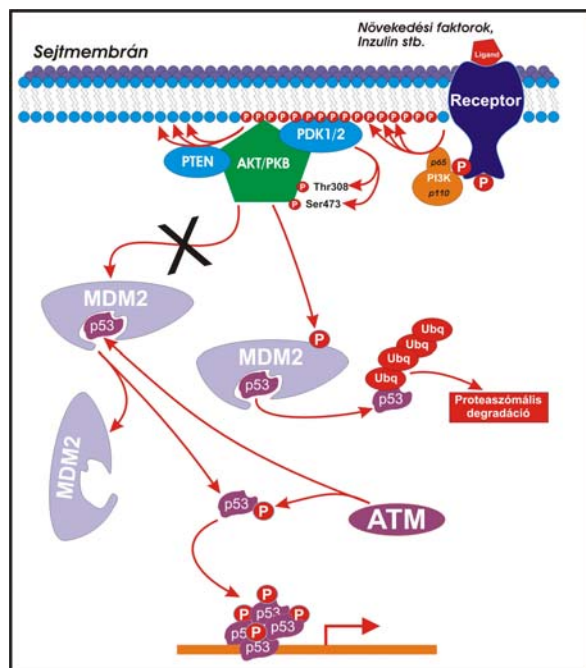
foszforilációs állapotból a fertőzés első 8-10 órája alatt erősebben foszforilált állapotba kerül, amely drámaian lecsökken a kezelés 10. óráját követően (15. ábra). A PERK foszforiláció



15. ábra PERK foszforiláció PC12 sejteken.

tehát időben megelőzi mind az eIF2 $\alpha$  foszforilációt, mind a kaszpáz-3 és -12 aktivációt. Az ER-stressz mediálásában résztvevő molekulák kitüntetett szerepére a közelmúltban több közlemény is utalt. Egér pancreas  $\beta$ -sejtek RNS-vírus fertőzéseket követő apoptotikus pusztulásának modellezésekor korai protein kináz R (PKR) - egy kettős szálú RNS-ek által aktivált és az antivirális védekezés központi molekulájának tartott másik eIF2 $\alpha$  kináz - aktivációját követően a nukleáris faktor  $\kappa$  B (NF $\kappa$ B) nukleáris transzlokációját figyelték meg [91]. Az NF $\kappa$ B nukleáris transzlokációját e sejtekben kaszpáz-12 aktiváció és TNF-receptor asszociált ligand (TRAIL) indukció követi. Sajnos a PKR szerepére irányuló saját kísérleteink ellentmondásos eredményekre vezettek, így e molekula lehetséges szerepe az MTH-68/H fertőzést követő sejtpusztulásban egyelőre nem tisztázott.

## AZ MTH-68/H kiváltotta apoptózis p53 független

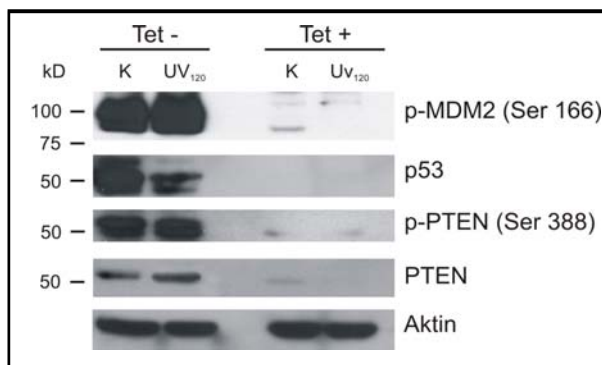


16. ábra A p53 Akt/PKB – MDM2 mediált szabályozásának vázlatja.

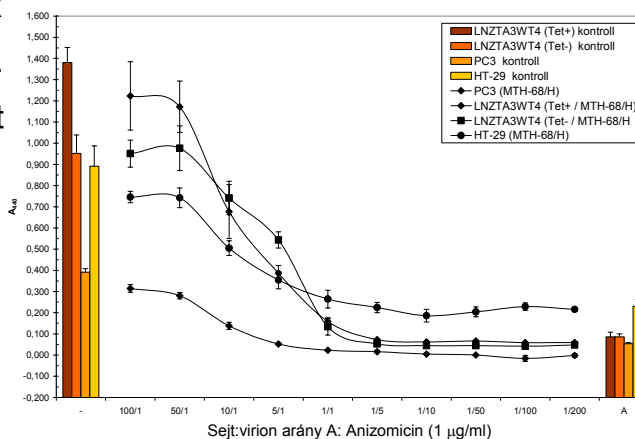
Az apoptózist szabályozó fehérjék között központi helyet foglal el egy rövid féléletidejű, 53 kD molekulású transzkripciós faktor – a p53. A fehérje klinikai jelentőségét jelzi, hogy a humán daganatok mintegy felében e tumorszuppresszor funkcióvesztő mutációját azonosították. Mint transzkripciós faktor, számos gén expresszióját irányítja, melyek között sejtciklust szabályozó, DNS repair, illetve proapoptotikus fehérjék génei egyaránt megtalálhatók (p21, GADD45, Bax) [92, 93].

Az MTH-68/H-val végzett, előzőekben tárgyalt vizsgálataink eredményei arra engednek következtetni, hogy a vizsgált sejtekben a fertőzés hatására intenzív apoptotikus folyamatok zajlanak. Ugyanakkor, ha összehasonlítjuk az egyes fogékonyak bizonyult sejtvonalak genotípusait, kitűnik, hogy számos sejtípust – HT-29, DU145, PC3, Panc-1, HeLa, U373, LNZA3WT4, A431 – mutáns p53 allélok jellemeznek, míg néhány sejtvonalról – wtPC12, MCF-7, HCT-116 – biztosan tudjuk, hogy vad típusú p53-at (wtp53) expresszál (6. táblázat). Mindez talán arra utal, hogy a klinikai szempontból oly fontos p53 működés nem szükséges az MTH-68/H indukálta apoptózishoz, bár az általunk vizsgált sejtvonalak közvetlen összehasonlítását nehezíti az a tény, hogy az egyes sejtípusok nem kizárólag p53 státuszukban térnek el egymástól. Részben a humán daganatokban tapasztalt wtp53 allélok funkcióvesztő mutációinak gyakorisága, részben a jelenlegi onkológiai stratégiák többségének p53-függő hatásmechanizmusa miatt egy p53-független onkolitikus mechanizmus a viroterápia számára rendkívül komoly előnyt jelentene. Minthogy az MTH-68/H onkolitikus aktivitásához kapcsolódó p53 függőség kérdését fontosnak éreztük, a p53 lehetséges szerepére irányuló vizsgálatokat végeztünk.

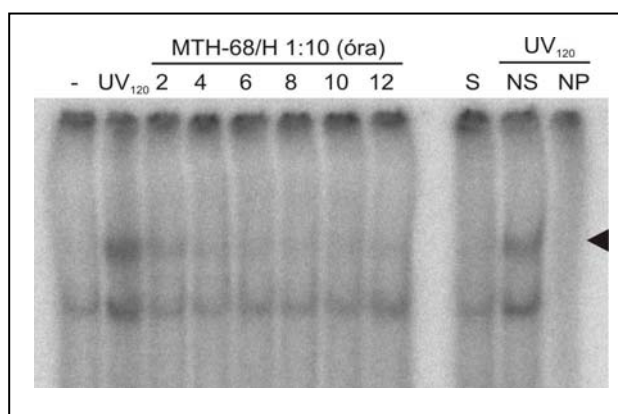
Kísérleteink egy részéhez az American Tissue Culture Collection készletéből származó, humán, deletált p53 lókuszokat tartalmazó glioblastoma sejtvonalat – LNZTA3WT4 – alkalmaztunk. A sejttípus érdekessége, hogy az eredetileg p53-deficiens sejteket stabilan transzfektálták egy tetraciklin represszor által szabályozott wtp53-at tartalmazó expressziós plazmiddal (lásd 4. táblázat), melynek eredményeként a tetraciklin jelenlétében tenyésztett sejtek nem, míg a tetraciklin nélküli környezetben fenntartott sejtek expresszálnak wtp53 fehérjét. Western-blot eredményeink a fentieket igazolták (17. ábra). Az exogén wtp53 allélt nem kifejező sejtekben nemcsak a p53, hanem a p53 szabályozásában fontos és p53-szabályozott fehérjék sem termelődnek illetve aktiválódnak. Természetesen a nem termelődő fehérjék UV besugárzás okozta indukciója szintén elmarad. Így, az LNZTA3WT4 jelű klónnal végzett vizsgálatok során – az indukált vagy represszált p53-ból eredő különbségektől eltekintve – egyéb, genotípusból fakadó eltérések hatásaival nem kellett számolnunk. Az LNZTA3 WT4 glioblastoma sejtekkel végzett citotoxicitási vizsgálataink a sejtvonal MTH-68/H iránti nagyfokú érzékenységét mutatták (18. ábra).



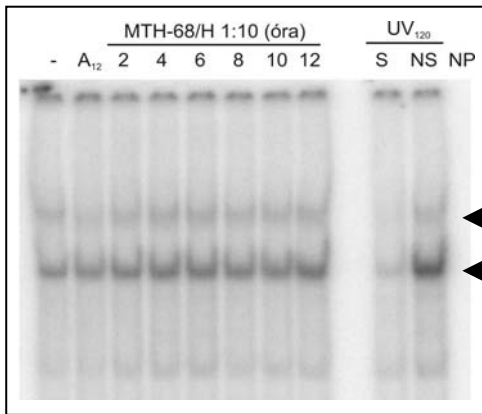
17. ábra A p53 és PTEN expressziójának, illetve az MDM2 foszforiláltságának Western-blot vizsgálata LNZTA3WT4 sejtekben. „Tet-“: tetraciklin nélkül, „Tet+“: tetraciklin jelenlétében tenyésztett és kezelt sejtek.; K: kezelés nélkül, UV<sub>120</sub>: 120' UV besugárzás utáni minták. A „Ser 166” és „Ser 388” a megfelelő szerin aminosavakat jelölik.



18. ábra Az LNZTA3WT4, PC3 és HT-29 sejtvonalak MTH-68/H érzékenysége.



19. ábra A p53 DNS-kötő aktivitása MTH-68/H fertőzött wtPC12 sejtekben. Rövidítések: UV<sub>120</sub>: 120 perces UV besugárzás; S: specifikus kompetitor (jelöletlen p53 specifikus oligonukleotid); NS: nem-specifikus kompetitor (jelöletlen AP1 specifikus oligonukleotid); NP: fehérje izolátum nélküli minta. Az S és NS mintákban az UV kezelt sejtek magfehérjéivel történt az inkubáció.



**20. ábra A p53 DNS-kötő aktivitása MTH-68/H fertőzött HCT-116 sejtekben.** Rövidítések: UV<sub>120</sub>: 120 perces UV besugárzás; A<sub>12</sub>: 12 órás anizomicin kezelés (1µg/ml) S: specifikus kompetitor (jelöletlen p53 specifikus oligonukleotid); NS: nem-specifikus kompetitor (jelöletlen c-Myc specifikus oligonukleotid); NP: fehérje izolátum nélküli minta. Az S és NS mintákban az UV kezelt sejtek magfehérjéivel történt az inkubáció.

Jelentős érzékenységbeli eltérést sem a tetraciklin hiányában, sem az annak jelenlétében tenyésztett és fertőzött sejtek esetében nem mértünk. A relatív érzékenység a már korábban vizsgált, mutáns p53 allélokat hordozó HT-29 colorectalis, PC-3 prostata vagy A431 bőr eredetű sejtekéhez hasonló (7. táblázat). A kérdés további tanulmányozása érdekében, wtp53-at expresszáló wtPC12 illetve HCT-116 sejtek felhasználásával megvizsgáltuk a fertőzött sejtek saját p53 fehérjéinek DNS-kötő aktivitását (19-20. ábra). Az endogén p53 aktiváció egyik központi lépése a transzkripciós faktor

konszenzus szekvenciáihoz történő fokozott kötődése (16. ábra). A wtPC12 sejtekről saját és irodalmi adatok alapján ismert, hogy az NGF kezelést követő proliferációgátlás és neuronális irányú differenciáció egyik mediátora épp a p53 [94, 95], jelezve a funkcióképes, wtp53 molekulák jelenlétét. Ezzel összhangban, a 19. ábrán látható gél-retardációs esszé eredményeként kapott elektroforetogram egyértelműen jelzi a wtPC12 sejtek 120 perces UV besugárzását követően – a kezeletlen, proliferáló wtPC12 sejtekhez képest – nagyobb mennyiségű, specifikus p53-DNS komplexek kialakulását (19. ábra, fekete háromszöggel jelzett sáv). Az MTH-68/H fertőzött wtPC12 sejtekkel végrehajtott DNS kötődési vizsgálataink eredményei azonban nem mutattak változást a p53 konszenzus szekvencia kötésének mértékében a fertőzés első 12 órájában, jóllehet korábbi kísérleteink igazolták, hogy 12 órával a fertőzést követően a wtPC12 sejtek pusztulása irányába mutató molekuláris „döntés” már megszületett.

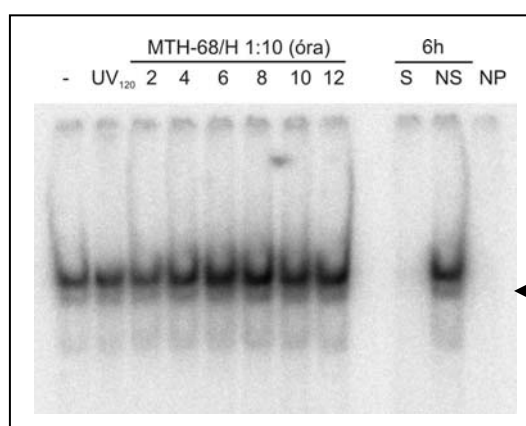
Érdekes módon, ha nem is jelentős mértékben, de eltérő eredményeket adtak a p53-at ugyancsak expresszáló HCT-116 colorectalis carcinoma sejtvonalal végzett kísérletek. Amint a 20. ábrán látható, a kezeletlen, proliferáló HCT-116 sejtekhez képest a fertőzött sejtekben a fertőzés előrehaladtával árnyalatnyi, p53 aktivációra utaló DNS kötődési tendencia bontakozik ki, de ez semmiképp sem összemérhető a metodikai kontrollként alkalmazott, UV besugárzott mintákban tapasztalható emelkedéssel.



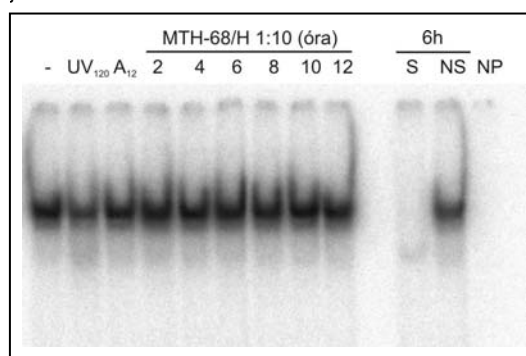
A p53, elsősorban genotoxikus hatásokra, vagy proliferációt előidéző fokozott c-Myc transzkripcionális aktivitás hatására, jellemzően az Apaf-1 és kaszpáz-9 mediálta intrinsic rendszeren keresztül fejt ki szabályozott sejthalált kiváltó – és így tumorsuppresszor – hatásait [96]. Saját eredményeink összhangban állnak ezekkel az adatokkal, hiszen kísérleteink során nem, vagy csak jelzett mértékű p53 aktivitás mellett, csak késleltetett és gyenge – valószínűleg szekunder – kaszpáz-9 aktivitás-fokozódást sikerült kimutatnunk (11. ábra). Közvetlen és közvetett eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a vizsgált *in vitro* rendszerekben, az MTH-68/H fertőzésre adott apoptotikus sejtválasz mediálásában az endogén p53 funkciók feltehetően nem játszanak központi szerepet.

