

Zárójelentés

A gliomák kezelésében a sebészeti beavatkozás mellett a sugárterápiának van a legfontosabb szerepe. A sugárterápia hatékonyságát viszont nagymértékben gyengíti, hogy a gliomák jelentős része sugárrezisztens és így a daganatok nem reagálnak megfelelően a terápiára. A sugárrezisztenciának az egyik legfontosabb oka a tumorban kialakuló hipoxiás területek jelenléte. Mivel az ionizáló sugárzás a DNS károsító hatását oxigén szabadgyökök jelenlétében képes csak kifejteni, ezek hiánya a hipoxiás sejteknek nagyfokú sugárrezisztenciát kölcsönöz.

Pályázatunk fő célja volt a sugárrezisztens, és különösen a hipoxiás daganatsejtek sugárterápiával szembeni érzékenységének fokozása génterápiás módszerekkel.

Egy úgynevezett „gene-directed enzyme prodrug therapy” (GDEPT), vagyis génvezérelt enzim prodrug terápia nevű eljárást kívántunk alkalmazni. Az eljárás lényege, hogy a daganatsejtek érzékenységét szelektíven megnöveljük bizonyos kemoterápiás szerekkel szemben. Ehhez olyan kemoterápiás szert kell alkalmazni, amelyik alapállapotban inaktív (úgynevezett prodrug), metabolikus aktivációja sejten belül, specifikus enzim, vagy enzimek segítségével történik. Az eljárás során a daganatba bejuttatjuk a metabolizáló enzim génjét és ezzel egy fokozott génexpressziót, valamint enzim aktivációt hozunk létre. A kemoterápiás szer aktivációja fokozódik azokban a sejtekben, amelyek fokozottan termelik a metabolizáló enzimet.

Amennyiben a daganat sugárérzékenységét kívánjuk fokozni, az eljárás során olyan kemoterápiás prodrogot alkalmazunk, amelyiknek sugárérzékenyítő tulajdonságai is vannak. A klinikai gyakorlatban több, önmagában is széles körben alkalmazott kemoterápiás szerről kiderült, hogy több-kevesebb sugárérzékenyítő hatással rendelkezik. Ezek közül néhánynak a metabolikus aktivációja sejten belül meghatározott enzimhez, vagy enzimekhez köthető, ezért ideális célpontjai a GDEPT eljárásnak.

Két, eltérő hatásmechanizmussal működő sugárérzékenyítő anyag hatását kívántuk génterápiás módszerrel fokozni kísérletes glioma modelleken.

Az első rendszerben a gemcitabin toxikus és sugárérzékenyítő hatását kívántuk fokozni úgy, hogy a daganatsejtekben szelektíven megnöveltük a gemcitabin metabolikus aktivációjáért felelős deoxicitidin kináz (dCK) enzim aktivitását egy dCK-t kódoló adenovírus vektornak a daganatsejtekbe való juttatásával.

A második rendszerben a tirapazamin (TPZ) hipoxiás sugárérzékenyítő szer hatását kívántuk fokozni úgy, hogy a TPZ aktivációjáért felelős NADPH-citokróm P450 reduktáz (hu-N-CPR) enzim génjét adenovírus vektorba klónoztuk és bejuttattuk a daganatsejtekbe.

AGYTUMOROK SUGÉRÉRZÉKENYÍTÉSE GEMCITABIN KEMOTERÁPIA ÉS GÉNTERÁPIA KOMBINÁLÁSÁVAL

A gemcitabin egy széles körben alkalmazott kemoterápiás szer, amely önmagában, vagy más kemoterápiás szerekkel kombinálva igen jó terápiás hatással rendelkezik. Ugyanakkor azt is megfigyelték, mind állatkísérletes rendszerekben, mind klinikai környezetben, hogy jelentős sugárérzékenyítő hatása is van. A gemcitabin egy citidin analóg, amely a DNS replikáció

során a citidinnel kompetícióban áll, beépül a DNS láncba és gátolja annak replikációját. A gemcitabin önmagában inaktív, aktivációja sejten belül egy többlépcsős foszforiláció során megy végbe, és a trifoszfát származék épül be a DNS láncba. A metabolizáció kulcsenzime a gemcitabin-monofoszfát keletkezéséért felelős deoxicitidin kináz (továbbiakban dCK) enzim.

1. A glioma sejtvonalak dCK aktivitása és Gemcitabin érzékenysége.

A dCK génterápia sugár- és gyógyszerérzékenyítő hatását három glioma sejtvonalon vizsgáltuk: az egér GL261, a humán U373 és a patkány C6 gliomákon. Meghatároztuk a három sejtvonal alap dCK aktivitását, valamint tanulmányoztuk, hogy milyen összefüggés van a sejtvonalak dCK aktivitása és Gemcitabin érzékenysége között.

Mindhárom sejtvonalon megmértük a teljes és a specifikus dCK aktivitást. Jelentős különbségeket találtunk a sejtvonalak között. (1. táblázat). Mind a teljes, mind a specifikus dCK aktivitás a GL261 sejtvonalban volt a legnagyobb, a teljes és specifikus aktivitás közötti különbség pedig a C6 sejtekben volt a legjelentősebb.

Tanulmányoztuk a sejtvonalak Gemcitabin érzékenységét. A sejtek tápoldatához Gemcitabint adtunk különböző koncentrációban, majd 3 nap múlva meghatároztuk a túlélő frakciót, amit a kezeletlen kontrollhoz viszonyítottunk. Itt is nagy különbségeket találtunk a sejtvonalak között. A GL261 sejtvonal a legérzékenyebb, az U373 pedig a legrezisztensebb a gyógyszerre. A következő IC_{50} értékeket találtuk: 11nM a GL261, 39nM a C6 és 282 nM az U373 sejtvonal esetében.

2. A dCK enzim aktivitása és toxicitása a dCK enzimet túltermelő gliomasejtekben

A dCK enzim aktivitásának mérésére a sejteket 0, 20, 100, illetve 300 v/s arányban fertőztük Ad-hu-dCK-val. A vírusvektorral való fertőzésnek nagymértékű citotoxikus hatása volt a GL261 és az U373 sejtekre, a C6 sejtvonalra viszont a toxicitás gyakorlatilag elhanyagolható mértékű volt: míg a GL261 sejtek 100 v/s arányban történő fertőzése után 21% túlélő sejt maradt, a C6 sejtvonalon 300v/s transzdukciós aránynál is 82%. Ez a toxikus hatás az általunk sejtekbe juttatott dCK-t kódoló génnek tulajdonítható, nem pedig a vírusvektornak, ugyanis elvégeztük ugyanezeket a kísérleteket ugyanezzel a vírusvektorral, amely a dCK gén helyett LacZ-t tartalmazott, és nem találtunk toxicitást.

A vírustranszdukció hatására a dCK aktivitás jelentősen megemelkedett valamennyi sejtvonalban, a különböző alapaktivitások ellenére (1. táblázat). Tanulmányoztuk a dCK enzimaktivitás időkinetikáját GL261 sejtvonalon dCK génbevitelt követően. Már 24 óra elteltével megnövekedett dCK aktivitást kaptunk. Ez a hatás tartós, még a vírusfertőzés utáni 7-ik napon is az alapaktivitás értékének kétszerese volt (1. ábra).

Ha olyan vírus/sejt arányt alkalmaztunk, ahol a transzdukciós hatások közel azonosak voltak valamennyi sejtvonalban, akkor az enzimaktivitások azonos értékeket mutattak. A GL261 és U373 sejtekben a dCK enzim szintje 100v/s aránynál elérte a 8,03 illetve 8.16 nmol/óra/mg értéket. A GL261 sejtekben a 300 v/s aránynál az enzimaktivitást nem tudtuk meghatározni az Ad-hu-dCK magas toxicitása miatt. Az enzim szintje vírustranszdukció hatására legjobban a C6 sejtekben növekedett, az alapaktivitás 140-szeresére. 300v/s fertőzési aránynál – ahol a transzdukciós hatások közelítették a másik két sejtvonalhoz – az enzimaktivitás ennél a sejtvonalnál is elérte a 8,3 nmol/óra/mg értéket.