### **A c-Myc és NFκB transzkripciós faktorok aktivációja MTH-68/H fertőzés során**

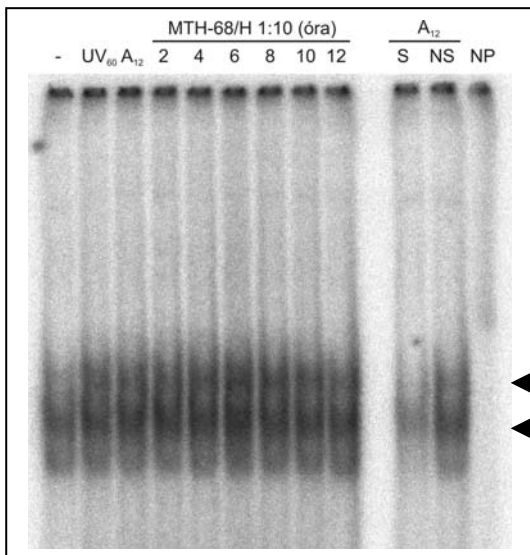
Természetesen elképzelhető, hogy az MTH-68/H fertőzést követően általánosan csökken a fertőzött sejtek transzkripcionális aktivitása, így eredményeink további ellenőrzése céljából a 19. és 20. ábrákon bemutatott kísérletekben alkalmazott magfehérje izolátumokkal újabb géltardációs vizsgálatokat végeztünk, de ezúttal a c-Myc, egy az apoptózis szabályozásában ugyancsak fontosnak tartott transzkripciós faktor, konszenzus szekvenciáját tartalmazó oligonukleotidok felhasználásával. A 21-22. ábrák tanúsága szerint sem wtPC12, sem HCT-116 sejtekben nincs jelen általános transzkripcionális aktivitás csökkenés. Sőt, wtPC12 sejtekben a c-Myc DNS kötődésének mértéke jelentős emelkedést mutat már az MTH-68/H fertőzés 4. órájától kezdődően.



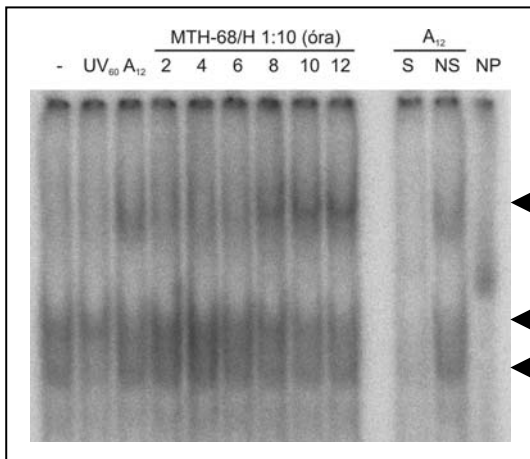
**21. ábra A c-Myc DNS-kötő aktivitása MTH-68/H fertőzött wtPC12 sejtekben.** Rövidítések: UV<sub>120</sub>: 120 perces UV besugárzás; S: specifikus kompetitor (jelöletlen c-Myc specifikus oligonukleotid); NS: nem-specifikus kompetitor (jelöletlen AP1 specifikus oligonukleotid); NP: fehérje izolátum nélküli minta. Az S és NS mintákban a 6 órás MTH-68/H kezelés magfehérjével történt az inkubáció.



**22. ábra A c-Myc DNS-kötő aktivitása MTH-68/H fertőzött HCT-116 sejtekben.** Rövidítések: UV<sub>120</sub>: 120 perces UV besugárzás; A<sub>12</sub>: 12 órás Anizomicin kezelés (1μg/ml); S: specifikus kompetitor (jelöletlen c-Myc specifikus oligonukleotid); NS: nem-specifikus kompetitor (jelöletlen AP1 specifikus oligonukleotid); NP: fehérje izolátum nélküli minta. Az S és NS mintákban a 6 órás MTH-68/H kezelés magfehérjével történt az inkubáció.



**23. ábra A NFκB DNS-kötő aktivitása MTH-68/H fertőzött wtPC12 sejtekben.** Rövidítések: UV<sub>60</sub>: 60 perces UV besugárzás; A<sub>12</sub>: 12 órás Anizomicin kezelés (1μg/ml) S: specifikus kompetitor (jelöletlen NFκB specifikus oligonukleotid); NS: nem-specifikus kompetitor (jelöletlen p53 specifikus oligonukleotid); NP: fehérje izolátum nélküli minta. Az S és NS mintákban a 12 órás anizomicin kezelés magfehérjéivel történt az inkubáció.



**24. ábra A NFκB DNS-kötő aktivitása MTH-68/H fertőzött HeLa sejtekben.** Rövidítések: UV<sub>60</sub>: 60 perces UV besugárzás; A<sub>12</sub>: 12 órás Anizomicin kezelés (1μg/ml) S: specifikus kompetitor (jelöletlen NFκB specifikus oligonukleotid); NS: nem-specifikus kompetitor (jelöletlen p53 specifikus oligonukleotid); NP: fehérje izolátum nélküli minta. Az S és NS mintákban a 12 órás anizomicin kezelés magfehérjéivel történt az inkubáció.

Hasonló, bár talán kissé árnyaltabb c-Myc aktivitás figyelhető meg HCT-116 sejtekben is. Érdekes ugyanakkor, hogy amíg a wtPC12 sejtek két órás UV besugárzása p53 és c-Myc aktivációt egyaránt eredményez (19. és 21. ábrák), addig HCT-116 sejteknél ez a jelenség elmarad; az UV irradiációt követő p53 aktivitás növekedése mellett a kezeletlen, proliferáló sejtek alap c-Myc aktivitásához mérten inkább csökkent c-Myc kötődés figyelhető meg (22. ábra).

Az MTH-68/H fertőzés tumorsejtek transzkripciós mintázatára kifejtett hatásáról körvonalazódó képet tovább színesíti, hogy mind wtPC12, mind a funkcionálisan p53 defektívnek tartott HeLa sejtekben, a c-Myc aktiváció korábban látott kinetikájához hasonlóan nukleáris faktor kappa B (NFκB) aktiváció is azonosítható (23-24. ábra). Az NFκB aktiváció a fertőzést követően a c-Myc aktivációhoz képest gyorsabban kialakul. A kapott eredmények mintázata az MTH-68/H fertőzött HeLa sejtekben eltér az UV besugárzott sejtekben tapasztalhatótól, de nagyon hasonló a teljes fehérjeszintézis blokád során (24. ábra A<sub>12</sub> minta) kimutatható

változáshoz. Jellemzően különböző molekulásúlyú DNS-fehérje komplexek jönnek létre, melyek mindegyike specifikusnak bizonyult és amelyek közül a nagyobb molekulásúlyal rendelkezők 8 órával a fertőzést követően mutathatók ki. Az NFκB DNS-kötődési vizsgálataink eredményei így egy NFκB → PERK / kaszpáz-12 → eIF2α / kaszpáz-3 lehetséges eseménysor aktiválódására utalhatnak.



## ÖSSZEFOGLALÁS

A humán és nem humán vírusok emberi daganatokra gyakorolt előnyös hatásai régóta a tudományos közösség érdeklődésének tárgyát képezik. Az 1900-as évek elejére visszanyúló kutatásoknak köszönhetően mára sikerült definiálni azokat a vírus fajokat, amelyek rendelkeznek egy teoretikus onkolitikus ágens potenciáljával.

Bár a kísérletek középpontjában álló onkoterápiás ágensek általános klinikai bevezetése még nem történhetett meg, a hatékony vírusterápiás eszközök kifejlesztésére tett erőfeszítések eredményei alapján számos, a vírusok terápiás felhasználásának korlátaira vonatkozó megállapítás már ma is megfogalmazható. Elméleti megfontolások, illetve az eddigi megfigyelések alapján ma egy olyan vírusterápiás eszköz iránti igény körvonalazódik, amely szelektíven képes elpusztítani a tumorosan transzformált sejteket, míg az egészséges szövetekre nem gyakorol hatást. A folyamat során ugyanakkor kívánatos lenne a terápiás „eszköz” szükség szerinti, de kontrollálható replikációja és propagációja a távolabbi daganatsejtek irányába is. Jóllehet a vizsgált onkolitikus ágensek *in vitro* meglehetősen gyorsan képesek szaporodni, *in vivo* szaporodásuknak, és így hatékonyságuknak is gyakran gátat szabnak az eltérő szöveti körülmények. A tumorokban található kötőszövet mennyisége, a daganat vaszkularitása, a daganatos sejtek receptordenzitásának mértéke, a daganatokban gyakori nekrotikus területek jelentősen ronthatják a terápiásan alkalmazott vírusok propagálását, és így azok onkolitikus hatását. A potenciálisan immunkompetens betegekben kifejlődő antivirális folyamatok ugyancsak jelentősen csökkenthetik a hatásfokot, bár a két folyamat közti kapcsolat még tisztázásra szorul. Hasonlóan döntő mozzanata lehet a vírusterápiás eljárások során a kezelés technikája is. Az eddigi vizsgálatok szerint a legtöbb esetben, a betegekben megjelenő neutralizáló antitestek, illetve a retikulo-endoteliális rendszer sejtjeinek reakciói csak abban az esetben nem rontják számottevően a vírusterápia hatásfokát, ha a víruspartikulumokat közvetlenül a tumoros szövetbe juttatják.

A neutralizáló antitestek ugyanakkor az intravaszkuláris bevitelt követő vírusreplikációt igen nagymértékben csökkenthetik, jóllehet a távoli, közvetlenül nem hozzáférhető metasztázisok elérése csak intravaszkuláris módon tűnik megvalósíthatónak.

A viroterápia gyakorlati bevezetését segíteni hivatott erőfeszítések mindeddig két fő irányban haladtak; egyrészt néhány hatékonynak ítélt vírus molekuláris biológiai módszerekkel történő átalakítása segítségével, másrészt egyes saját, belső onkolitikus tulajdonsággal rendelkező ágensek attenuált formáinak felhasználásával biztonságos onkológiai eszközt létrehozni.

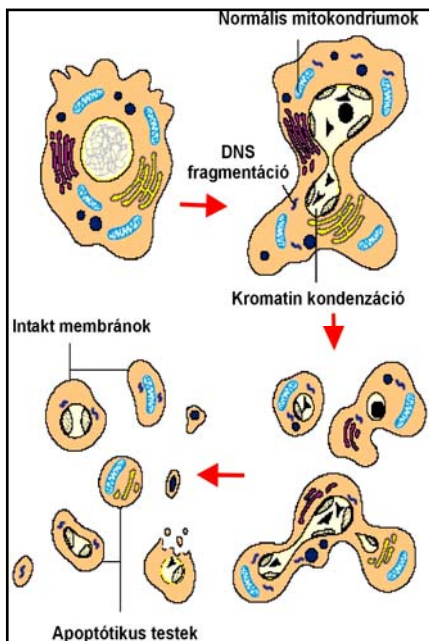
Kutatási programunk során ez utóbbi törekvéshez kívántunk hozzájárulni, amennyiben a Newcastle betegség vírus egy onkolitikus célra már alkalmazott attenuált variánsának – az MTH-68/H – hatékonyságát illetve onkolitikus hatásának mechanizmusát kíséreltük meg a korábbiaktól eltérően feltérképezni. A kooperációban végrehajtott vizsgálsorozat célja az onkoterápiás ágens *in vitro* körülmények közötti vizsgálata, a különböző szöveti eredetű daganatsejtek fogékonyságának meghatározása, a fertőzés intracelluláris elemekre gyakorolt hatásának jobb megismerése volt.

Vizsgálsorozatunkban sikerült bizonyítanunk, hogy a Newcastle betegség vírus MTH-68/H jelű izolátuma *in vitro* valóban képes a természetes gazdasejtjeitől eltérő rendszertani besorolású (emlős/humán) sejtekre is hatást gyakorolni. Az MTH-68/H infekció a célsejtek szövettani eredetétől függetlenül a tumorsejt-tenyészetek pusztulásához vezet. Az MTH-68/H citotoxikus hatása egyenes korrelációt mutat a felhasznált vírustiterekkel, de az alkalmazott daganattípustól függően eltérő mértékű (5. táblázat). A fokozott érzékenységet mutató glioblastoma és melanoma vonalak mellett különösen érzékenynek bizonyultak a pancreas tumor és a cervix carcinoma eredetű sejtvonalak, míg a legkevésbé érzékenynek az emlődaganat eredetű MCF-7 sejtvonal tűnik. Mindez arra utal, hogy az egyes daganattípusok eltérő geno- és fenotípusa ugyan különböző MTH-68/H érzékenységet alakíthat ki az adott sejtvonalban, de az az eltérő érzékenység mellett általánosan megfigyelt citopátiás hatás és egy alapvetően minden vizsgált tumoros eredetű sejtvonalban jelen lévő mechanizmust feltételez.

A vizsgált és MTH-68/H szenzitív sejtvonalak többségének ismert onko- és tumorszuppresszor gén „mintázata”, a viszonylag gyakori és jól ismert *ras* és *p53* mutációktól eltekintve, meglehetősen eltérő (4. táblázat). Ezek közül csak az inaktiválódott *p53* az, amely közös mind a két legnagyobb érzékenységet mutató Panc-1 és HeLa, mind a némileg alacsonyabb de még mindig jelentős érzékenységet mutató egyéb sejttípusok között is. Ezzel szemben a legalacsonyabb relatív érzékenységű MCF-7 sejtvonal vad típusú *p53*-at expresszál, míg a *ras* tekintetében oly gyakori pontmutációk helyett „csak” az *N-ras* - az egyes MCF-7 szubklónokban különböző mértékű - amplifikációját írták le. Irodalmi adatok alapján az MCF-7 sejtvonal ösztrogéndependens, széruméheztetésre sejtpusztulással válaszol, de ugyanakkor a *casp-3* gén deléciója miatt kaszpáz-3 deficiens. Az azonos körülmények között végzett MTH-68/H fertőzések ugyanakkor hatástalannak bizonyultak nem transzformált fibroblaszt kultúráinkon. Úgy tűnik tehát, hogy a funkcióvesztő *p53* és/vagy funkciónyerő *ras* mutációk jelenléte fokozza, míg ezek hiánya inkább csökkenti az MTH-68/H fertőzés iránti fogékonyságot, megerősítve, hogy az MTH-68/H kiváltotta sejtpusztulás a célsejtek daganatos fenotípusával van szoros kapcsolatban; sikeres fertőzés a daganatos eredettel bíró sejttenyészetekben jön létre.

A transzformált sejtek fertőzése során vírusreplikáció zajlik, melynek mértéke az egyes sejttípusok kapcsán meghatározott relatív érzékenységgel mutatott szoros összefüggést, míg az MTH-68/H rezisztens fibroblaszt kultúrákban a víruszaporodás teljes mértékben gátolt. Úgy tűnik tehát, hogy az MTH-68/H replikációjának lehetősége és mértéke, valamint az MTH-68/H fertőzést követő sejtpusztulás között szoros kapcsolat van.

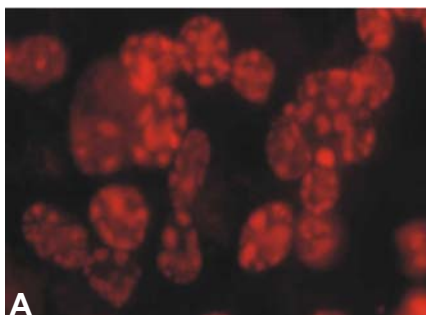
A szakirodalom, egyes *in vivo* vizsgálatok alapján, a virális onkolízisért felelős folyamatokban nagy jelentőséget tulajdonít a fertőző ágensek hatására kibontakozó különféle immunológiai folyamatoknak. Saját kísérleti rendszereink azonban mentesnek tekinthetők azoktól az aktív immunológiai elemektől, amelyek az MTH-68/H fertőzés során tapasztalt sejtpusztulást mediálhatnák. Kísérleteink alapján így a tapasztalt sejtpusztulásért egyértelműen az MTH-68/H fertőzés direkt citotoxikus hatását tehetjük felelőssé.



26. ábra Az apoptózis morfológiai jellegzetességei

A többsejtű, különösen a valódi szövetekkel rendelkező szervezetek egyik nélkülözhetetlen tulajdonsága az individuális sejtek szabályozott pusztulása, apoptózis. Ez a rendkívül összetett, a sejtciklus szabályozásával szorosan összefonódó, minden elemében a mai napig feltáratlan folyamat teszi lehetővé többek között az egyes szervek, szervrendszerek, testtájak, az adott fajra jellemző kialakulását. Ugyancsak apoptózis szabályozza a szövetek homeosztázisát és öregedését, illetve egyes betegségek kialakulását és lefolyását is. Az apoptotikus sejtpusztulás alapvetően a sejt illetve az egyes sejtalkotók zsugorodásával jár együtt (26. ábra). A membránszerkezeti változások érinthetik a

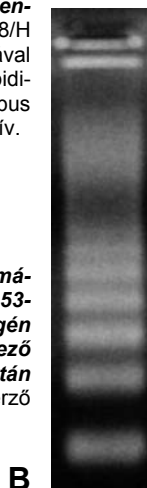
mitochondriális, illetve az endoplazmatikus membránrendszereket is, de a membránszerkezetben bekövetkező változások ellenére azok integritása mindvégig megmarad (26. ábra). Az apoptózist karakterisztikus nukleáris változások is kísérik; a kromatin kondenzációja mellett (27. ábra A) a sejtmag – és maga az örökítő anyag is



27. ábra A. Kromatin kondenzáció apoptózisban MTH-68/H fertőzött HeLa sejtek, 24 órával a fertőzést követően. Propidium-jodid magfestés, Olympus BX-61, 60x immerziós objektív.

(27. ábra A) – feltöredezik (karyorrhexis), apró, maghártyával határolt egységek létrejöttét eredményezve (26. ábra). Az apoptózis késői fázisában a lefűződő membránkomponensekből kialakulnak az apoptotikus testek (26. ábra), megakadályozva a sejttartalom extracelluláris térbe történő kijutását. *In vivo* a környező szöveti sejtek felismerik az elpusztult sejteket majd fagocitálják azokat, így a sejtpusztulás gyulladási reakcióktól mentesen zajlik le. A szabályozott sejthalál folyamatát legalább négy fő szakaszra bonthatjuk [97, 98].

27. ábra B. Internukleoszomális DNS fragmentáció *wtp53*-mal transzfektált, az exogén *p53*-at konstitutívan kifejező *wtpC12* sejtek spontán apoptózisa során. (A szerző saját felvételei.)

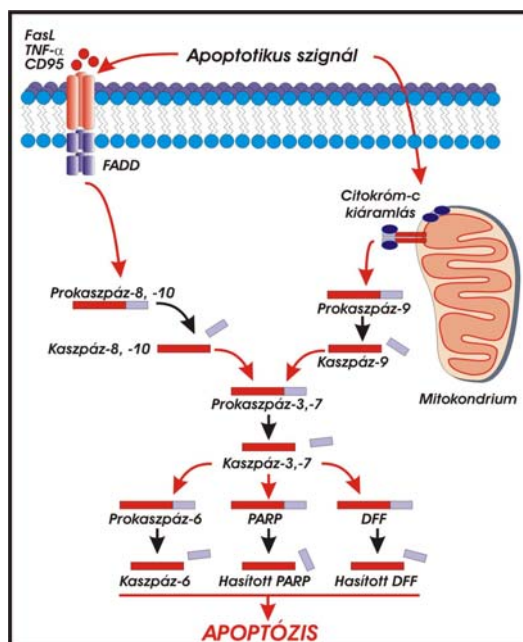


Az első fázis során a sejteket szabályozott sejthalál kiváltó hatás éri.

Ezek a legkülönbébbek lehetnek; a szövettényészeti sejtek széruméheztesétől a farmakológiai ágenseken, kemikáliákon, UV-, vagy radioaktív besugárzáson, a szöveti sejteket szabályozott sejthalálra kényszerítő citotoxikus T limfocitákon át a vírusfertőzéseig.

A *második fázison* a szabályozott sejthalált kiváltó stimulus detektálását és a szignál sejten belüli közvetítését értjük, mely szerint a szabályozott sejthalált kiváltó hatásokat két csoportba sorolhatjuk. Egy részük sejtfelszíni halálreceptorokon keresztül (Fas, TRAIL-receptorok, TNFR- $\alpha$ ), ún. „extrinsic” módon jut érvényre, míg a stimulusok másik része (mint pl.: egyes kemoterápiás szerek, kemikáliák, UV-, vagy a radioaktív irradáció) „intrinsic” módon, közvetlenül egyes intracelluláris sejtalkotókra (pl.: mitokondrium, endoplazmatikus retikulum), vagy molekulákra (pl.: DNS) gyakorolt hatásaik révén váltanak ki apoptózist (28. ábra). A TNF- $\alpha$  receptor szupercsaládba tartozó halálreceptorok, ligandjaik hatására jellemző trimereket alkotnak és további, immár intracelluláris molekulákat megkötve továbbítják az apoptotikus szignálokat. A receptor-trimerek és effektor molekuláik (pl.: FADD) közti kapcsolat a mindkét molekulatípusban megtalálható haláldomének közötti fehérje-fehérje kölcsönhatások útján valósul meg.

A kialakuló fehérjekomplexek prokaspáz-8 és -10 megkötésén és aktiválásán keresztül indítják el a szabályozott sejthalál extrinsic útját (28. ábra). Az intrinsic út jellegzetessége, hogy rendszerint a mitokondrium aktív közreműködésével valósul meg. A mitokondrium külső membránjában képződő pórusokon át mitokondriális fehérjék jutnak a citoplazmába (pl.: citokró-m-c), melyek más, a szabályozott sejthalálban szerepet játszó molekulákkal összekapcsolódva egy jelindító fehérjekomplexet hoznak létre (Apaf-1).



28. ábra *Extrinsic és intrinsic apoptózis szignálok által indukált kaspázok.* FADD: Fas asszociált "halál" domén, PARP: poli(ADP-ribóz) polimeráz, DFF: DNS fragmentációs faktor.

Mind az extrinsic, mind az intrinsic folyamat elindításában és végrehajtásában egyaránt alapvetőnek tűnik egy, a sejten belül működő proteolitikus kaszkád-rendszer, melynek tagjai önmagukat is beleértve, célfehérjék egész sorát képesek, azok aszparaginsav aminosavainak C-terminálisa mellett hasítani (cisztein aszpartát proteázok - "kaspázok") [99] (28. ábra). A jelenleg emlősökben ismert 14 kaspáz közül 11-et emberben is azonosítottak. A kaspázok funkcionálisan három csoportra oszthatók: iniciátor (kasp-2, -8, -9, -10, -12), effektor (kasp-3, -6, -7, -12) illetve a gyulladáshoz kapcsolódó részvevő kaspázok (kasp-1, -4, -5, -11). Az előbbieket a különféle szabályozott sejthalált indukáló szignálok hatására, proteolitikus hasításukat követően aktiválódnak és hasítják a hierarchiában alattuk elhelyezkedő prokaspázokat. A kiváltó stimulustól függően két fő kaspázkaszkád pályát ismerünk, melyek közül az úgynevezett extrinsic és intrinsic utakat a 28. ábra mutatja be vázlatosan [100]. A teljes képhez azonban hozzátartozik, hogy az extrinsic és intrinsic utak mellett létezik egy további, alternatív lehetőség is a szabályozott sejthalál kiváltására.

Az endoplazmatikus retikulum (ER) kaspáz rendszere egyesíti magában az extrinsic és az intrinsic utak egyes elemeit. Emlősökben az ER normális funkcióját megzavaró hatásokra (pl.: fokozott fehérjeszintézis, vírusfertőzés, nem megfelelő térszerkezetű fehérjék felhalmozódása), az ER membránban található prokaspáz-12 aktivációja figyelhető meg. A hasított kaspáz-12 részben közvetlenül a sejtmagba transzlokálódva, részben más - többek között az intrinsic kaspáz-út vonal elemein keresztül vezet a szabályozott sejthalálhoz. Emberben a 11-es kromoszóma q22.3-as lokuszán található *casp-12* gén csak egy pszeudogén, amely több „frame-shift” és legalább egy funkcióvesztő mutációnak köszönhetően nem fejez ki működő fehérjét [101]. Minthogy az ER-stresszhatásokra emberi sejtekben is sikerült kimutatni a szabályozott sejthalál jellemzőit, humán sejtekben feltehetően az azonos lokuszban található, kaspáz-12-vel nagyfokú homológiát mutató kaspáz-4 és -5 tölti be az inaktív kaspáz-12 szerepét [102, 103].

A szabályozott sejthalál *harmadik* fázisát *effektor fázis*nak is nevezhetjük. Az effektor kaspázok aktiválását követően proteolitikus hasítás útján többek között inaktiválódnak azok az enzimek, melyek a sejtek túlélését hivatottak elősegíteni (mint pl.: a DNS reparációjában kulcsfontosságú poli(ADP-ribóz)-polimeráz [PARP]).

Ugyanakkor más, proapoptotikus molekulák épp a proteolitikus reakcióknak köszönhetően nyerik el aktív formájukat (mint pl.: maguk a kaszpázok, vagy a DFF45) (28. ábra). Az egyes kaszpáz utak kommunikálhatnak egymással és ki is válthatják egymást [104], de a szabályozott sejthalál akár kaszpázfüggetlen útvonalakon is megvalósulhat. Ilyenkor a kaszpázfüggetlen effektor utak kulcsenzimein szerin proteáz inhibitorok (szerpinek). Egyes szerpinek (pl.: a leukocita elasztáz inhibitor [LEI]) folyamatos gátlás alatt tartanak proapoptotikus fehérjéket (LEI-függő DNáz II-t), de amint az intracelluláris viszonyok változása miatt aktivitásuk csökken, a proapoptotikus molekulák felszabadulva a gátlás alól, szabályozott sejthalált váltanak ki. Az egyes kaszpázfüggő vagy független mechanizmusok azonban inkább egy hálózatként foghatók fel, semmint lineáris, egymástól elválasztott mechanizmusokként. Amíg az Omi/HtrA2, egy a mitokondriumban található szerpín, például a mitokondriumból kiszabadulva egy szabályozott sejthalálgátló fehérjét (X-kromoszómához kötött apoptózis inhibitor [XIAP]) köt meg és – feltehetően az antiapoptotikus fehérje gátlásán keresztül – kaszpázfüggetlen szabályozott sejthalált vált ki, addig *in vitro*, direkt kaszpázaktiváló hatású [105].

Bárhogy is közvetítődjék a kiváltó stimulus a sejten belül, a *negyedik fázis* a sejt halálának bekövetkeztét jelenti. Megjelennek az apoptózis morfológiai jegyei; kondenzálódik és fragmentálódik a sejt örökítő anyaga, a sejtmag jellegzetes befűződéseket mutat, a folyamat eredményeként megjelenő, membránnal határolt apoptotikus testek pedig fagocitózis áldozatául esnek.

Az apoptózis mechanizmusa természetesen nemcsak effektor molekulákat foglal magába, hanem gátló, antiapoptotikus rendszereket is, mint a Bcl-2 fehérjecsald egyes tagjai. A pro- és antiapoptotikus rendszerek között fennálló dinamikus egyensúly alapvetően fontos a sejttúlélés illetve a szabályozott sejthalál szempontjából, melynek szabályozása több szinten, részben transzkripcionális folyamatokon, részben fehérje-fehérje kapcsolatokon illetve foszforilációs eseményeken keresztül történik [106, 107]. Minthogy a gazdasejtek túlélése alapvetően befolyásolhatja a vírusfertőzések kimenetelét, nem meglepő, hogy számos vírusfertőzés kapcsán sikerült kimutatni a szabályozott sejthalál szabályozóiban bekövetkező változásokat.

Az eukarióta szervezetek és vírusaik között kialakult bonyolult kapcsolatrendszer egyre fontosabbnak bizonyuló eleme a gazdasejt által a fertőzés során beindított apoptotikus válasz. A vírusok szempontjából a gazdasejt apoptotikus pusztulása hátrányos lehet – limitálva a vírusreplikációra felhasználható időt, celluláris enzim kapacitást és így az újonnan létrejövő vírusrészecskék számát [108]. Nem meglepő tehát, hogy infektív részecskék egész sora kódol antiapoptotikus hatású molekulákat, megakadályozva ezzel a gazdasejt fertőzésre adott öngyilkos válaszát. Az antiapoptotikus Akt/protein kináz B (Akt/PKB) virális formáját hordozó akutan transzformáló retrovírus AKT8 [109] mellett, fokozott Akt/PKB aktivációt és ennek következtében a gazdasejt vírus-indukált túlélését idézik elő például az Epstein-Barr vírus [110, 111], a citomegalovírus vagy az SV40 vírus egyes fehérjéi [112, 113] is. Hasonlóképp, bár másik támadáspontot választva működik a bakulovírus, vagy a tehénhimlő vírusa, melyek egy, az interleukin 1 $\beta$ -konvertáló enzimhez – vagy ma használatos néven kaszpáz-1-hez – kötődő, és azt inaktiváló fehérjét kódolnak [114, 115]. Más vírusok Bcl-2 homológ fehérjékkel, p53 antagonistákkal, vagy proteáz inhibitorokkal (mint pl.: a p35, vagy az IAP) próbálják a gazdasejt pusztulását megakadályozni [116, 117].