3. A gliomasejtek érzékenysége ionizáló sugárzás és Gemcitabin kombinált hatására *in vitro* sejtenyészetben

A kombinált hatások tanulmányozásához a kísérleti protokollban figyelembe vettük a sejtek eltérő érzékenységét a gyógyszerre, valamint a transzdukciós hatásokban és a vírus toxicitásában észlelt különbségeket is. A gyógyszer-koncentrációkat úgy választottuk meg, hogy a három sejtvonalban vírustranszdukció nélkül hasonló mértékű, viszonylag alacsony

toxicitást érjünk el (60-80% túlélés). A következő koncentrációkat használtuk: 5 nM a GL261, 25 nM a C6 és 250 nM az U373 sejtek esetében. A sejtek vírussal való fertőzéséhez olyan vírus/sejt arányt használtunk, amelyeknél egyrészt a transzdukciós hatások, másrészt a dCK aktivitás is közel egyenlő a három sejtvonalban: 20 v/s a GL261, 100 v/s a U373, és 300 v/s a C6 sejtekben. Ezeknél az értékeknél a transzdukciós hatások mindhárom sejtvonalban 65-75%, az enzimaktivitás pedig a C6 és U373 sejtvonalakban 8 nmol/óra/mg fehérje körüli volt, a GL261-ben pedig 4 nmol/óra/mg fehérje. A GL261-ben kénytelenek voltunk ezt az optimálisnál kisebb transzdukciós arányt használni a vírus magas toxicitása miatt.

A besugárzással kombinált kísérletekben a sejteket 4 Gy ^{60}Co - γ sugarakkal kezeltük, e dózis önmagában 35–50%-os túlélési arányt eredményezett.

Az általunk választott fertőzési arányok alkalmazásával a dCK túltermelésnek mérsékelte, de eltérő toxikus hatása volt a három sejtvonalra: 35, 60 és 80%-os volt a túlélési arány a GL261, U363 és C6 sejtekben. A dCK enzim túltermelésének önmagában nem volt sugárérzékenyítő hatása.

A Gemcitabinnak önmagában enyhe, de szignifikáns sugárérzékenyítő hatása volt a GL261 sejtvonalra. A másik két sejtvonalon csupán additív hatást értünk el a Gemcitabin és besugárzás kombinálásával.

A dCK enzim szintjének sejten belüli növelése mindhárom sejtvonalon fokozta a Gemcitabin toxicitását, de az érzékenyítés mértéke különböző volt. A legkevésbé a GL261 sejteken fokozódott a gyógyszer hatása, 1,3-szorosára nőtt az additív hatáshoz képest. A másik két sejtvonalban lényegesen nagyobb volt az érzékenyítés mértéke – 2-szeres a C6 és 3,4-szeres az U373 sejtek esetében. A Gemcitabinnak – ugyancsak sejtvonal függően – fokozódott a sugárérzékenyítő hatása is a dCK génbevitel nyomán: a szinergizmus mértéke 1,25-szörös volt a GL261 sejteken, 2,3-szörös a C6 és 3,6-szörös az U373 sejtekben (2. ábra).

4. A fokozott deoxicitidin-kináz enzintermelés hatása a Gemcitabin kemoterapeutikus és sugárérzékenyítő hatására *in vivo* tumor modelleken.

Az intrakraniális daganatok létrehozására az állatok felét vad típusú gliomasejtekkel transzplantáltuk, a másik felét pedig olyan gliomasejtekkel, amelyeket előző nap fertőztünk dCK-t termelő adenovírral. A C6 sejteken 300v/s víruskoncentrációt alkalmaztunk, a GL261-nél pedig 20v/s-t, mivel ennél a koncentrációnál már jelentős mértékben megnövekedett a dCK enzim szintje a sejten belül. Az állatokat Gemcitabinnal kezeltük és lokálisan besugárztuk.

A dCK enzim szintjének növelése nem volt hatással az állatok túlélésére sem az egerek, sem a patkányok esetében. A Gemcitabinnak önmagában kevés hatása volt a daganat növekedésére, és a dCK enzim túltermelése nem javította ezt a hatást sem a GL261 sem a C6 tumorok esetében. Viszont mindkét modell esetében a dCK transzdukció növelte a lokális besugárzás daganatellenes hatását: e kombináció alkalmazása a GL261 modell esetében 25%-os, a C6 modell esetében pedig 28%-os túléléshez vezetett (3 és 4 ábra).

A Gemcitabin kezelés kombinálása lokális besugárzással egerekben 20%-ra növelte az állatok túlélését, a dCK transzdukció ezt a hatást enyhén megnövelte (25%). A C6 sejtvonal esetében 16%-os volt a túlélés a Gemcitabin és lokális besugárzás kombináció hatására, viszont a dCK enzim szintjének növelése szignifikánsan javította a Gemcitabin sugárérzékenyítő hatását: 67%-a az állatoknak tumormentes maradt. Az egyes kezelési csoportok átlagos élettartamában is ugyanezek a tendenciák figyelhetők meg: a GL261 sejtvonal esetén a gemcitabinnal és lokális besugárzással kezelt állatok élettartama 30%-al nőtt a kezeletlen kontroll csoporthoz képest, a tripla kezelési kombináció pedig 43%-al növelte meg az átlagos élettartamot. A C6 sejtekkel transzplantált patkányok átlagos élettartama nem változott Gemcitabin kezelés hatására, ellenben a dCK transzdukció hozzáadásával 41 százalékos élettartam növekedést értünk el (3 és 4 ábra).

Az eredményeket összegezve azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a dCK enzim szintjének sejten belüli növelése lényegesen javította a Gemcitabin és lokális besugárzás kombinált hatását.

A fenti eredményeinket egy közleményben jelentettük meg a Cancer Gene Therapy című folyóiratban 2008 elején. Egy további közlemény, amely a dCK gén sejtvonalspecifikus hatásaival foglalkozik, elkészítés alatt áll, és reményeink szerint ez év folyamán megjelenik.

5. Hipoxiára reagáló, dCK-t kódoló adenovírus vektor készítése

Annak érdekében, hogy a gemcitabin toxikus hatása hipoxiában jobban érvényesüljön, egy olyan dCK-t kódoló adenovírus vektort szerkesztettünk, ahol a dCK-t vezérlő promoter régióba beklónoztunk egy hipoxiára reagáló szekvenciát (HRE). Ennek a szekvenciának a jelenlétében a gén hipoxiában aktiválódik.

Az adenovírus-vektort a Stratagene cég által forgalmazott „AdEasy XL Adenoviral Vector System” kittel állítottuk elő.

A HRE fragmentumot PCR reakcióval amplifikáltuk olyan primereket használva, amelyeknek az 5' végükön a SacI, illetve a BglII enzim felismerőhelyek voltak. A PCR termékeket megemésztettük a megfelelő restriktációs enzimekkel, és beklónoztuk a pGL3-prom plazmid expressziós vektorba, az SV40 minimal promoter elé, (az új plazmidot pGL3-Prom-HRE-nek neveztük). Mivel ez a vektor tartalmazza a luciferáz génjét, mielőtt az adenovírus készítését tovább folytattuk volna, előbb leellenőriztük, hogy a HRE szekvencia működő képes, vagyis megvalósul-e a hypoxia-specifikus luciferáz expresszió. Ezt a Promega cég „Luciferase assay system” kitjével végeztük, az eredményeket CAT-aktivitásra normalizáltuk. GI261 sejteket transzfektáltunk a „hagyományos”, illetve a HRE-t tartalmazó, dCK-t kódoló plazmid vektorokkal és mértük a luciferáz expressziót normoxiás és hipoxiás körülmények között. A HRE-t nem tartalmazó dCK-s vektor normoxiás luciferáz aktivitását egységnek vettük. Ennek a vektornak a luciferáz aktivitása hipoxiában lecsökkent felére. A HRE-t tartalmazó dCK-s vektor normoxiás aktivitása közel azonos volt a HRE-t nem tartalmazó plazmideval. Viszont hipoxiás körülmények között ennek a vektornak a luciferáz aktivitása 2,1-szeresére növekedett, vagyis megkétszereződött. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a HRE szekvencia funkcionális, vagyis megvalósult a hipoxia-specifikus génexpresszió, így folytattuk az adenovírus vektor készítését.