Bár a vírusfertőzéseket követő apoptózis intracelluláris eseményei teljes komplexitásukban még nem tisztázottak, annak számos fontos elemét már ismerjük. A többsejtű szervezetek elsődleges antivirális védekezési vonala a fertőzést szenvedett sejtek környezetében beinduló IFN termelés [118]. Az IFN – különösen az IFN- $\alpha$  és  $\beta$  – receptor által közvetített úton több tucat gén transzkripcióját indítja el vagy fokozza, melyek közül legalább egy, a protein kináz R (PKR), főszerepet játszik a vírusfertőzésre adott apoptotikus válasz kialakításában. A PKR egy ubiquiter módon expresszálandó, IFN indukálható, különböző stressz-hatásokra aktiválódó protein kináz, melynek legfőbb ma ismert tulajdonsága az apoptotikus válasz szabályozása. Komplex és központi szerepét mi sem bizonyítja jobban, mint effektorai széles skálája, ahol megtaláljuk a transzláció iniciációjában szerepet játszó eIF-2 $\alpha$ -t, az NF $\kappa$ B, illetve p53 transzkripció faktorokat, de a p38, illetve bizonyos körülmények között az ERK mitogén aktivált protein kináz fehérjéket is [89, 119, 120].



A PKR virális fertőzéseket követő aktivációja – többek között a transláció iniciációjának eIF2 $\alpha$ -n keresztüli gátlása révén – a gazdasejt apoptózist eredményez. Bár úgy tűnhet, hogy a gazdasejt vírusfertőzés hatására bekövetkező apoptózis nem szolgálja a fertőző ágensek "érdekeit", mégis, gazdag irodalommal alátámasztott tény, hogy virális ágensek nem csupán apoptózist gátló, hanem azt aktívan előidéző tulajdonsággal is rendelkezhetnek.

Az apoptózis kapcsán talán az egyik legkevésbé felderített lépés, a már korábban említett utolsó fázis, amely során a létrejövő apoptotikus testeket a környező szöveti, illetve a reticuloendothelialis rendszer sejtjei rövid időn belül eltüntetik. Az apoptotikus testek membránnal körülhatárolt sejtmaradványok, melyek egyes elképzelések szerint kiváló közvetítő közeget jelenthetnek az elpusztult sejtben szaporodó vírusok számára, megóvva ezzel az újonnan képződött virionokat mindennemű szöveti immunválasztól. Így a vírus-indukált apoptózis termékei kiváló „médiumai” lehetnek az újabb fertőzésnek. Talán ezt az elképzelést látszanak alátámasztani a Sindbis vírus (SV) fertőzések kapcsán tett megfigyelések is, melyek szerint lítikus SV fertőzés késői szakaszában, több emlős sejttypusban is, a jelentős kromatin kondenzáció mellett a citoplazma nagyfokú vakuolizációja figyelhető meg [121]. A SV az alfa vírusok prototípusaként ismert, egyszálú pozitív RNS genommal rendelkező fertőző ágens, mely a legtöbb osztódó, emlős sejtben, de különösen a fiatal egerek neuronjaiban, lítikus fertőzést, illetve fiatal egerekben encephalitist okoz. A közelmúltban derült fény arra is, hogy a SV fertőzés során - legalább néhány emlős sejtben (293T és BHK) - a gazdasejt apoptózist a Bcl-2 és Bcl-X<sub>L</sub> inaktiváció mellett a fertőzést követő Bad aktivációja is mediálja [122]. Ugyancsak jól ismert adat, hogy a humán immundeficiencia vírus-1 (HIV-1) fertőzés során a fertőzött páciens CD4<sup>+</sup> T limfocitáinak száma jelentősen csökken. Kísérleti adatok szerint a CD4<sup>+</sup> T limfociták pusztulása során a CD4<sup>+</sup> T sejtekben Fas-mediált apoptotikus folyamatok zajlanak, melyekért elsősorban a HIV-1 Tat génje által kódolt transzkripciósfaktor a felelős. A Tat fokozza a Fas-ligand expressziót, beindítva ezzel a fertőzött sejt apoptózist [123], sőt, a Tat fehérje képes elnyomni a fertőzött sejt endogén Bcl-2 expresszióját is [124]. A virionok tehát nemcsak aktív proapoptotikus folyamatok indukciójával, hanem antiapoptotikus szabályozó rendszerek gátlása útján is a sejt szabályozott pusztulását idézhetik elő.

Hasonló megfigyelésekről számolt be *Yamada* és munkacsoportja humán T-sejtes leukémiai vírusok (HTLV-1) tanulmányozása kapcsán is, melyek a gazdasejtbe kerülve egy Tat homológot -Tax - expresszálnak [125]. A parvovírus B19 – egy, a klinikai gyakorlatból ugyancsak jól ismert patogén – szintén az apoptózist indukáló vírusok között említhető. A parvovírus B19 fertőzés gyakran perzisztens és a legkülönbébb szöveteket érintheti. Általában a terhesség második trimeszterében bekövetkező – rendszerint hydrops foetalis-szal kombinált – magzati elhalás kórokozójaként ismert, de májsejtek fertőzésekor akut fulmináns májelégtelenséget is okozhat. A vonatkozó irodalmi adatok szerint a fertőzést követő sejtmorfológiai változások megfelelnek az apoptózis morfológiai kritériumainak [126]. Kísérleti adatok utalnak arra, hogy a parvovírus B19 által indukált apoptózisért legalább egy virális gén mindenképp felelőssé tehető, mely a vírus nem struktúrális fehérjéjét (NSP1) kódolja. Az NSP1 a fertőzés során a sejtmagban található és DNS kötő doménnel is rendelkezik. NSP1-gyel transzfektált COS-7 majom epithelialis sejtekben elsősorban a mitokondriális eredetű proapoptotikus molekulák (kaspáz-9, Bax, Bad), illetve p53, p16, p21 és kaspáz-3 fokozott expressziója illetve aktiválódása következik be. Hasonló eredményekre vezettek a parvovírus B19-cel primér hepatocitákon és HepG2 sejteken végzett kísérletek is [127, 128]. A Sindbis vírus, a HIV-1 és a parvovírus B19 mellett, az apoptózist indukáló vírusok között számos egyéb, klinikai szempontból is fontos patogént találunk, melyeket a 7. táblázatban foglaltam össze.

Saját kísérleteinkben az MTH-68/H fertőzés során tapasztalt sejtpusztulás során szintén sikerült az apoptózis morfológiai – sejtsugorodás, apoptotikus testek megjelenése – és biokémiai – DNS-fragmentáció és TUNEL pozitívitas, kaspáz-3 és kaspáz-12 aktiváció – jegeit kimutatnunk; a tapasztalt masszív sejtpusztulás hátterében tehát – legalább részben – az MTH-68/H kiváltotta apoptotikus folyamatok húzódnak meg. Az MTH-68/H fertőzés hatására megjelenő apoptózis kiváltásához a fogékony sejtek rövid idejű – 60 perces – direkt expozíciója is elegendőnek tűnik, melyet az apoptózisban kiteljesedő biológiai válasz 72 órán belül az egész tenyésztetre kiterjedő mértékben követ. A folyamat során a paramyxovírusokra jellemző szöveti elváltozások – nagymértékű vakuolizáció, sejtfúziók során kialakuló syntitiumok – ugyancsak megfigyelhetők.

Vírus család	Vírus	Protein (gén)	Feltételezett mechanizmus
Adenoviridae	Adenovírus	E1A	TNF érzékenység fokozása, fokozott p53 aktivitás
		E4orf4	PP2A aktiváció
		E3-11.6K	Ismeretlen
Papovaviridae	SV40	nagy T antigén	Fokozott p53 aktivitás
	Polyoma vírus	nagy T antigén	Fokozott p53 aktivitás
		közepes T antigén	TNF érzékenység fokozása
	Papilloma vírus	E7	Fokozott p53 aktivitás
E2		E6 expresszió csökkentése	
Parvoviridae	MVM, B 19	NSP 1	DNS törések (?) A sejtciklus gátlása G2 fázisban (?)
Circoviridae	CAV	VP3 "Apoptin"	Ismeretlen
Herpesviridae	HHV6/7	Ismeretlen	Fokozza a TNFR1 expressziót
	EBV	EBNA3C	Kötődés a Retinoblasztóma fehérjéhez.
	EBV	EBNA1	Apoptózis ha nincs paralell látens fertőzés, mechanizmusa ismeretlen.
Baculoviridae	AcNPV	IE-1	Ismeretlen
Hepadnaviridae	Hepatitis B vírus	HBx	TNF érzékenység fokozása, MEKK-en keresztül fokozza a c-myc majd a p53 expressziót + ismeretlen p53-független mechanizmus.
Retroviridae	HIV-1	Tat	Fokozza a FasL promóter működését, és a fertőzött T sejtek oxidatív állapotát.
		Gp160	Aggregátum-képzés, növeli az intracelluláris Ca <sup>++</sup> szintet.
		Gp120/gp41	Keresztkötések kialakítása a CD4 között nem fertőzött sejteken, neuronokban kölcsönhatás a CXCR4 kemokin receptorokkal.
		Vpr	A sejtciklus gátlása G2 fázisban.
	HTLV 1	Tax	Fokozza a FasL promóter működését és a fertőzött T sejtek oxidatív állapotát.
Togaviridae	Semliki Forest vírus	NS régió	Ismeretlen
	Sindbis vírus	E1, E2	NF-κB aktiváció (neuronokban)
Flaviviridae	Hepatitis C	Core protein	Kötődik a TNFR1 citoplazmatikus doménjéhez, NFκB aktiváció gátlása.
Floating Genus: Arterivírus	PRRSV	OrfS géntermék	Ismeretlen
Paramyxoviridae	Sendai vírus	C protein	Ismeretlen
		Vezető régió	Ismeretlen (IFN indukció?)
	NBV	Ismeretlen	Ismeretlen
	RSV	Ismeretlen	IFN és kaszpáz-1 indukció
Orthomyxoviridae	Influenza A/B	Ismeretlen	Fas expresszió fokozása, esetleg PKR mediált úton.
Reoviridae	Reovírus	σ1 (kapszid fehérje)	Ismeretlen
	Rotavírus	NSP4	A plazma membrán permeabilitás elvesztése (nekrózis?).
Birnaviridae	IBDV	NS and VP2	Ismeretlen

**7. táblázat Apoptózist kiváltó ismert vírusok [129].** (Rövidítések az angol elnevezés alapján; TNF: tumor nekrosis faktor; SV40: majom vírus 40; MVM: Egér minute vírus; CAV: csirke anémia vírus; HHV: humán herpesvírus; EBV: Epstein-Barr vírus; AcNPV: *Autographica californica* nuklearis polyhedrosis vírus; HIV: humán immundeficiencia vírus; HTLV: humán T-sejtes leukémia vírus; NBV: Newcastle-betegség vírus; RSV: respiratorikus syncytiális vírus; IBDV: infectious bursal disease vírus; PRRSV: Porcine reproductive and respiratory syndrome vírus)

Figyelembe véve a HeLa tenyészetek TUNEL vizsgálatokor kapott eredményeinket ( $M_1$  ábra), melyek szerint a fertőzést követően 18 órával a populáció mintegy 2/3-a TUNEL pozitív; a kevésbé érzékeny wtPC12 sejtek apoptotikus válaszához kiváltásához elegendő 30-60 perces MTH-68/H expozíciót (10. ábra), valamint a 10 órás inkubációt követően már egyértelmű kaszpáz-3 aktivációt (11. ábra), úgy tűnik, hogy a fertőzésre adott celluláris válaszra vonatkozó molekuláris "döntés" és annak kivitelezése meglehetősen rapid módon történik, az ehhez vezető folyamatoknak feltehetően az első 10 órában kell lejátszódnuk.

Bár az MTH-68/H fertőzés során kaszpáz-3 pozitív sejtek esetében e molekula aktivációját sikerült azonosítanunk, kétséges az MTH-68/H kiváltotta sejtpusztulásban az effektor kaszpáz-3 abszolút szerepe, hiszen az MTH-68/H fertőzés a kaszpáz-3 deficiens MCF-7 sejtvonal számára is citotoxikus hatásúnak bizonyult, bár épp e sejtvonalat találtuk az egyik legkevésbé MTH-68/H érzékeny típusnak. Adataink alapján úgy tűnik, hogy az MTH-68/H fertőzést követő apoptotikus válasz iniciációjában sem a kaszpáz-8/extrinsic, sem a kaszpáz-9/intrinsic kaszpázkaszkád nem tekinthető elsődleges molekuláris mechanizmusnak. Ugyancsak e feltevést tűnnek alátámasztani a citotoxicitási vizsgálatok során tapasztaltak is, hiszen amíg az apoptózis közvetlen morfológiai és biokémiai markereinek vizsgálata a fertőzött sejtek részéről egy relatíve gyors apoptotikus „döntés”-re engednek következtetni, addig a mitokondriális enzimek működésén alapuló méréseink időben jóval később jelzik a sejttenyészetek pusztulását. Mindez azt valószínűsíti, hogy az apoptotikus válaszreakcióra vonatkozó celluláris döntési és végrehajtási folyamatok időben megelőzik a mitokondriális oxido-reduktív enzimrendszerek károsodását. A tapasztalt kaszpáz-3 aktiváció tehát feltehetően a klasszikus mitokondriális fehérjéktől induló intrinsic, valamint a halálreceptorok által mediált extrinsic apoptózis útvonalaktól független mechanizmusok hatására következik be.

Az apoptózist szabályozó fehérjék között központi helyen találjuk a p53 transzkripció faktorát. A p53 tumorszuppresszor daganatok progressziójában játszott szerepe ma már vitathatatlan, és egyre több adat áll rendelkezésünkre arra vonatkozólag is, hogy a p53 funkcióvesztő mutációi jelentősen fokozzák a daganatok hagyományos terápiákkal szembeni rezisztenciáját [130, 131].

Az egyes alkalmazott sejtvonalak genotípusára vonatkozó adatok, valamint saját kísérleteink eredményeinek elemzése alapján az MTH-68/H kiváltotta apoptózist, mint p53-független mechanizmust azonosítottuk, mely eredményt a klinikai alkalmazás szempontjából különösen fontosnak tartunk. Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy szabályozható p53 expresszióval rendelkező glioblastoma sejtekben az MTH-68/H-ra adott válaszban valódi eltérés nem mutatható ki sem p53-at expresszáló, sem p53 fehérjét nem tartalmazó sejtekben. Sőt, az MTH-68/H fertőzést wtp53 allélokat kifejező sejtekben sem kíséri a p53 transzkripció aktivitásának szignifikáns emelkedése. A p53-független citotoxicitásra vonatkozó adataink talán magyarázatul szolgálhatnak az MTH-68/H-val végrehajtott klinikai próbákra is, amelyekben előrehaladott, a konvencionális terápiákra rezisztens tumoros betegeket sikerrel részesítettek MTH-68/H terápiában [70, 71].

A p53-mal ellentétben, MTH-68/H fertőzött wtPC12 sejtekben mind a c-Myc, mind az NF $\kappa$ B DNS kötődésének mértékében felfedeztünk változásokat. A *c-myc* onkogén terméke, a p53-hoz hasonlóan, több humán daganatban – ovarium, emlő és colorectalis tumorok, kissejtes tüdőrák, lymphomák – megtalálható, sejtbioológiai hatásai pedig a p53-éval csaknem megegyezően széles skálán mozognak [132, 133]. A c-Myc által szabályozott gének között proliferációt, differenciációt és apoptózist serkentő géneket egyaránt találunk, ám a c-Myc egyes géncsoportokra gyakorolt hatására vonatkozó adatok egyelőre igencsak ellentmondásosak és nagymértékben függenek az adott sejt illetve szövet típusától. Klinikai szempontból lényeges, hogy a c-Myc dereguláció mértéke – mely jellemzően amplifikáció vagy fokozott transzkripció eredménye –, illetve az egyes tumorok malignitása szoros, inverz korrelációt mutat.

A c-Myc jelentős emelkedést mutat már az MTH-68/H fertőzés 4. órájától kezdődően és hasonló, bár talán kissé árnyaltabb c-Myc aktivitás figyelhető meg MTH-68/H kezelt HCT-116 tenyészetek EMSA vizsgálata során is. A szakirodalom jelenleg a c-Myc proapoptotikus irányú működését az apoptózis intrinsic jelpályáiban megtalálható elemekhez, elsősorban a mitokondriális citokróm-c kiáramláshoz és az azt követő kaszpáz-9 aktivációhoz köti. Így azonban, a gél-retardációs vizsgálataink során látott, MTH-68/H fertőzés alatt zajló c-Myc aktivitás relevanciája egyelőre nem világos.

Egyrészt, az általunk eddig e szempontból tanulmányozott, MTH-68/H fertőzött tumorsejtekben fellépő c-Myc aktivitás – a bemutatottakhoz hasonlóan, egységes képet mutatva – minden esetben kimutatható volt, másrészt viszont ezt nem kíséri az aktivált kaszpáz-3 akkumulációt megelőző kaszpáz-9 aktiváció.

Az NF $\kappa$ B, mely a kísérleti szituáció függvényében egyaránt lehet pro- és antiapoptotikus hatású is, ugyancsak az antivirális folyamatok egyik fontos mediátora [91, 134]. Kísérleteinkben e transzkripció faktor aktivációját is tapasztaltuk, mind MTH-68/H fertőzött PC12, mind HeLa sejtekben, bár mind az aktiváció kinetikája, mind a képződő DNS-kötő komplexek összetétele eltérő. Érdekes, hogy amíg az MTH-68/H iránt nagyobb érzékenységet mutató HeLa sejtekben az NF $\kappa$ B aktiváció csak a fertőzés 8. óráját követően mutatható ki, addig az NF $\kappa$ B DNS-kötődésének mértéke az MTH-68/H iránt kisebb fogékonyságot mutató PC12 sejtekben már a fertőzés 2. óráját követően megfigyelhető. Megfigyeléseinkre több elméleti magyarázat is adódik. Elképzelhető, hogy az irodalmi adatokkal összhangban, az NF $\kappa$ B, a fertőzött sejtípustól függően, az MTH-68/H fertőzés során is lehet pro- illetve antiapoptotikus hatású. Ugyanakkor az sem kizárható, hogy az NF $\kappa$ B alapvetően antiapoptotikus hatása HeLa sejtekben késleltetett vagy gátolt, így téve a HeLa sejteket az MTH-68/H fertőzés iránt fogékonyabbá, míg PC12 sejtekben a relatíve prompt megjelenő NF $\kappa$ B aktiváció valamelyest késlelteti az MTH-68/H infekcióra kibontakozó apoptotikus választ, melyet különböző kísérleti összeállításainkban csökkent MTH-68/H iránti érzékenységeként észlelünk. Minthogy a célsejtek NF $\kappa$ B státusza akár döntően is befolyásolhatja az MTH-68/H fertőzésre adott válaszreakciókat, az NF $\kappa$ B lehetséges szerepének tisztázása mindenképp fontosnak tűnik.

Az extrinsic és intrinsic kaszpáz utak MTH-68/H kiváltotta apoptózisban betöltött szerepét megkérdőjelező eredményeinkre az endoplazmatikus retikulum (ER) apoptotikus folyamatai szolgálhatnak magyarázatul. A kaszpáz-3 indukcióval jól korreláló kaszpáz-12 aktivációt (13. és *M<sub>2</sub> ábrák*) sikerült kimutatnunk PC12 modellünkben.

Így az ER stresszhatásokra indukálódó apoptotikus folyamatok kaspázainak kettős funkciója – a kaspáz-12 iniciátor és effektor kaspáz szerepét egyaránt leírták – értelmezhetővé tenné mind a kaspáz-3 pozitív sejtvonalakban tapasztalt kaspáz-8 és -9 független apoptotikus folyamatait, mind a kaspáz-3 deficiens MCF-7 sejtek pusztulását. Ugyancsak az ER, illetve a transzláció regulációjában fontos elemek lehetséges szerepére utalnak az NF $\kappa$ B aktivációra, valamint PERK és az eIF2 $\alpha$  foszforilációra vonatkozó megfigyeléseink is (14 és 15. ábra). Az eIF2 $\alpha$  foszforilációt a PC12 és MCF-7 sejtek mellett más rendszerekben is sikerült kimutatnunk. Ugyanakkor, amíg a fenti két sejtvonalban az eIF2 $\alpha$  foszforiláció az MTH-68/H fertőzést követően 10, illetve 12 órával jelenik meg, addig a nagyobb MTH-68/H érzékenységgű DU-145 sejtek esetében már a fertőzés 8. órájában igen nagy mértékű eIF2 $\alpha$  foszforilációt figyeltünk meg. Így az érzékenyebb humán vonalakon végzett vizsgálatainkat is figyelembe véve azt mondhatjuk, hogy az MTH-68/H érzékenység fokozódásával az eIF2 $\alpha$  foszforiláció időben is korábbra kerül. Ugyancsak sikerült kimutatnunk az eIF2 $\alpha$  foszforilációjáért felelős, endoplazmatikus retikulumban található kináz, a PERK, foszforilációját mely időben megelőzi a megfigyelt eIF2 $\alpha$  foszforilációt, így talán a döntő mozzanata lehet az MTH-68/H fertőzésre adott celluláris válasznak.

Megfigyeléseink mindenképp felhívják a figyelmet az MTH-68/H fertőzést követő sejtpusztulás hátterében álló komplex intracelluláris folyamatok következtében kibontakozó apoptotikus folyamatokra. Úgy tűnik, hogy ezek középpontjában a sejtek transzlációs gépezetéhez illetve az endoplazmatikus retikulum rendszerhez szorosan kötődő szabályozó mechanizmusok helyezkednek el. Az MTH-68/H fertőzést követő gyors PERK aktivációt – az adott sejt relatív MTH-68/H érzékenységgel korreláló módon, a megfigyelt eIF2 $\alpha$  foszforilációs események alapján – néhány órával később feltehetően a fehérjeszintézis egyensúlyának felborulása és az aktív kaspáz-12 endoplazmatikus retikulumból történő felszabadulása majd a kaspáz-3 aktivációja követheti. Elképzelhetőnek tűnik, hogy a transzformált sejtek fokozott fehérjeszintézise miatti ER-túlterheltség jelenti azt a közös tulajdonságot, amely a vizsgált sejtvonalakat fogékonyá teszi az onkolitikus vírusfertőzések iránt.

A túlterhelt ER sebezhetőbb egyensúlyának megbomlását könnyen előidézhetnék az eIF2 $\alpha$  foszforiláció hatására a fehérjeszintézis mintázatában bekövetkező változások, melyek végül a kibontakozó ER-stressz válasz eseményein keresztül a sejtek pusztulásához vezethetnek. Ez a feltételezés számunkra igen izgalmasnak tűnik és reményeink szerint a közeljövőben részletesebben is megvizsgálhatjuk az ER-stressz szabályozásában szerepet játszó további molekulákat.

A biztonságos, de hatékony virusterápia tehát mindaddig várat magára, amíg az intenzív kutatásoknak köszönhetően jobb betekintést nem nyerünk a virális onkolízis mechanizmusába, illetve megoldást nem nyernek a kezelés technikai kérdései. Ugyanakkor a virális onkolízis jelensége mögött rejlő molekuláris és sejt szintű mechanizmusok feltérképezése az új, alternatív terápiás megközelítések lehetősége mellett, talán az egyes daganattípusok sejtbiológiai sajátosságainak pontosabb megértéséhez is elvezet minket.

## **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

**Munkám során a legnagyobb segítséget Dr. Fehér Virág nyújtotta. Köszönöm!**

Ehelyütt is illik köszönetet mondanom témavezetőmnek, *Dr. Szeberényi József* egyetemi tanárnak, aki érdekesnek talált arra, hogy ezen a témán dolgozzam és akinek szakmai támogatása nélkül nem ölthetett volna formát dolgozatom, valamint Dr. Csatáry Lászlónak és a United Cancer Research Institute valamennyi munkatársának a rendelkezésemre bocsájtott kísérleti vakcináért és sokrétű támogatásukért.

Köszönet illeti továbbá *Vecsernyés Mónikát, Kiss Györgynét, Schäffer Rudolfnét, Dr. Lomniczi Bélát* és *Dr. Sáfrány Gézát* a kísérleti munkám során nyújtott segítségükért.



## ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

**Felhasznált anyagok.** A különböző kezelésekhez felhasznált anyagokat a következő gyártóktól szereztük be: anizomicin, Sigma-Aldrich (Steinheim, Németország); MTH-68/H: UCRI Hungary (Budapest, Magyarország).

**Sejtkultúrák.** A kísérleteinkhez felhasznált sejtvonalakat és a tenyésztésükhöz szükséges médiumok összetevőit az alábbi táblázatban foglaltam össze.

Sejttípus	Tenyésztési jellemző	Médium	Végző koncentráció	Gyártó	Katalógus szám
Panc-1 (pancreas adenocarcinoma)	Letapadó	RPMI 1640-Medium (benne L-Glutamin 2mM) fenolvörös nélkül FCS (Fetal Calf Serum) MEM Na-piruvat MEM non-essential amino acid solution	- 10 % 1 mM 1x	GIBCO GIBCO Sigma Sigma	11835-030 26010-074 S8636 M7145
HCT 116 (colon carcinoma.) HT-25 (colon carcinoma) HT-168-M1/9 (melanoma) HT199 (melanoma) WM983B (melanoma)	Letapadó Letapadó Letapadó Letapadó Letapadó	RPMI 1640-Medium (benne L-Glutamin 2mM) fenolvörösse! FCS (Fetal Calf Serum)	- 5 %	GIBCO GIBCO	21875-034 26010-074
DU-145 (prostate adenoc. agyi met.) NCI-H460 (pulm. cc. pleur. met.) PC-3 (prostate adenoc. csont met.) HT-29 (colon adenocarcinoma)	Letapadó Letapadó Letapadó Letapadó	DMEM, Ham's F12 (1:1) (benne L-Glutamin 2mM) FCS (Fetal Calf Serum)	- 10 %	GIBCO GIBCO	31330-038 26010-074
A431 (epidermoid carcinoma)	Letapadó	DMEM, Ham's F12 (1:1) (benne L-Glutamin 2mM) FCS (Fetal Calf Serum)	- 5 %	GIBCO GIBCO	31330-038 26010-074
U373 (glioblastoma) HeLa (cervix adenocarcinoma) MCF-7 (ductalis adenoc. mammae)	Letapadó Letapadó Letapadó	DMEM FBS (Fetal Bovine Serum)	- 10%	GIBCO GIBCO	41966-029 10106-169
LNZTA3WT4 (glioblastoma)	Letapadó	DMEM FBS (Fetal Bovine Serum) L-Glutamin Tetraciklin	- 10% 2 mM 1µg/ml	GIBCO GIBCO GIBCO Sigma	41966-029 10106-169 25030-024 T7660
PC12 (patkány phaeochromocytoma)	Letapadó	DMEM FBS (Fetal Bovine Serum) Horse serum	- 5% 10%	GIBCO GIBCO GIBCO	41966-029 10106-169 16050-122
Rat-1 (patkány fibroblaszt) NIH3T3 (egér fibroblaszt)	Letapadó	DMEM Calf Serum	- 10%	GIBCO GIBCO	41966-029 26170-043
Humán primér fibroblaszt	Letapadó	DMEM FBS (Fetal Bovine Serum)	- 20%	GIBCO GIBCO	41966-029 10106-169

**Citotoxicitás mérése WST-1 kolorimetriás módszerrel.** A WST-1 sejtproliferációs reagens egy steril, vízdékony sejtperméabilis tetrazólium só [4-(3-(4-jodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzén diszulfonát (**WST-1**)], mely a mitokondriális szukcinát-tetrazólium-reduktáz enzimrendszer segítségével 440-450 nm hullámhosszon spektrofotometriás úton mérhető formázán termékekké konvertálódik. E módszer során a tenyészetben jelenlévő metabolikusan aktív mitokondriumok segítségével következtetünk az élő sejtek számára. A módszer beállítása során szerzett tapasztalataink szerint a mért adatok  $5 \times 10^3$  és  $5 \times 10^4$  induló sejtszám esetén lineáris összefüggést mutatnak a sejtszámmal. Méréseink során a sejttípusoktól függően  $10^4$  -  $4 \times 10^4$  sejtet ültettünk ki 1 ml médiumban 24-lyukú lemezekre. 24 órával a kiültetést követően a letapadt és egészséges tenyészeteket MTH-68/H-val fertőztük, majd 72 órán át inkubáltuk. Pozitív kontrollként nagy dózisu (1µg/ml), fehérjeszintézist gátló anizomicin kezelést alkalmaztunk. Az inkubációt követően a médiumot 100 µl 10% WST-1 tartalmú médiumra cseréltük és az egyes sejtféleségek metabolikus jellemzőitől függően 90-240 percig inkubáltuk. A médiumokból 100 µl-es mintákat 96-lyukú ELISA lemezekre vittünk fel, majd az egyes minták formázán tartalmát spektrofotométerrel 440 nm-en határoztuk meg.

**Az infektív MTH-68/H partikulumok kvantitatív vizsgálata.** A meghatározás a Lomniczi által leírt [135] eljárás szerint a Budapesti Állatorvostudományi Egyetem virológiai laborjában, dr. Lomniczi Béla irányításával történt. A  $6 \times 10^8$  primér embriónális csirkesejtet a szövettanyészeti körülmények között 72 órán át fertőzött daganatsejtek tápfolyadékba 0,5 ml-ének felhasználásával 3 napig inkubáltuk. A fertőzött csirkesejtek ultrahang feltárását követően az intracelluláris virionok meghatározása ún. plakk esszéval történt.

**DNS fragmentáció vizsgálata.**  $3-5 \times 10^6$  sejtől 0,5% Triton X-100, 5 mM TRIS pH 7.4, 5 mM EDTA-t tartalmazó pufferrel történt lizálást követően fenol/kloroformos DNS extrakciót majd alkoholos kicsapást végeztünk éjszakán át  $-20^\circ\text{C}$ -on. Az így extrahált DNS-t TE pufferben feloldva (2mg/ml) RNáz A-val  $37^\circ\text{C}$ -on, 60 perces inkubációval tisztítottuk, majd 1,8%-os agaróz gélen elektroforézizáltuk. A nukleinsav fragmentumokat a gélben fluoreszcens festékkel tettük láthatóvá (SYBR Gold nucleic acid stain, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA).