A dCK gént tartalmazó plazmidból EcoRI és XbaI restriktációs enzimekkel kivágtuk a dCK fragmentumot, ezt beklónoztuk a Hind III-XbaI ezimékkel hasított pGL3-Prom-HRE plazmidba (a ragados végek Klenow polimeráz segítségével való feltöltése után) a promoter régió mögé. Az így kapott konstrukcióból kivágtuk az expressziós kazettát KpnI és Sal I enzimek segítségével, ezt beklónoztuk a pShuttle átvivő vektorra, amely kanamicin-rezisztenciával rendelkezik. Az így létrehozott, klónozó kazettát (promoter+HRE-dCK gén+polyA jel) tartalmazó plazmid-vektort linearizáltuk, transzformáltuk a kithez tartozó BJ5183-AD1 kompetens sejtekre. A BJ5183-AD1 egy olyan *E. coli* baktérium törzs, amelybe előzőleg beklónozták az 5-ös típusú humán adenovírus genomját, az E1A, E1B és E3 régiók nélkül, ezeknek a helyére klónoztuk a hu-dCK gént. Emellett a BJ5183-AD1 baktériumtörzs recA proficiens, vagyis rendelkezik a rekombinááz enzimmal, amely szükséges a rekombináció létrejöttéhez. Így a baktériumsejten belül megtörténik a homológ rekombináció a linearizált, hu-dCK-t tartalmazó shuttle plazmid és a vírusgenomot tartalmazó plazmid között.

A kanamicin-rezisztenciát hordozó telepeket - amelyek sikeresen rekombinálódtak - kiszeleztük. Mivel ebből a baktériumtörzsből csak kis mennyiségű, alacsony tisztaságú plazmidot lehetne izolálni, a következő lépésben a rekombinálódott plazmid-konstrukciót PacI restriktációs enzimmal megemésztettük és bevittük az XL-Gold ultrakompetens baktériumsejtekbe, amelyekből hiányzik mind a rekombinááz, mind az endonukleáz enzim-

apparátus, ezért sokkal tisztább plazmidot lehet előállítani belőle. A Pac I emésztés azért volt szükséges, hogy szabadabbá tegyük az ITR-eket (fordított vég-ismétlődések), ami a replikációhoz szükséges. Az így nyert rekombináns plazmidot felszaporítottuk.

A hu-dCK-t és vírusgenomot tartalmazó rekombináns plazmidot AD-293 humán embrionális vesesejtekbe transzfektáltuk CaCl-os módszerrel, ahol azok felszaporodtak. Mivel az általunk előállított adenovírus-vektorok genomjából hiányzik az E1A és E1B régió, önálló szaporodásra képtelenek. Ezért csak olyan sejtvonalban lehetséges a szaporításuk, amelyek tartalmazzák a hiányzó géneket. A HEK sejteket erre a célra fejlesztették ki. A sejteket besugárzással összetört 5-ös típusú adenovírus DNS-el transzformálták, így ezek termelik az adenovírus fehérjék nagy részét, köztük az E1 fehérjéket, tehát helyettesítik a vektorunkból hiányzó E1 géneket.

A vírus DNS-éből PCR reakcióval leellenőriztük az adenovírus szaporodásképtelenségét, a dCK és HRE régiók működését valamint megállapítottuk a vírus titerét.

6. Hipoxia-specifikus dCK expresszió Gl261 sejtekben

Az Ad-hu-HRE-dCK vírussal Gl261 sejteket fertőztünk különböző vírus sejt arányokban és vizsgáltuk, hogy van-e különbség a dCK enzimaktivásban akkor, ha a sejteket normoxiás vagy hipoxiás körülmények között tartjuk. A hipoxiás környezetet a Proox 110 (BioSpherix) hipoxiás kamra segítségével állítottuk be, a kamrában a légkör 0,6% O₂-t és 5% CO₂-t tartalmazott a kísérletek alatt, 37°C-os inkubátorban. Mindenik kísérleti felállításban a sejteket duplikátokban oltottuk ki, az egyik tenyésztőedényt a hipoxiás kamrába, a másikat pedig a hipoxiás kamra mellé, az inkubátorba tettük.

Eredményeinket a 2. táblázatban mutatjuk be. Itt az látszik, hogy hipoxiás körülmények között, magas vírus/sejt arányoknál az Ad-hu-HRE-dCK enzimaktivitása jelentősen megemelkedik a HRE-t nem tartalmazó Ad-hu-dCK enzimaktivitásához képest. Vagyis, sikerült olyan működőképes vektort előállítani, ahol a dCK enzimaktivitás hipoxia-specifikusan változik.

Jelenleg azt vizsgáljuk, hogy milyen mértékben javítja az Ad-hu-HRE-dCK a hipoxiás Gl261 sejtek gemcitabin és sugárzás iránti érzékenységet.

AGYTUMOROK SUGÉRÉRZÉKENYÍTÉSE TIRAPAZAMIN BIOREDUKTIV KEMOTERÁPIA ÉS GÉNTERÁPIA KOMBINÁLÁSÁVAL

A sugárérzékenyítő vegyületek egyik csoportja a szelektíven hipoxiás sejtekre ható szerek. Ezeket az úgynevezett bioreduktív szereket annak érdekében fejlesztették ki, hogy, kihasználva a hipoxiát, mint potenciális különbséget a malignus és normál szövetek között, szelektíven lehessen a tumorsejteket elpusztítani. Munkánk során a bioreduktív hatású 3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-di- N-oxiddal, vagyis a Tirapazaminnal (TPZ) foglalkoztunk. Ez egy új generációs hipoxiás sugárérzékenyítő szer. Ahhoz, hogy a TPZ aktív metabolitá váljon, a sejt különböző reduktázai egyelektronos redukcióval igen reaktív gyökké kell alakítsák. Az egyik ilyen enzim a NADPH citokróm P450 reduktáz. (hu-N-CPR). A Tirapazamin hipoxiás sejtekkel szembeni toxikus hatása 15-200-szor nagyobb, mint a normoxiás sejtekre kifejtett hatása, mivel oxigén jelenlétében a belőle keletkezett, aktív szabadgyök gyorsan inaktíválódik, míg a hipoxiás sejtekben a stabil szabadgyök DNS lánc-törést okoz. A lánc-törés pontos mechanizmusa még nem teljesen ismert, de az tűnik legvalószínűbbnek, hogy a TPZ-gyök közvetlenül elvon egy H atomot a DNS-ből. A Tirapazamine aktív metabolitjai utánozzák az oxigén hatását, vagyis stabilizálják az ionizáló

sugárzás hatására, a szabadgyökök által okozott DNS károsodásokat a daganatsejtekben (5. ábra).

Hipotézisünk szerint, ha a TPZ aktivációjáért felelős NADPH-citokróm P450 redukáz (hu-N-CPR) enzim génjét adenovírus vektorba klónozzuk és bejuttatjuk a daganatsejtekbe, ezzel lokálisan fokozzuk a TPZ aktivációját. A TPZ fokozott toxikus és sugárérzékenyítő hatása elsődlegesen csak a hipoxiás sejtekben fog érvényesülni. Így a sugárterápiával kombinációban javul a daganatsejtek pusztulása.

1. A Hu-N-CPR gén működése

Első lépésként megszerkesztettük a hu-N-CPR enzimet kódoló adenovírus vektort.

Az adenovírus-vektort a Stratagene cég által forgalmazott „AdEasy XL Adenoviral Vector System” kittel állítottuk elő. A pRC/CMV expressziós plazmid vektorban levő hu-N-CPR-t szekvenciát BglII és SalI restrikciós enzimekkel kivágtuk, majd a megfelelő helyre beklónoztuk a „pShuttle-CMV” plazmid vektorba. A pShuttle-CMV plazmid a citomegalovírus promoterével valamint kanamicin-rezisztencia markergénnel rendelkezik, ami a szelekciót teszi lehetővé. A hu-N-CPR génszakasz nukleotidszekvenciájának helyességét a plazmidban szekvenálással ellenőriztük le. Az így létrehozott klónozó kazettát (promoter+hu-NCPR gén+polyA jel) tartalmazó plazmid-vektort linearizáltuk, transzformáltuk a kithoz tartozó BJ5183-AD1 kompetens sejtekbe. Az Ad-hu-HRE-dCK vektor készítésénél már részletesen ismertetett módon kisselektáltuk a kanamicin-rezisztenciát hordozó telepeket, és felszaporítottuk a rekombináns plazmidot (6. ábra).