**TUNEL-esszé.**  $10^5$  poly-L-lizinnel bevont fedőlemezre kiültetett sejtet 4%-paraformaldehid tartalmú 1X PBS ben  $4^\circ\text{C}$ -on 20 percig fixáltunk, majd 0,1% Triton X-100 tartalmú 1xPBS oldattal permeabilizáltunk szobahőmérsékleten 15 percig. Az egyes lépések között 3x5 percig 1X PBS oldattal mostuk a mintákat.

A permeabilizálást követően FITC-konjugált dUTP és terminális deoxynukleotid transzferáz felhasználásával nukleinsav-végjelölést hajtottunk végre a gyártó utasításainak megfelelően. A reakció befejeztével propidium-iodid háttérfestést végeztünk. A preparátumokat fluoreszcencia mikroszkóppal vizsgáltuk.

**Western-blot.** A fehérjekoncentrációk meghatározásához Bio Rad RC<sub>DC</sub> protein assay kolorimetriás módszert alkalmaztunk. A sejt lizátumokat 12%-os SDS tartalmú poliakrilamid gélben elektroforetizáltuk, majd éjszakán át BioRad Sequiblot PVDF membránra (Bio-Rad Hungary, Budapest) elektro-transzferáltuk. Az immunoblot analíziseket a gyártók előírásai szerint, a következő antitestekkel hajtottuk végre:

Antitest	Antitest típusa	Katalógus szám	Gyártó
foszfo-specifikus Mdm2 p53 foszfo-specifikus PTEN PTEN hasított kaspáz-3 hasított kaspáz-9 kaspáz-8 eIF2 $\alpha$ foszfo-specifikus eIF2 $\alpha$	Poliklonális, nyúl (ser166) Poliklonális, nyúl Poliklonális, nyúl (Ser388) Poliklonális, nyúl Poliklonális, nyúl Poliklonális, nyúl Poliklonális, nyúl Poliklonális, nyúl (Ser51)	#3521 #9282 #9551 #9552 #9661 #9507 #9746 #9722 #9721	Cell signaling (Beverly, MA, USA)
PERK foszfo-specifikus PERK	Poliklonális, nyúl Poliklonális, nyúl (Thr 981)	#sc-13073 #sc-32577-R	SantaCruz Biotechnology (SantaCruz, CA, USA)
Aktin (mAb, AB-1)	Monoklonális, egér IgM	#CP01	Oncogene (Merck Ltd., Budapest, Hungary)
Kaspáz-12	Poliklonális, nyúl	#BV-3182-3	MBL laboratories (Nagoya, Japan)

Az immunkomplexek vizualizálása erősített kemilumineszcens eljárással történt (ECL Plus Western blot detection system, Amersham Pharmacia Biotech AB., Uppsala, Sweden).

**Immunitokémia.** A poly-L-lizinnel fedett fedőlemezen tenyésztett sejteket a kezelést követően 4%-os friss paraformaldehiddel fixáltuk 4°C-on. A fixált sejteken az immunitokémiai vizsgálatot a felhasznált antitestek gyártóinak előírásai szerint hajtottuk végre, a készítményeket ProLong Antifade fedőanyaggal fedtük és 24 órán át 4°C-on szárítottuk majd Olympus FV-1000 pásztázó lézer konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

**Gél-retardációs (mobility shift) esszé. Az eljárást** Xu és Cooper által leírtak szerint [136] végeztük. A sejteket átmostuk jéghideg 1x-es foszfát pufferelt sóoldattal (1x PBS), majd 10x-es volumenű pufferben (10mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 0,5 mM DTT, Protease inhibitor Mini EDTA free tablets- Boehringer Mannheim) feloldottuk, jégen állni hagytuk 10 percig, erőteljes vortexezés után 10 mp-ig centrifugáltuk (13500rpm). A szedimentumként kapott magfrakciót újraszuszpendáltuk 2x-es volumenű pufferben (20mM HEPES, pH 7.9, 25% glicerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, Protease inhibitor Mini EDTA free tablets- Boehringer Mannheim), jégen állni hagytuk 20 percig, vortexezés után újra centrifugáltuk (10 min., 13500rpm). A felülúszóként kapott magfehérje oldatot -70°C-n tároltuk felhasználásig. A fehérje koncentrációt Bio-Rad RC<sub>DC</sub> Protein Assay segítségével fotometriás úton határoztuk meg. **Oligonukleotid-jelölés:** A vizsgálni kívánt transzkripció faktorok konszenzus szekvenciáit tartalmazó oligonukleotidokat Ready-To-Go T4 polynucleotide Kinase kit segítségével [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP-vel jelöltük a gyártó leírásnak megfelelően (Amersham Pharmacia Biotech). **DNS-fehérje kötődési reakció:** A -70°C-on tárolt fehérjemintákat jégen felolvasztottuk, 10  $\mu$ g/minta fehérjét szobahőmérsékleten inkubáltunk 4 $\mu$ l 5x-ös módosított Ziff puffer (10mM HEPES, pH 7.5, 10% glicerol, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA), 2 $\mu$ l 100 ng/ $\mu$ l poli d(I)d(C), illetve 1  $\mu$ g kompetitor oligonukleotid jelenlétében (a reakcióelegyet 20 $\mu$ l-re kiegészítettük desztillált vízzel). A kompetitorokat tartalmazó kontroll mintákat 15 percig előinkubáltuk. Az egyes mintákat 100 000 cpm jelölt kötőhelyspecifikus oligonukleotiddal egészítettük ki, majd szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk. **Elektroforézis:** 5% TBE (Trisz Base, Bórsav, EDTA) tartalmú nem denaturáló poliakrilamid gélben 1x TBE puffert használva elektroforetizáltunk (300mA, 200V, 2,5 óra). A gélt megszáritottuk, az értékelés Cyclone PhosphorImager-rel (Cyclone phosphor imager system Packard Instrument Co. Inc., Meriden, CT, USA) történt. A kísérleteinkhez felhasznált p53 konszenzus szekvenciát (5'-TACAGAACATGTCTAAGCATGCTGGGGACT-3') tartalmazó kettősláncú oligonukleotidokat a Santa Cruz Biotechnology Inc.-től (Santa Cruz, CA, USA), míg a c-Myc (5'-TGTGCGGCCACGTGTCGCGAGGCCCGG-3') és az NF $\kappa$ B (5'-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3') konszenzus szekvenciát tartalmazó kettősláncú oligonukleotidokat az Amitof-tól (Amitof, Boston, MA, USA) szereztük be.

# PUBLIKÁCIÓK

## Közlemények

**Fábián Zs.**, Törőcsik B., Kiss K., Csatáry L., Bodey B., Tigyi J., Csatáry, C., Szeberényi, J., Induction of apoptosis by a Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Anticancer Research*. 2001. Jan-Feb;21(1A):125-35. IF: 1,347 Citáció (idegen/összes): 5/6

Szeberényi J., **Fábián Zs.**, Törőcsik B., Kiss K., Csatáry L.. Newcastle Disease Virus-induced Apoptosis in PC12 Pheochromocytoma Cells. *American Journal of Therapeutics*. 2003. Jul-Aug;10(4):282-8.

Csatáry L. K., Gosztanyi G., Liszka V., **Fábián Zs.**, Szeberényi J., Csatáry C. M., MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *Journal of Neuro-oncology* 2004. Mar-Apr;67(1-2):83-93 IF: 1,568 Citáció (idegen/összes): 10/12

**Fábián Zs.**, Vecsernyés M., Pap M., Szeberényi J., The effects of a mutant p53 protein on the proliferation and differentiation of PC12 rat pheochromocytoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2006. DOI: 10.1002/jcb.21019 Megjelenés alatt IF.: 2,946

**Fábián Zs.**, Csatary C. M., Szeberényi J., Csatary L. K, p53 Independent Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Cytotoxicity of a Newcastle Disease Virus Strain in Tumor Cell Lines. *A kézirat bírálata alatt.*

Reglődi D., **Fábián Zs.**, Tamás A., Lubics A., Szeberényi J., Alexy T., Tóth K., Márton Zs., Borsiczky B., Róth E., Szalontay L., Lengvári I., Effects of PACAP on in vitro and in vivo apoptosis, platelet aggregation and production of reactive oxygen radicals. *Regulatory Peptides*, 2004. Dec. 15;123(1-3):51-9. IF: 2,235 (idegen/összes): 1/3

## Előadások

**Fábián Zs.**, Szeberényi, J., Apoptózis Newcastle-betegség vírussal fertőzött sejtekben. IX. Sejtlélettani és fejlődésbiológiai konferencia, Debrecen, 2001. január 21-24.

**Fábián Zs.**, Kiss K., Szeberényi J., Newcastle-betegség vírushatást követő jelátviteli folyamatok PC12 sejtekben. A Magyar Biokémiai Egyesület I. jelátviteli konferenciája, Eger, 2001. október 12-15.

**Fábián Zs.**, Szeberényi J. Newcastle-betegség vírus indukált apoptózis. I. PhD konferencia Pécs, 2003. január 15.

**Fábián Zs.**, Szeberényi, J., Apoptózis Newcastle-betegség vírus fertőzést követően XI. Sejtlélettani és fejlődésbiológiai Konferencia, Siófok, 2003. április 15-17.

**Fábián Zs.**, Kiss K., Szeberényi J., A Newcastle-betegség vírus fertőzés hatásai daganatos sejtenyészetekben. A Magyar Biokémiai Egyesület II. Jelátviteli Konferenciája, Hőgyész 2003. október 12-15.

**Fábián Zs.**, C.M. Csatáry, J. Szeberényi, L.K. Csatáry, p53 independent cytotoxicity of MTH-68/H in tumor cell lines. 6<sup>th</sup> WHMA Conference, Budapest, 2005. augusztus 25-27.

**Fábián Zs.**, M. Vecsernyés, M. Pap, J. Szeberényi, A p53 fehérje szerepe PC12 patkány pheochromocytoma sejtek differenciációjában Felkért előadás a „Fókuszban a celluláris kommunikáció” című tudományos találkozón, Pécs, 2006. április 13.

## Poszterek

**Fábián Zs.**, Törőcsik, B., Kiss K., Szeberényi J. Newcastle disease virus indukált apoptózis PC12 patkány pheochromocytoma sejtekben. VIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai napok Pécs, 2000. január 18-21.

**Fábián Zs.**, Kiss K., Törőcsik, B., Szeberényi J. Newcastle disease vírus vakcina (MTH-68/H) által indukált apoptózis PC12 patkány phaeochromocytoma sejtekben. PhD Tudományos Napok, 2000. február 16-19.

**Fábián Zs.**, Kiss K., Törőcsik, B., Szeberényi J. Newcastle disease vírus vakcina (MTH-68/H) által indukált apoptózis PC12 patkány phaeochromocytoma sejtekben. II. Magyar Sejtanalitikai Napok 2000., május 4-6. Idézhető absztrakt: Cytometry IF.: 2.2

**Fábián Zs.**, Kiss K., Törőcsik, B., Szeberényi J. Csatóry, L.K., Newcastle disease virus induced apoptosis in PC12 cells. International congress of molecular and cellular biology, Birmingham UK, 2000. július. 15-21.

**Fábián Zs.**, Törőcsik, B., Kiss, K., Szeberényi, J., Role of the signaling pathways in Newcastle disease virus induced apoptosis of PC12 cells. International Congress of Apoptosis, Athén, 2001. május 25-29. Idézhető absztrakt: Anticancer research Vol. 21, No 3A, 2001 IF.: 1.347

**Fábián Zs.**, Kiss K., Szeberényi J., Signaling events of viral induced apoptosis in PC12 cells. Európai biokémiai társaságok 26. találkozója - FEBS Meeting, Lisszabon 2001. június 29. - július 5. Idézhető absztrakt: Eur. J. Biochem. 2001. 268 Suppl. 1. pg. 71, IF.: 2.849

**Fábián Zs.**, Kiss K., Szeberényi J., Signalling events of viral induced apoptosis in PC12 cells. Európai biokémiai társaságok 27. találkozója - FEBS Meeting, Isztambul 2002. október 19-25. Idézhető absztrakt: Eur. J. Biochem. 2002. 269 Suppl. 1. pg. 76 IF.: 2.999

**Fábián Zs.**, Kiss K., Csatóry L. K., Csatóry C., Szeberényi J., Role of transcription factors in Newcastle disease virus induced apoptosis. Európai biokémiai társaságok 28. találkozója - FEBS Meeting, Brüsszel 2003. július 3-8. Idézhető absztrakt: Eur. J. Biochem. 2003. 270 Suppl. 1. pg. 113 IF.: 3.001

Reglődi D., **Fábián Zs.**, Tamás A., Szeberényi J., Lubics A., Alexy T., Tóth K., Márton Zs., Borsiczky B., Lengvári I., Possible factors for the neuroprotective effect of PACAP in focal cerebral ischemia. 6<sup>th</sup> international symposium on VIP, PACAP and related peptides, Hakone (Japán), 2003. szeptember 1-4. (Best poster award)

**Fábián Zs.**, Csatóry C.M., Csatóry L.K., Szeberényi J., Role of p53 in Newcastle disease virus induced cytotoxicity in tumor cell lines. 30<sup>th</sup>FEBS és 9<sup>th</sup> IUBMB konferencia, Budapest 2005. július 2-7. Absztrakt: FEBS Journal. 2005. 272 Suppl. 1. pg. 33.

Szeberényi J., Bátor J., Berta G., **Fabian Zs.**, Kiss K., Komáromy L., Pap M., Sétáló G., Taking an experimental approach in basic science education. 30<sup>th</sup>FEBS és 9<sup>th</sup> IUBMB konferencia, Budapest 2005. július 2-7. Absztrakt: FEBS Journal. 2005. 272 Suppl. 1. pg. 65.

### **Szabadalmi beadványok**

CSATARY, Laszlo, K.; SZEBERENYI, Joseph; **FABIAN, Zsolt**, Method for treating human tumor cells with a Newcastle disease virus strain and a chemotherapeutic agent. World Intellectual Property Organization, June 9, 2005, International publication number: WO 2005/051433 A1

CSATARY, Laszlo, K.; SZEBERENYI, Joseph; **FABIAN, Zsolt**, Method for treating human tumor cells with a Newcastle disease virus strain having a p53-independent oncolytic effect. World Intellectual Property Organization, June 9, 2005, International publication number: WO 2005/051330 A2

## FELHASZNÁLT IRODALOM

1. Uren, A.G. and D.L. Vaux, Molecular and clinical aspects of apoptosis. *Pharmacol Ther*, 1996. 72(1): p. 37-50.
2. Cory, S., et al., Insights from Bcl-2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation. *Cancer Res*, 1999. 59(7 Suppl): p. 1685s-1692s.
3. Dock, G., Rabies virus vaccination in a patient with cervical carcinoma. *Am J Med Sci*, 1904. 127: p. 563.
4. DePace, N.G., Sulla scomparsa di un enorme cancro vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica. *Ginecologica*, 1912. 9: p. 82.
5. Webb, H.E. and C.E. Smith, Viruses in the treatment of cancer. *Lancet*, 1970. 1(7658): p. 1206-8.
6. Mullen, J.T. and K.K. Tanabe, Viral oncolysis. *Oncologist*, 2002. 7(2): p. 106-19.
7. Shah, A.C., et al., Oncolytic viruses: clinical applications as vectors for the treatment of malignant gliomas. *J Neurooncol*, 2003. 65(3): p. 203-26.
8. Gross, S., Measles and leukaemia. *Lancet*, 1971. 1(7695): p. 397-8.
9. Asada, T., Treatment of human cancer with mumps virus. *Cancer*, 1974. 34(6): p. 1907-28.
10. Cassel, W.A. and R.E. Garrett, Newcastle Disease Virus As An Antineoplastic Agent. *Cancer*, 1965. 18: p. 863-8.
11. Lindemann, L., Viruses as immunological adjuvants in cancer. *BBA*, 1974. 355: p. 49-75.
12. Schirmacher, V., et al., Immunization with virus-modified tumor cells. *Semin Oncol*, 1998. 25(6): p. 677-96.
13. Schirmacher, V., et al., Human tumor cell modification by virus infection: an efficient and safe way to produce cancer vaccine with pleiotropic immune stimulatory properties when using Newcastle disease virus. *Gene Ther*, 1999. 6(1): p. 63-73.
14. Huebner, R.J., et al., Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer*, 1956. 9(6): p. 1211-8.
15. Martuza, R.L., et al., Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science*, 1991. 252(5007): p. 854-6.
16. Mineta, T., et al., Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat Med*, 1995. 1(9): p. 938-43.
17. Miyatake, S., et al., Transcriptional targeting of herpes simplex virus for cell-specific replication. *J Virol*, 1997. 71(7): p. 5124-32.
18. Markert, J.M., et al., Genetically engineered HSV in the treatment of glioma: a review. *Rev Med Virol*, 2000. 10(1): p. 17-30.
19. Markert, J.M., et al., Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther*, 2000. 7(10): p. 867-74.
20. Rampling, R., et al., Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Ther*, 2000. 7(10): p. 859-66.
21. Bischoff, J.R., et al., An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*, 1996. 274(5286): p. 373-6.
22. Rothmann, T., et al., Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J Virol*, 1998. 72(12): p. 9470-8.
23. Harada, J.N. and A.J. Berk, p53-independent and -dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication. *J Virol*, 1999. 73(7): p. 5333-44.
24. Dummer, R., et al., Biological activity and safety of adenoviral vector-expressed wild-type p53 after intratumoral injection in melanoma and breast cancer patients with p53-overexpressing tumors. *Cancer Gene Ther*, 2000. 7(7): p. 1069-76.
25. Yin, S., M.C. Hung, and D.W. Goodrich, Adenovirus-mediated N5 gene transfer inhibits tumor cell proliferation by induction of apoptosis. *Cancer Gene Ther*, 2000. 7(7): p. 985-90.
26. Rodriguez, R., et al., Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res*, 1997. 57(13): p. 2559-63.
27. Hallenbeck, P.L., et al., A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther*, 1999. 10(10): p. 1721-33.
28. Kurihara, T., et al., Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. *J Clin Invest*, 2000. 106(6): p. 763-71.
29. Vasey, P.A., et al., Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*, 2002. 20(6): p. 1562-9.
30. Reid, T., Hepatic artery infusion of ONYX-015 a replication-selective adenovirus, in combination with 5-FU/leucovorin for gastrointestinal carcinoma metastatic to the liver: A Phase I/II clinical trial. *PASCO*, 2000(19): p. 953.
31. Reid, T., et al., Hepatic arterial infusion of a replication-selective oncolytic adenovirus (dl1520): phase II viral, immunologic, and clinical endpoints. *Cancer Res*, 2002. 62(21): p. 6070-9.
32. Puhlmann, M., et al., Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy: biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant. *Cancer Gene Ther*, 2000. 7(1): p. 66-73.
33. Qin, H.X. and S.K. Chatterjee, Construction of recombinant vaccinia virus expressing GM-CSF and its use as tumor vaccine. *Gene Ther*, 1996. 3(1): p. 59-66.
34. Qin, H. and S.K. Chatterjee, Cancer gene therapy using tumor cells infected with recombinant vaccinia virus expressing GM-CSF. *Hum Gene Ther*, 1996. 7(15): p. 1853-60.
35. McLaughlin, J.P., et al., Immunization with a syngeneic tumor infected with recombinant vaccinia virus expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induces tumor regression and long-lasting systemic immunity. *J Immunother*, 1997. 20(6): p. 449-59.
36. Mastrangelo, M.J., et al., Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer Gene Ther*, 1999. 6(5): p. 409-22.
37. Mukherjee, S., et al., Replication-restricted vaccinia as a cytokine gene therapy vector in cancer: persistent transgene expression despite antibody generation. *Cancer Gene Ther*, 2000. 7(5): p. 663-70.
38. McCart, J.A., et al., Complex interactions between the replicating oncolytic effect and the enzyme/prodrug effect of vaccinia-mediated tumor regression. *Gene Ther*, 2000. 7(14): p. 1217-23.
39. Gromeier, M., et al., Intergenic poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(12): p. 6803-8.

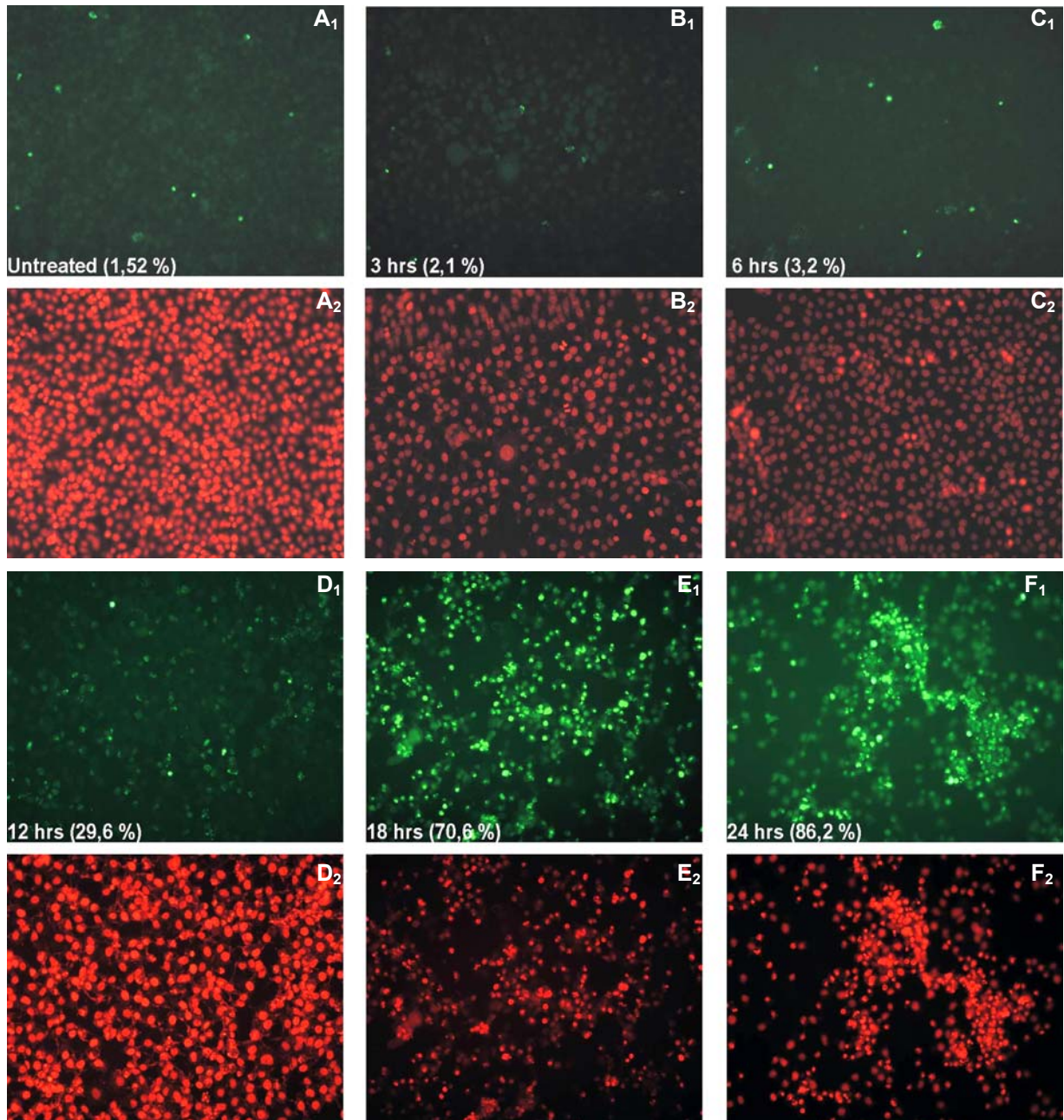
40. Khuri, F.R., et al., a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med*, 2000. 6(8): p. 879-85.
41. Ganly, I., et al., A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, 2000. 6(3): p. 798-806.
42. Heise, C., et al., Efficacy of a replication-selective adenovirus against ovarian carcinomatosis is dependent on tumor burden, viral replication and p53 status. *Gene Ther*, 2000. 7(22): p. 1925-9.
43. DeWeese, T.L., et al., A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy. *Cancer Res*, 2001. 61(20): p. 7464-72.
44. Chen, Y., et al., CV706, a prostate cancer-specific adenovirus variant, in combination with radiotherapy produces synergistic antitumor efficacy without increasing toxicity. *Cancer Res*, 2001. 61(14): p. 5453-60.
45. Yu, D.C., et al., Antitumor synergy of CV787, a prostate cancer-specific adenovirus, and paclitaxel and docetaxel. *Cancer Res*, 2001. 61(2): p. 517-25.
46. Kim, S.H., et al., Combination of mutated herpes simplex virus type 1 (G207 virus) with radiation for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer*, 2005. 41(2): p. 313-22.
47. Nakano, K., et al., Enhanced efficacy of conditionally replicating herpes simplex virus (G207) combined with 5-fluorouracil and surgical resection in peritoneal cancer dissemination models. *J Gene Med*, 2005.
48. Cinatl, J., Jr., et al., Potent oncolytic activity of multimutated herpes simplex virus G207 in combination with vincristine against human rhabdomyosarcoma. *Cancer Res*, 2003. 63(7): p. 1508-14.
49. Bennett, J.J., et al., Comparison of safety, delivery, and efficacy of two oncolytic herpes viruses (G207 and NV1020) for peritoneal cancer. *Cancer Gene Ther*, 2002. 9(11): p. 935-45.
50. Oyama, M., et al., Treatment of human renal cell carcinoma by a conditionally replicating herpes vector G207. *J Urol*, 2001. 165(4): p. 1274-8.
51. Varghese, S., et al., Preclinical safety evaluation of G207, a replication-competent herpes simplex virus type 1, inoculated intraprostatically in mice and nonhuman primates. *Hum Gene Ther*, 2001. 12(8): p. 999-1010.
52. Wallack, M.K., et al., Surgical adjuvant active specific immunotherapy for patients with stage III melanoma: the final analysis of data from a phase III, randomized, double-blind, multicenter vaccinia melanoma oncolysate trial. *J Am Coll Surg*, 1998. 187(1): p. 69-77; discussion 77-9.
53. Chatterjee, S.K., et al., Recombinant vaccinia virus expressing cytokine GM-CSF as tumor vaccine. *Anticancer Res*, 1999. 19(4B): p. 2869-73.
54. Hashiro, G., P.C. Loh, and J.T. Yau, The preferential cytotoxicity of reovirus for certain transformed cell lines. *Arch Virol*, 1977. 54(4): p. 307-15.
55. Duncan, M.R., S.M. Stanish, and D.C. Cox, Differential sensitivity of normal and transformed human cells to reovirus infection. *J Virol*, 1978. 28(2): p. 444-9.
56. Strong, J.E., D. Tang, and P.W. Lee, Evidence that the epidermal growth factor receptor on host cells confers reovirus infection efficiency. *Virology*, 1993. 197(1): p. 405-11.
57. Strong, J.E. and P.W. Lee, The v-erbB oncogene confers enhanced cellular susceptibility to reovirus infection. *J Virol*, 1996. 70(1): p. 612-6.
58. Strong, J.E., et al., The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *Embo J*, 1998. 17(12): p. 3351-62.
59. van Regenmortel et al., The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2000.
60. Peeters, B.P., et al., Genome replication of Newcastle disease virus: involvement of the rule-of-six. *Arch Virol*, 2000. 145(9): p. 1829-45.
61. Calain, P. and L. Roux, The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol*, 1993. 67(8): p. 4822-30.
62. Lorence, R.M., P.A. Rood, and K.W. Kelley, Newcastle disease virus as an antineoplastic agent: induction of tumor necrosis factor-alpha and augmentation of its cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst*, 1988. 80(16): p. 1305-12.
63. Cassel, W.A., D.R. Murray, and H.S. Phillips, A phase II study on the postsurgical management of Stage II malignant melanoma with a Newcastle disease virus oncolysate. *Cancer*, 1983. 52(5): p. 856-60.
64. Reichard, K.W., et al., Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells. *J Surg Res*, 1992. 52(5): p. 448-53.
65. Reichard, K.W., et al., Retinoic acid enhances killing of neuroblastoma cells by Newcastle disease virus. *J Pediatr Surg*, 1993. 28(10): p. 1221-5; discussion 1225-6.
66. Csatory, L.K., et al., Attenuated veterinary virus vaccine for the treatment of cancer. *Cancer Detect Prev*, 1993. 17(6): p. 619-27.
67. Batiwalla, F.M., et al., A 15-year follow-up of AJCC stage III malignant melanoma patients treated postsurgically with Newcastle disease virus (NDV) oncolysate and determination of alterations in the CD8 T cell repertoire. *Mol Med*, 1998. 4(12): p. 783-94.
68. Csatory, L.K., et al., Preliminary report of a controlled trial of MTH-68/B virus vaccine treatment in acute B and C hepatitis: a phase II study. *Anticancer Res*, 1998. 18(2B): p. 1279-82.
69. Csatory, L.K., R. Schnabel, and T. Bakacs, Successful treatment of decompensated chronic viral hepatitis by bursal disease virus vaccine. *Anticancer Res*, 1999. 19(1B): p. 629-33.
70. Csatory, L.K., et al., Beneficial treatment of patients with advanced cancer using a Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H). *Anticancer Res*, 1999. 19(1B): p. 635-8.
71. Csatory, L.K., et al., MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *J Neurooncol*, 2004. 67(1-2): p. 83-93.
72. Ries, S.J. and C.H. Brandts, Oncolytic viruses for the treatment of cancer: current strategies and clinical trials. *Drug Discov Today*, 2004. 9(17): p. 759-68.
73. Czeglédi, A., E. Wehmann, and B. Lomniczi, On the origins and relationships of Newcastle disease virus vaccine strains Hertfordshire and Mukteswar, and virulent strain Herts'33. *Avian Pathol*, 2003. 32(3): p. 271-6.
74. Rodrigues, N.R., et al., p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(19): p. 7555-9.
75. Bunz, F., et al., Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, 1998. 282(5393): p. 1497-501.
76. Gurova, K.V., et al., Cooperation of two mutant p53 alleles contributes to Fas resistance of prostate carcinoma cells. *Cancer Res*, 2003. 63(11): p. 2905-12.
77. Moore, P.S., et al., Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch*, 2001. 439(6): p. 798-802.