A hu-NCPR-t és vírusgenomot tartalmazó rekombináns plazmidot AD-293 humán embrionális vesesejtekbe transzfektáltuk CaCl-os módszerrel, ahol azok felszaporodtak.

Leellenőriztük, hogy a vírusvektor termeli a hu-N-CPR génjét. Ehhez megmértük spektrofotométerrel a hu-N-CPR enzim által katalizált citochrome-c NADPH-dependens redukciót.

A Hu-N-CPR gén működésének tanulmányozására a vírus citotoxicitását, hu-N-CPR RNS kifejeződését, valamint az enzim aktivitását mértük az Ad-hu-NCPR-el fertőzött sejtekben.

GI261 sejteket növekvő vírus/sejt arányban fertőztünk Ad-Hu-NCPR-rel. A vírus csak enyhén toxikus a sejtekre, a 300 v/s fertőzési arányt is a sejteknek több mint 60%-a túlélte. Az alkalmazott vírus/sejt arány függvényében lineárisan nőtt a sejten belüli hu-N-CPR RNS mennyisége és a fehérje aktivitása is (3. táblázat).

2. A GI261 sejtek in vitro TPZ érzékenysége normoxiás és hipoxiás körülmények között

A hipoxiás környezetet a Proox 110 (BioSpherix) hipoxiás kamra segítségével állítottuk be, a kamrában a légkör 0,6% O₂-t és 5% CO₂-t tartalmazott a kísérletek alatt, 37°C-os inkubátorban. Mindenik kísérleti felállításban a sejteket duplikátokban oltottuk ki, az egyik tenyésztőedényt a hipoxiás kamrába, a másikat pedig a hipoxiás kamra mellé, az inkubátorba tettük.

Az optimális kezelési idő meghatározása érdekében tanulmányoztuk a gyógyszer hatásának időkinetikáját normoxiás és hipoxiás körülmények között. A sejteket növekvő gyógyszer koncentrációval kezeltük, amelyeket különböző ideig hagytunk hatni, majd meghatároztuk a kezeletlen kontrollhoz képest a túlélő sejtek arányát (7. ábra).

Az általunk alkalmazott kísérleti felállításban a TPZ toxicitása normoxiás körülmények között alacsony volt a GI261 sejteken. A túlélő sejtek aránya még magasabb TPZ koncentrációnál (1 mM) is 90% maradt. Ezzel szemben hipoxiában a TPZ toxikus hatása jóval erősebb volt, 40%-os túlélést tapasztaltunk az 1 mM-os koncentrációnál. Ez egy 3,65-szörös hipoxiás érzékenyítésnek felel meg; ezt tükrözi a TPZ IC₅₀ értékében bekövetkezett változás is, amely normoxiában 2,44 mM volt, hipoxiában pedig 0,67mM-ra csökkent.

Annak érdekében, hogy meghatározzuk, hogy a TPZ toxicitása növelhető-e Ad-hu-N-CPR hozzáadásával, Ad-hu-NCPR-el fertőzött sejteket kezeltünk különböző koncentrációjú TPZ-vel, mind hipoxiában, mint normoxiában. Az Ad-hu-NCPR transzdukció mind normoxiában, mind hipoxiában fokozta a TPZ hatását, de az alacsonyabb TPZ koncentrációknál nem volt különbség az Ad-hu-NCPR hatására megnövekedett TPZ toxicitások között normoxiás és hipoxiás körülmények között. Nagyobb TPZ koncentrációk esetében viszont az Ad-hu-CPR hatására jelentősen megnőtt a TPZ toxicitása hipoxiás körülmények között szemben a normoxiában mért értékekhez. A 8 ábrán látható, hogy míg Ad-hu-CPR hatására az 1 mM-ban alkalmazott TPZ normoxiás körülmények között 38%-os túlélést eredményez, addig ugyanez hipoxiában 16%-os.

3. Az Ad-hu N-CPR gyógyszer- és sugárérzékenyítő hatása in vitro

A besugárzás, TPZ kezelés és Ad-hu-N-CPR transzdukció kombinált hatását kolóniaképző teszttel vizsgáltuk. A sejteket 300v/s Ad-hu-N-CPR-el fertőztük, 250 nM TPZ-vel kezeltük és 4 Gy-el besugaraztuk. Ezeket a koncentrációkat azért választottuk, mert a 100-500 nM tartományban volt a legnagyobb mértékű a hipoxiás sejtek érzékenyítése a TPZ által, valamint a hu-N-CPR hatása a TPZ toxicitásra. A toxicitás mértéke monoterápiában ennél a koncentrációnál még nem volt annyira magas, hogy sugárterápiával kombinálva értékelhetetlenül alacsony túléléseket kapjunk. A 300 v/s vírusfertőzési aránynál a vírus toxicitása ugyancsak elfogadható határon belül volt, az enzim aktivitása viszont lineárisan nőtt.

Azt tapasztaltuk, hogy a Gl261 sejtvonal hipoxiában kétszer sugárrezisztensebb volt, mint normoxiás körülmények között. A 250 nM TPZ önmagában, normoxiás környezetben csak csekély mértékben volt toxikus a sejtekre (82%-os túlélés), a besugárzás és TPZ kezelés hatására csak additív hatást értünk el, sugárérzékenyítő hatás nem volt. A hipoxia önmagában nem volt toxikus a sejtekre, viszont hipoxiás körülmények között TPZ hatására jelentősen csökkent a túlélő sejtek aránya (25%). A hipoxiás érzékenyítés (HCR) 3,2-szeres.

A hu-N-CPR génbevitel hatására a TPZ citotoxicitása jelentős mértékben fokozódott, az érzékenyítő hatás hipoxiás körülmények között 5-szörös, de normoxiában is alig valamivel alacsonyabb (4,5). Besugárzással kombinálva a TPZ kezelést, a sejtölő hatás mértéke tovább növekedett a vírusvektorral módosított sejtekben: a túlélési arány normoxiában 1,42%, hipoxiában pedig 0,51% volt. A sugárérzékenyítő hatás mértéke 3-szoros (normoxia), illetve 4,5-szörös (hipoxia) az N-CPR génnel transzfektált sejtekben (9. ábra).

4. Ad-Hu-NCPR transzdukció, TPZ kezelés és besugárzás kombinált hatása egér agytumor modellen in vivo

Először azt vizsgáltuk, hogy in vivo, optimális körülmények között, amikor az összes tumorsejt tartalmazta a vírust, a sugárérzékenyítő génterápia milyen hatásfokkal működött a Gl261 tumor modellben. Egerekbe intramuszkulárisan vad típusú vagy hu-NCPR-t túltermelő Gl261 sejteket transzplantáltunk. Két kísérleti csoportot használtunk. Az állatok felét vad típusú Gl261 sejtekkel, másik felét pedig olyan gliomasejtekkel transzplantáltuk, amelyeket 24 órával korábban in vitro fertőztünk Ad-hu-NCPR-el (100v/s).

Három nappal később az állatokat intraperitoniálisan PBS-ben oldott TPZ-vel kezeltük (30mg/kg), 2 órával a TPZ kezelés után pedig az egerek tumoros lábát lokálisan besugaraztuk (4Gy). Az állatok testének többi részét ólomkalodában, takarással védtük.

A második kísérleti felállásban a vírust is lokálisan juttattuk a tumorba. Intramuszkulárisan vad típusú Gl261 tumort oltottunk egerekbe. Amikor a tumor már jól tapintható volt (12 nap múlva), lokálisan Ad-hu-N-CPR-t injekcióztunk a daganatba ($1,6 \cdot 10^8$ víruspartikulum/egér), 100 μ l PBS oldatban. 24 órával később az állatokat intraperitoneálisan 30 mg/kg TPZ-vel kezeltük majd 2 óra múlva a daganatot lokálisan besugaraztuk (2 Gy). A kezelési protokollt 7 nap múlva megismételtük.

A TPZ kezelés vagy a hu-NCPR enzim túltermeltetése önmagában nem befolyásolta a daganatok proliferációját. A lokális besugárzásnak enyhe terápiás hatása volt. A TPZ kezelés önmagában és NCPR génbevitellel kombinálva is jelentős sugárérzékenyítő hatást eredményezett (20. ábra). Abban az esetben, ha a vírusvektort in vivo injektáltuk az állatokba, az eredmények annyiban változtak, hogy az NCPR-t kódoló vírusvektorral való fertőzésnek önmagában is enyhe sugárérzékenyítő hatása volt. (21. ábra)

A fenti munkánkból egy kézirat készült el, amely beküldés alatt áll.

A pályázat keretében elsősorban a Gl261 egér tumor modellt és az abból létrehozott sejtvonalat használtuk fel a különböző génterápiás protokollokhoz. A fenti pályázat keretében végzett munka során számos olyan kísérleti eredményre szert tettünk, amelyek elengedhetetlenül szükségesek egy génterápiás protokoll megtervezéséhez. Ilyenek például az adenovírus transzdukciós hatékonysága a Gl261 sejtekben, az adenovírus által kódolt terápiás gén expressziójának az időkinetikája a transzdukciót követően, a Gl261 sejtek megtapadásának hatékonysága a C57BL/6 egerekben, az oltáshoz használt különböző sejtszám mennyi idő alatt pusztítja el az állatokat, a lokális besugárzásnak önmagában milyen terápiás hatása van a Gl261 sejtekkel intrakraniálisan oltott egerekre. Ezen eredmények összefoglalásából egy elfogadott publikáció született.

	Alap dCK aktivitás		dCK aktivitás Ad-HudCK transzdukció hatására			
	Teljes aktivitás	Specifikus aktivitás	Transzdukciós arány (v/s)			
Sejt vonalak			20	100	200	300
GI261	1,281 (±0,244)	0,931 (±0,163)	3,886±1,895	8,028±0,595	nd	nd
U373	0,549 (±0,084)	0,308 (±0,048)	6,01±0,148	8,165±0,508	8,284±0,479	8,501±0,442
C6	0,177 (±0,015)	0,058 (±0,003)	0,839±0,113	5,312±0,734	8,066±0,148	8,313±0,241

1. táblázat *Vad típusú és Ad-HudCK-val transzfektált glioma sejtvonalak dCK aktivitása*

Sejtextraktumot készítettünk vad típusú és különböző v/s arányban Ad-hu-dCK-val fertőzött sejtekből. A dCK enzim specifikus aktivitását úgy mértük, hogy az ugyancsak deoxicitidint foszforiláló timidin-kináz enzimet telítettük nagy mennyiségű timidin hozzáadásával. Az enzimaktivitásokat nmol/óra/mg protein egységben fejeztük ki. Az adatok négy független kísérlet átlaga ± SD. nd: nem vizsgált.

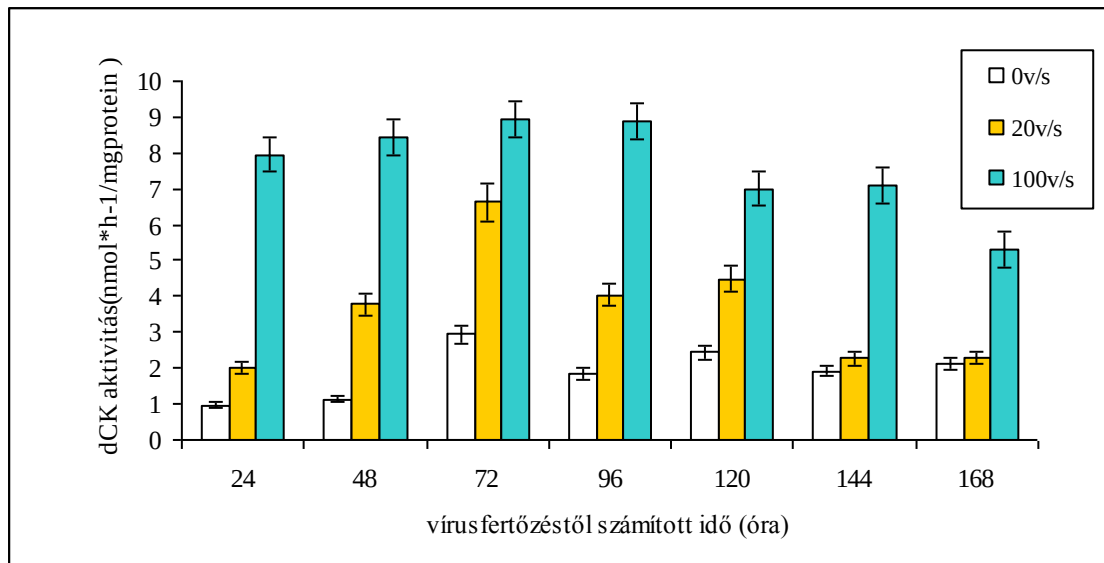
normox			
	Ad-dCK	Ad-HRE-dCK	
k	1,25	1,13	nM/60perc/mg feh
20v/s	3,06	3,3	nM/60perc/mg feh
100v/s	6,82	6,5	nM/60perc/mg feh
hipoxia			
	Ad-dCK	Ad-HRE-dCK	
k	1,35	1,3	nM/60perc/mg feh
20v/s	2,9	6,17	nM/60perc/mg feh
100v/s	7,06	13,37	nM/60perc/mg feh

2. táblázat *dCK* enzimaktivitás normoxiás és hipoxiás körülmények között

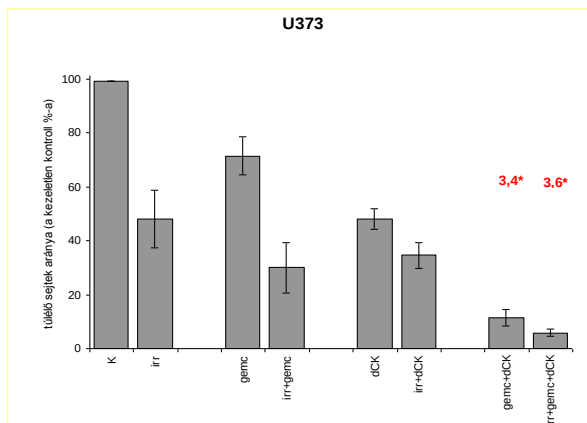
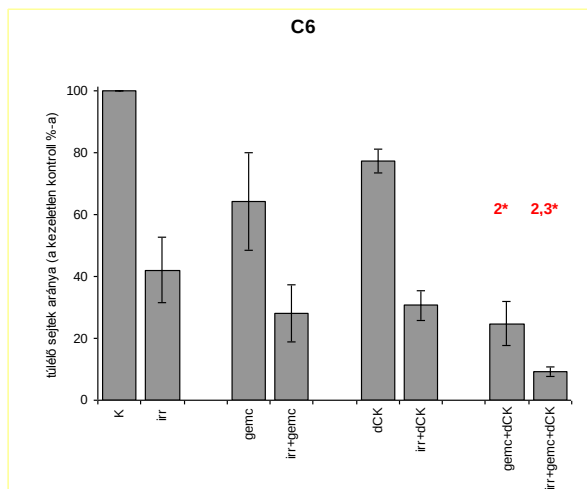
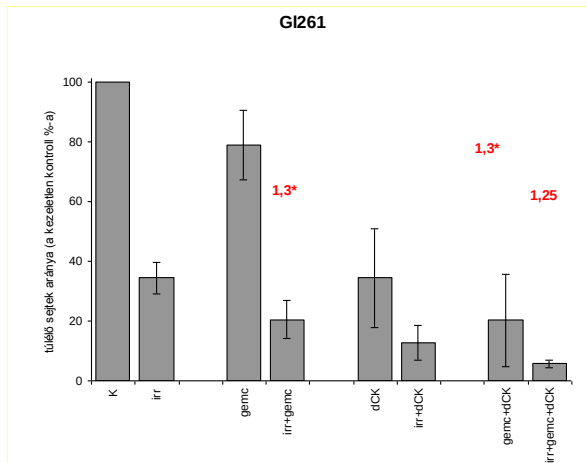
Gl 261 sejteket különböző vírus-sejt aránnyal fertőztük a HRE-t tartalmazó és nem-tartalmazó Ad-hu-dCK vektorral. A sejteket 3 órát CO₂ termosztátban inkubáltuk normoxiás vagy hipoxiás körülmények között, majd valamennyi sejtet normoxiás körülmények között tenyésztettünk 24 órát. Ezt követően meghatároztuk a dCK enzim specifikus aktivitását.