78. Balcer-Kubiczek, E.K., et al., p53 mutational status and survival of human breast cancer MCF-7 cell variants after exposure to X rays or fission neutrons. *Radiat Res*, 1995. 142(3): p. 256-62.
79. Graham, K.A., et al., Varying degrees of amplification of the N-ras oncogene in the human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res*, 1985. 45(5): p. 2201-5.
80. Hoppe-Seyler, F. and K. Butz, Repression of endogenous p53 transactivation function in HeLa cervical carcinoma cells by human papillomavirus type 16 E6, human mdm-2, and mutant p53. *J Virol*, 1993. 67(6): p. 3111-7.
81. Shono, T., et al., Apoptosis induced by adenovirus-mediated p53 gene transfer in human glioma correlates with site-specific phosphorylation. *Cancer Res*, 2002. 62(4): p. 1069-76.
82. Reiss, M., et al., Status of the p53 tumor suppressor gene in human squamous carcinoma cell lines. *Oncol Res*, 1992. 4(8-9): p. 349-57.
83. Frappa, J., et al., Production of IFN beta with human fibroblasts in monolayer cultures. Comparative studies of induction with virus (NDV) and synthetic polynucleotides (poly I - poly C). *Dev Biol Stand*, 1981. 50: p. 185-92.
84. Zawatzky, R. and H. Wurmbaek, Downregulation of Newcastle disease virus (NDV)-dependent IFN-alpha/beta production in macrophages by IFN-induced gene products of the locus If-1. *Res Immunol*, 1992. 143(1): p. 57-63.
85. Lam, K.M. and A.C. Vasconcelos, Newcastle disease virus-induced apoptosis in chicken peripheral blood lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol*, 1994. 44(1): p. 45-56.
86. Lam, K.M., A.C. Vasconcelos, and A.A. Bickford, Apoptosis as a cause of death in chicken embryos inoculated with Newcastle disease virus. *Microb Pathog*, 1995. 19(3): p. 169-74.
87. Lam, K.M., Apoptosis in chicken embryo fibroblasts caused by Newcastle disease virus. *Vet Microbiol*, 1995. 47(3-4): p. 357-63.
88. Lam, K.M., Newcastle disease virus-induced apoptosis in the peripheral blood mononuclear cells of chickens. *J Comp Pathol*, 1996. 114(1): p. 63-71.
89. Williams, B.R., PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene*, 1999. 18(45): p. 6112-20.
90. Xu, C., B. Bailly-Maitre, and J.C. Reed, Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest*, 2005. 115(10): p. 2656-64.
91. Robbins, M.A., et al., Nuclear factor-kappaB translocation mediates double-stranded ribonucleic acid-induced NIT-1 beta-cell apoptosis and up-regulates caspase-12 and tumor necrosis factor receptor-associated ligand (TRAIL). *Endocrinology*, 2003. 144(10): p. 4616-25.
92. Levine, A.J., p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 1997. 88(3): p. 323-31.
93. Haupt, S., et al., Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*, 2003. 116(Pt 20): p. 4077-85.
94. Fabian, Z., et al., The effects of a mutant p53 protein on the proliferation and differentiation of PC12 rat pheochromocytoma cells. *J Cell Biochem*, 2006. (In press).
95. Hughes, A.L., et al., Mediation of nerve growth factor-driven cell cycle arrest in PC12 cells by p53. Simultaneous differentiation and proliferation subsequent to p53 functional inactivation. *J Biol Chem*, 2000. 275(48): p. 37829-37.
96. Soengas, M.S., et al., Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science*, 1999. 284(5411): p. 156-9.
97. Vaux, D.L., Apoptosis timeline. *Cell Death Differ*, 2002. 9(4): p. 349-54.
98. Vaux, D.L. and A. Strasser, The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(6): p. 2239-44.
99. Budihardjo, I., et al., Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999. 15: p. 269-90.
100. Boyce, M., A. Degterev, and J. Yuan, Caspases: an ancient cellular sword of Damocles. *Cell Death Differ*, 2004. 11(1): p. 29-37.
101. Fischer, H., et al., Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 293(2): p. 722-6.
102. Momoi, T., Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J Chem Neuroanat*, 2004. 28(1-2): p. 101-5.
103. Philchenkov, A., Caspases: potential targets for regulating cell death. *J Cell Mol Med*, 2004. 8(4): p. 432-44.
104. Troy, C.M., et al., Death in the balance: alternative participation of the caspase-2 and -9 pathways in neuronal death induced by nerve growth factor deprivation. *J Neurosci*, 2001. 21(14): p. 5007-16.
105. van Loo, G., et al., The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ*, 2002. 9(1): p. 20-6.
106. Cory, S., D.C. Huang, and J.M. Adams, The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, 2003. 22(53): p. 8590-607.
107. Burlacu, A., Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med*, 2003. 7(3): p. 249-57.
108. Krakauer, D.C. and R.J. Payne, The evolution of virus-induced apoptosis. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1997. 264(1389): p. 1757-62.
109. Bellacosa, A., et al., A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*, 1991. 254(5029): p. 274-7.
110. Dawson, C.W., et al., Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J Biol Chem*, 2003. 278(6): p. 3694-704.
111. Portis, T. and R. Longnecker, Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway. *Oncogene*, 2004. 23(53): p. 8619-28.
112. Yu, Y. and J.C. Alwine, Human cytomegalovirus major immediate-early proteins and simian virus 40 large T antigen can inhibit apoptosis through activation of the phosphatidylinositide 3'-OH kinase pathway and the cellular kinase Akt. *J Virol*, 2002. 76(8): p. 3731-8.
113. Yuan, H., et al., Simian virus 40 small tumor antigen activates AKT and telomerase and induces anchorage-independent growth of human epithelial cells. *J Virol*, 2002. 76(21): p. 10685-91.
114. Hawkins, C.J., et al., Inhibition of interleukin 1 beta-converting enzyme-mediated apoptosis of mammalian cells by baculovirus IAP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(24): p. 13786-90.
115. Ray, C.A., et al., Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell*, 1992. 69(4): p. 597-604.
116. Polster, B.M., J. Pevsner, and J.M. Hardwick, Viral Bcl-2 homologs and their role in virus replication and associated diseases. *Biochim Biophys Acta*, 2004. 1644(2-3): p. 211-27.
117. Vaux, D.L., Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(3): p. 786-9.
118. Balachandran, S., et al., Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. *J Virol*, 2000. 74(3): p. 1513-23.

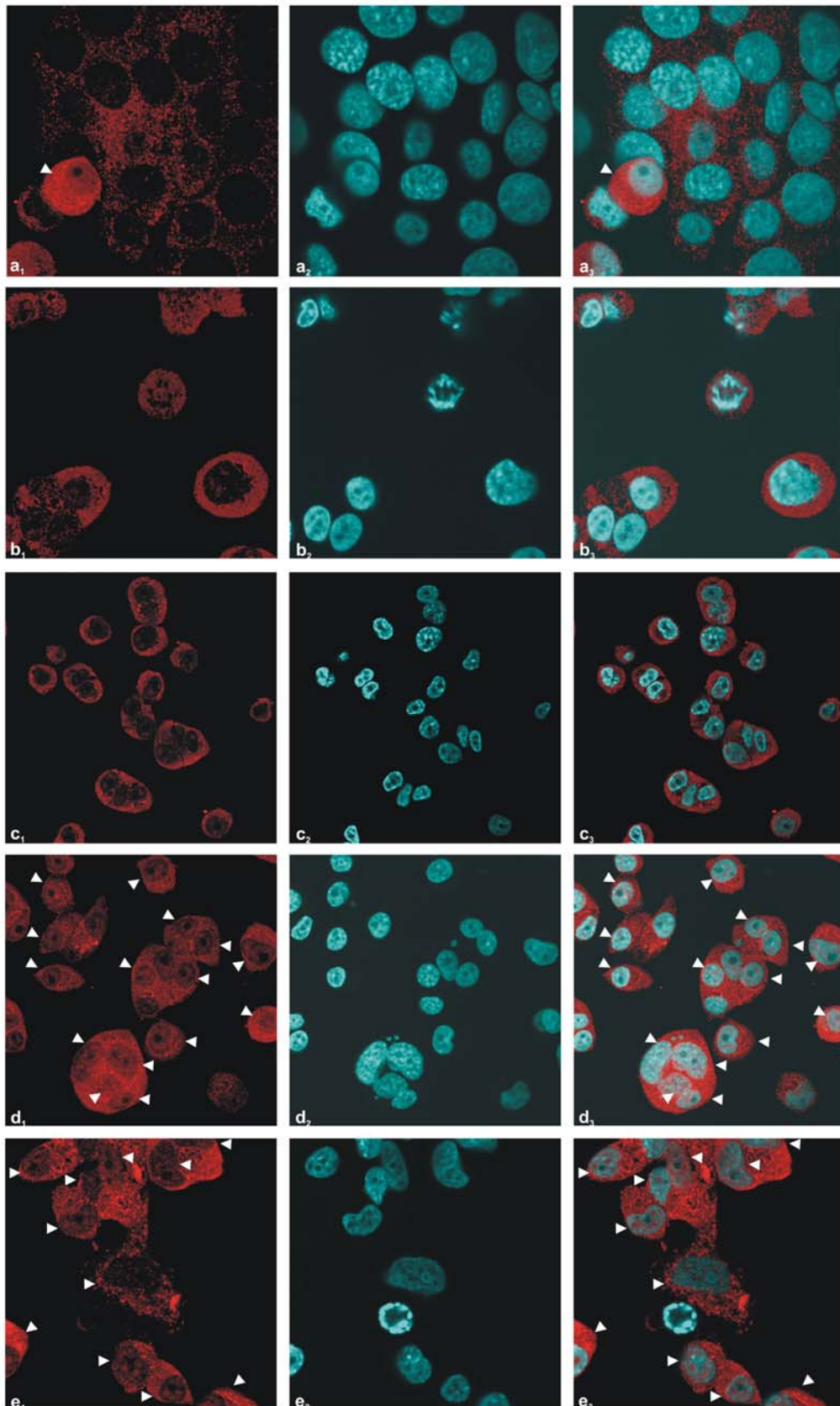
119. Balachandran, S., et al., Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity*, 2000. 13(1): p. 129-41.
120. Der, S.D. and A.S. Lau, Involvement of the double-stranded-RNA-dependent kinase PKR in interferon expression and interferon-mediated antiviral activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(19): p. 8841-5.
121. Gliedman, J.B., J.F. Smith, and D.T. Brown, Morphogenesis of Sindbis virus in cultured *Aedes albopictus* cells. *J Virol*, 1975. 16(4): p. 913-26.
122. Moriishi, K., M. Koura, and Y. Matsuura, Induction of Bad-mediated apoptosis by Sindbis virus infection: involvement of pro-survival members of the Bcl-2 family. *Virology*, 2002. 292(2): p. 258-71.
123. Westendorp, M.O., et al., Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature*, 1995. 375(6531): p. 497-500.
124. Sastry, K.J., et al., Expression of human immunodeficiency virus type I tat results in down-regulation of bcl-2 and induction of apoptosis in hematopoietic cells. *Oncogene*, 1996. 13(3): p. 487-93.
125. Yamada, T., et al., The human T-cell leukemia virus type I Tax protein induces apoptosis which is blocked by the Bcl-2 protein. *J Virol*, 1994. 68(5): p. 3374-9.
126. Morita, E. and K. Sugamura, Human parvovirus B19-induced cell cycle arrest and apoptosis. *Springer Semin Immunopathol*, 2002. 24(2): p. 187-99.
127. Hsu, T.C., et al., Human parvovirus B19 non-structural protein (NS1) induces apoptosis through mitochondria cell death pathway in COS-7 cells. *Scand J Infect Dis*, 2004. 36(8): p. 570-7.
128. Poole, B.D., Y.V. Karetnyi, and S.J. Nades, Parvovirus B19-induced apoptosis of hepatocytes. *J Virol*, 2004. 78(14): p. 7775-83.
129. Roulston, A., R.C. Marcellus, and P.E. Branton, Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol*, 1999. 53: p. 577-628.
130. Bunz, F., et al., Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest*, 1999. 104(3): p. 263-9.
131. Johnstone, R.W., A.A. Ruefli, and S.W. Lowe, Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 2002. 108(2): p. 153-64.
132. Garte, S.J., The c-myc oncogene in tumor progression. *Crit Rev Oncog*, 1993. 4(4): p. 435-49.
133. Pelengaris, S. and M. Khan, The many faces of c-MYC. *Arch Biochem Biophys*, 2003. 416(2): p. 129-36.
134. Aggarwal, B.B. and Y. Takada, Pro-apoptotic and anti-apoptotic effects of tumor necrosis factor in tumor cells. Role of nuclear transcription factor NF-kappaB. *Cancer Treat Res*, 2005. 126: p. 103-27.
135. Lomniczi, B., Studies on interferon production and interferon sensitivity of different strains of Newcastle disease virus. *J Gen Virol*, 1973. 21(2): p. 305-13.
136. Xu, W. and G.M. Cooper, Identification of a candidate c-mos repressor that restricts transcription of germ cell-specific genes. *Mol Cell Biol*, 1995. 15(10): p. 5369-75.



## MELLÉKLET



**M<sub>1</sub> ábra. MTH-68/H fertőzött HeLa sejtek TUNEL vizsgálata.** A<sub>1</sub>-F<sub>1</sub> panelek: TUNEL pozitív apoptotikus sejtek; A<sub>2</sub>-F<sub>2</sub> panelek: a teljes sejtpopulációk megjelenítése propidium-jodid magfestéssel. **A** panelek: Kezeletlen HeLa kultúra. **B** panelek: 3 órás, **C** panelek: 6 órás, **D** panelek: 12 órás, **E** panelek: 18 órás, **F** panelek: 24 órás MTH-68/H kezelést követő TUNEL pozitívítás arányát mutatják. Olympus BX-61, 20x objektív.



**M<sub>2</sub> ábra. ER-stressz aktivált kaszpáz-12 nukleáris transzlokációja MTH-68/H fertőzött PC12 sejtekben.** A kaszpáz-12 ellen termelt primér antitest detektálása Cy3-konjugált másodlagos antitesttel történt (a<sub>1</sub>-e<sub>1</sub> panelek). A sejtmagokat Hoechst 33258-cal festettük (a<sub>2</sub>-e<sub>2</sub> panelek). Az a<sub>3</sub>-e<sub>3</sub> panelek a két festést együtt ábrázolják. Az a panelek kezeletlen, míg a b-e panelek 4, 6, 10 és 24 órán át MTH-68/H-val fertőzött PC12 sejteket mutatnak, a kaszpáz-12 nukleáris transzlokációját fehér háromszögek jelzik. Olympus FV-1000 lézer konfokális mikroszkóp, 60x immerziós objektív.