v/s	Ad-P450 toxicitas (a kontroll %-a)	RNS-szint novekedes	HU-N-CPR aktivitás (uMcitc/mg*min)
0	0	1	3.1
20	22.2	3.7	7.3
50	25.1	6.7	8.4
100	35.6	29.1	19.9
300	36.6	64.8	38.8

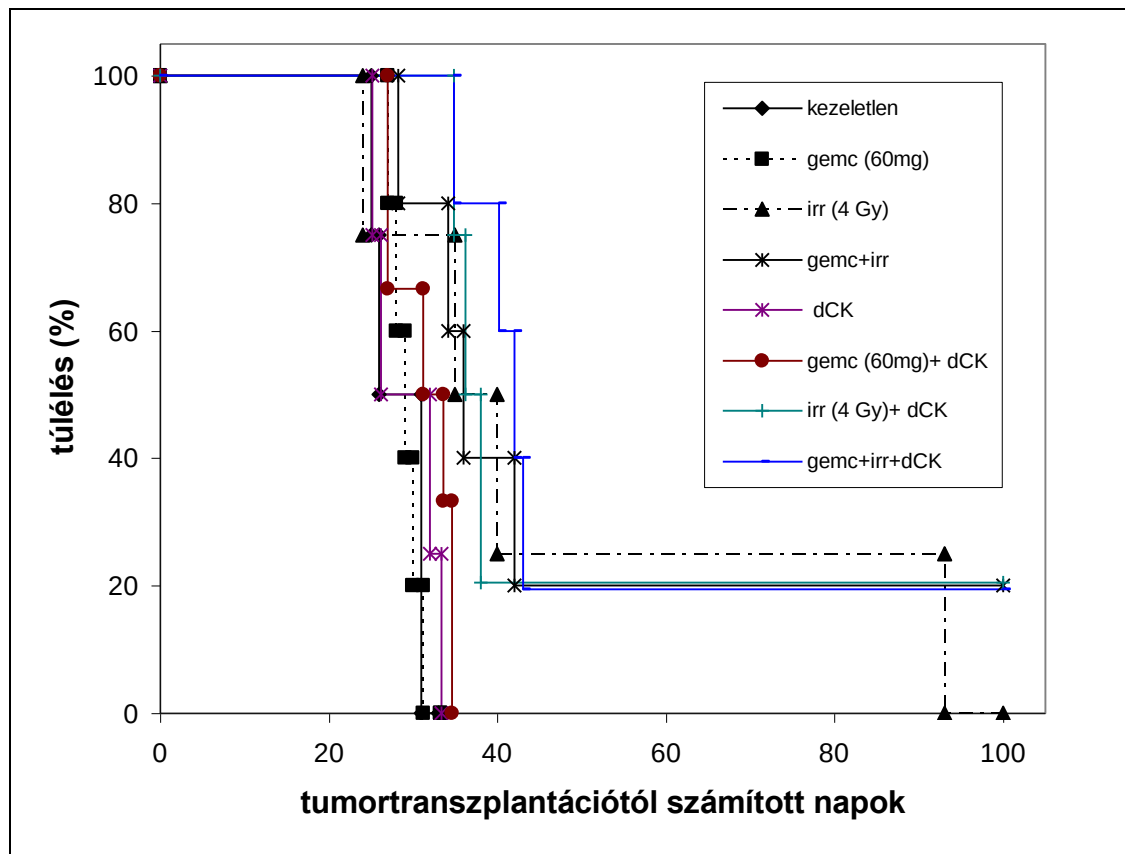
3. táblázat *Hu-NCPR expresszió és enzimaktivitás Ad-Hu-NCPR-el fertőzött Gl261 sejtekben*
Gl261 sejteket különböző vírus/sejt arányban Ad-hu-NCPR-el fertőztünk, majd a fertőzést követő 48 órával a sejtek egy részéből RNS-t izoláltunk és valós idejű RT-PCR-el mértük az NCPR expresszióját. A sejtek egy másik részéből fehérje extraktumot készítettünk és spektrofotométerrel mértük a citochrome-c NADPH-dependens redukciót, amely az N-CPR aktivitást tükrözi.



1. ábra *dCK-expresszió időkinetikája adenovírussal való génbevitel hatására Gl261 sejtekben.* Az ábra a vírusfertőzéstől eltelt idő függvényében ábrázolja a génbevitellel megnövelt fehérje aktivitásának alakulását.

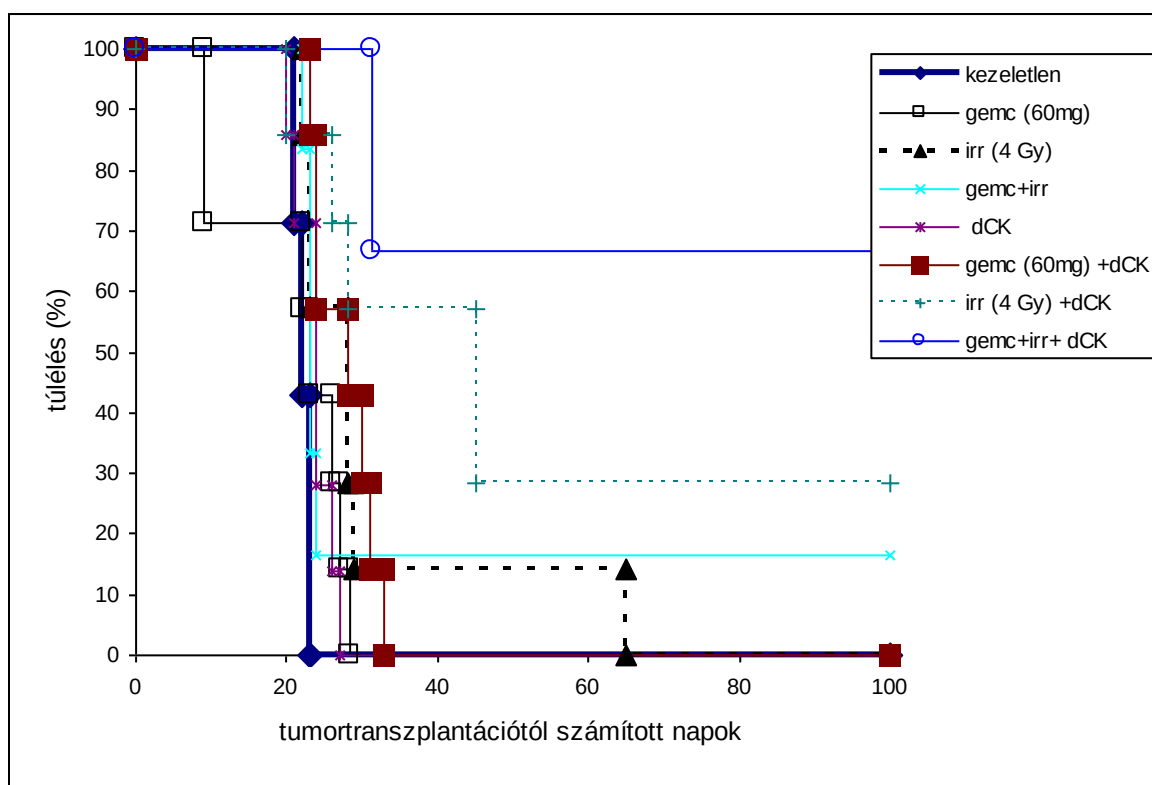


2. ábra Glioma sejtvonalak sugárérzékenysége Gemcitabin kezelés és Ad-hu-dCK transzdukció hatására A sejteket Ad-hu-dCK-val fertőztük a kioltás után egy nappal. Másnap Gemcitabinnal kezeltük, majd 24 órával később 4 Gy-vel besugaraztuk. A túlélő sejtek arányát és a gyógyszer-illetve sugárérzékenyítés mértékét a 7.-ik napon határoztuk meg. K – kezeletlen, irr. – besugarazott, gemc – Gemcitabin, dCK – Ad-hu-dCK. Az adatok három független kísérlet átlagát jelentik, a hibasávokkal a szórást ábrázoltuk. Az oszlopok feletti értékekkel a kombinációk szinergista hatásának mértékét jelöltük, *-gal jelölt értékek esetén a hatás szignifikánsan különbözik a számolt, additív hatástól ($P < 0,05$).



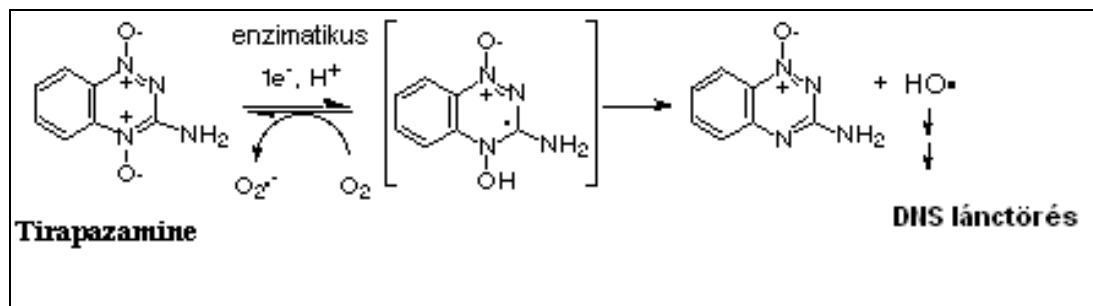
3. ábra Gliomás egerek túlélése gemcitabin kezelés és lokális besugárzás hatására

Az egerekbe intrakraniálisan tumort transzplantáltunk vad típusú, illetve Ad-hu-dCK-val fertőzött, G1261 sejtekkel, majd az állatokat intraperitoniálisan gemcitabinnal kezeltük (gemc) illetve besugarztuk (irr). $P < 0,43$ a tripla kezelési módszer és a gemcitabinnal és besugárzással kezelt csoportok között.



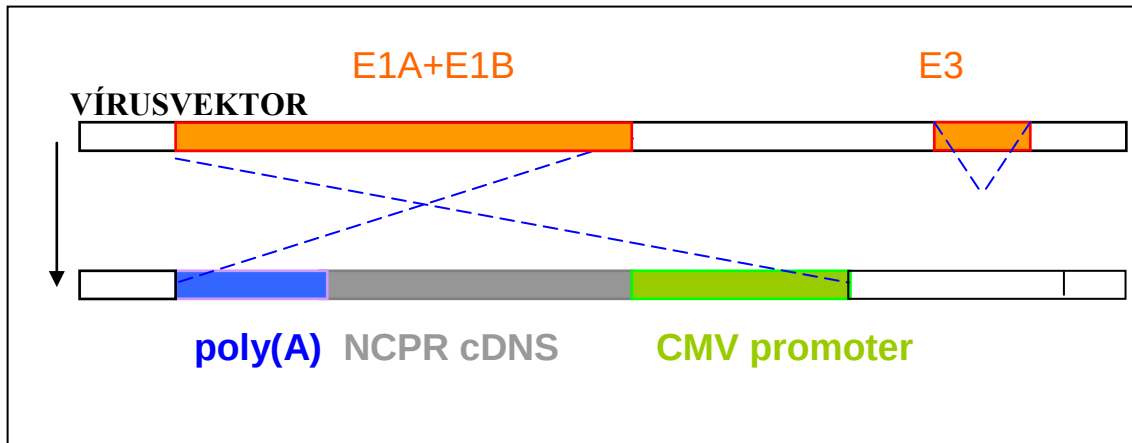
4. ábra Gliomás patkányok túlélése gemcitabin kezelés és besugárzás hatására

A patkányokba intrakraniálisan tumort transzplantáltunk vad típusú, illetve Ad-hu-dCK-val fertőzött C6 sejtekkel, majd az állatokat intraperitoniálisan gemcitabinnal kezeltük (gemc) illetve besugaraztuk (irr). $P < 0,0162$ a tripla kezelést kapott valamint a gemcitabinnal és besugárzással kezelt csoportok között.



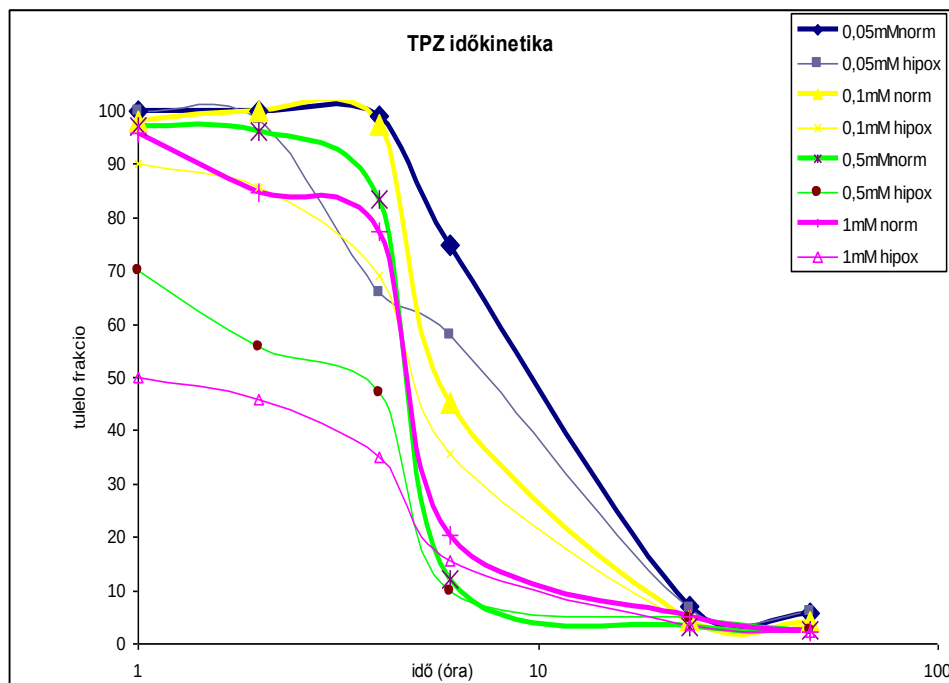
5. ábra A Tirapazamin hatásmechanizmusa

A Tirapazamin alapállapotban inaktív, a sejten belül a sejt egyes reduktázai egyelektronos redukcióval aktív szabadgyökké alakítják. Oxigén jelenlétében ez a termék gyorsan visszaoxidálódik az inaktív formává, míg hipoxiában a stabillá vált szabadgyök DNS lánc törést okoz. Ugyanakkor ez a gyök utánózva az oxigén hatását stabilizálja a besugárzás okozta DNS károsodásokat

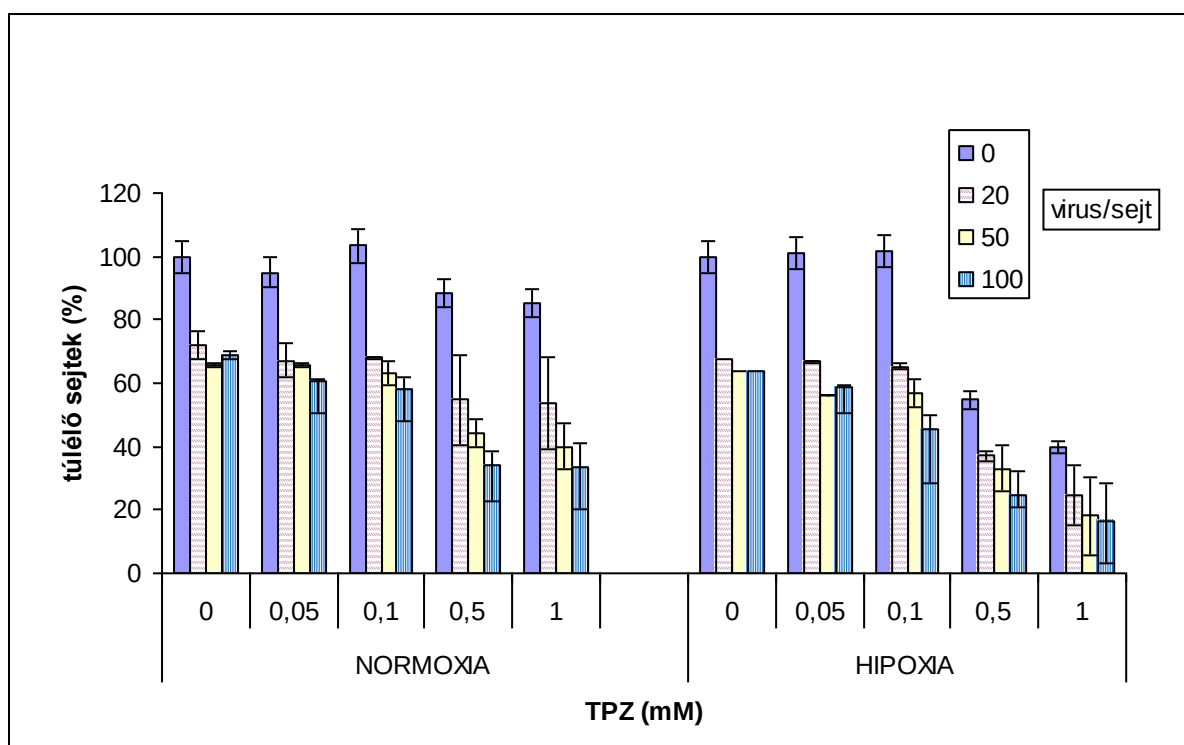


6. ábra Az NCPR-t kódoló adenovírus-vektor szerkezete

Az Ad-hu-dCK-t úgy szerkesztettük meg, hogy a vírusvektor E1A, E1B régiójának helyére homológ rekombináció nyomán a dCK gént kódoló expressziós kazetta került.

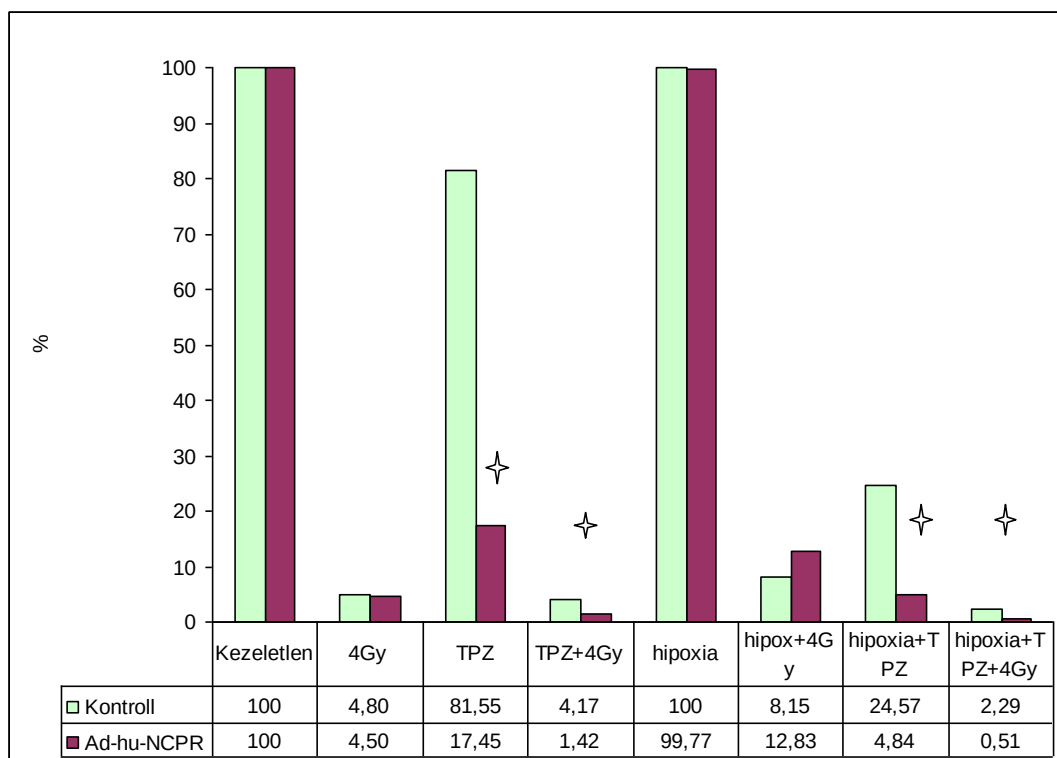


7. ábra TPZ toxicitás Gl261 sejtekben normoxiás és hipoxiás körülmények között *in vitro*
 Gl 261 sejteket 96-lyukú edényre oltottunk és különböző koncentrációjú TPZ-vel kezeltük őket eltérő ideig. A sejteket vagy végig normoxiában, vagy a TPZ hozzáadását követően 2 órát hipoxiában tartottuk. A kezeléstől számított különböző időpontokban a sejtek proliferációját a WST-1 reagenssel (Roche) meghatároztuk.



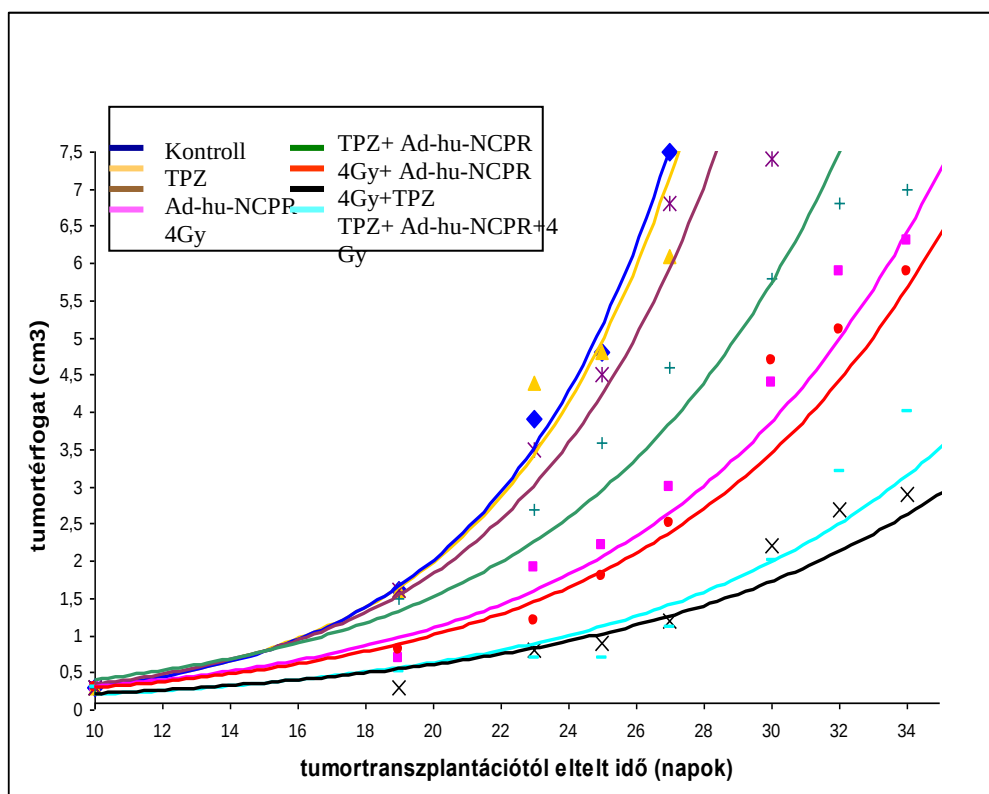
8. ábra TPZ és Ad-Hu-NCPR kombinált hatása GI261 sejtekre

GI 261 sejteket különböző vírus/sejt arányban Ad-Hu-NCPR-el fertőztünk, majd a fertőzést követő napon a sejteket különböző koncentrációjú TPZ-vel kezeltük. A sejtek egy részét normoxiában tartottuk, egy másik részét hipoxiában 2 órát. A TPZ-t 3 órával a kezelést követően eltávolítottuk a sejtekről. Proliferációs teszt segítségével mértük a TPZ toxicitást 3 nappal később.



9. ábra Gl261 sejtek *in vitro* sugárérzékenysége Ad-Hu-NCPR transzdukció és TPZ kezelés kombinált hatására

A besugárzás, TPZ kezelés és Ad-hu-N-CPR transzdukció kombinált hatását kolóniaképző teszttel vizsgáltuk. A sejteket 300v/s Ad-hu-N-CPR-el fertőztük, 250 nM TPZ-vel kezeltük és 4 Gy-el besugarastuk



10. ábra TPZ kezelés és lokális besugárzás kombinált hatása a GL261 daganat növekedésre egerekben

Egereket vad típusú vagy Ad-hu-NCPR-el fertőzött GL261 sejtekkel oltottunk intramuszkulárisan, majd az egereket intraperitoneálisan TPZ-vel, valamint lokális besugárzással kezeltük. Nyomon követtük a daganatok növekedését.