

**Új retrovírusok:  
XMRV feltételezett szerepe  
humán megbetegedésekben  
Egy vírus tündöklése és bukása ?**

**ONGRÁDI JÓZSEF**

**SEMMELWEIS EGYETEM  
ORVOSI MIKROBIOLÓGIA INTÉZET  
BUDAPEST, 2017**

# Prosztatarák

Hámsejt eredetű adenocarcinoma a prosztata széli lebenyében

Előfordulás:

Magyarország: incidencia kb. 2400/férfiak 4. leggyakoribb daganatos

megbetegedése

mortalitás: kb. 1400/év

Európa: mortalitás: kb. 85000/év

USA: 2008: incidencia 186.3000 (összes új rákos eset 25%-a)

egész életen át a kialakulás valószínűsége: 1:6

mortalitás: 28.700 (2. leggyakoribb rákos halálozás)

É-Amerika, É- és Ny-EU: incidencia itt a leggyakoribb, 2. leggyakoribb daganatos halálok

Globálisan: 2008 incidencia: 679.000

mortalitás. 221.000

férfiak 3%-ának közvetlen haláloka, incidencia mindenütt emelkedik

Kb. 10-15% öröklött, 80-90% sporadikus

Diagnosztika: szűrés (felismert esetek átlag életkora 61 év/Európa)

1410 szűrés/1 haláleset megelőzése

tünetek

rectális digitális vizsgálat (RDV)

PSA: prosztata specifikus antigén (epithelből glycoprotein, ng/ml)

biopszia: szövettan – Gleason- score (1-10), TNM (WHO 1997)

tumor markerek: CEA, PAP, vérből, PCA3 vizeletből

# Lehetséges kóroki tényezők

Életkor: >40, legtöbb eset 65-75 év

rassz (USA: feketék között +15% incidencia, +38% mortalitás,

Nigéria, Uganda: 1. rákos megbetegedés)

legritkább ázsiaiakban (India, Pakisztán, Kína, Japán) - bevándorlók

életmód: ülés, táplálkozási tényezők, alkohol, elhízás, D-vitamin hiány

idült gyulladások (83 mikroba)

környezet: cadmium (ipar, tejtermékek), növényvédőszer,

trichloroethan (TCE),

N-nitrosobis(oxopropyl)amine (BOP), 3',2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB)

dimethylformamid, acrylonitril, methylbromid,

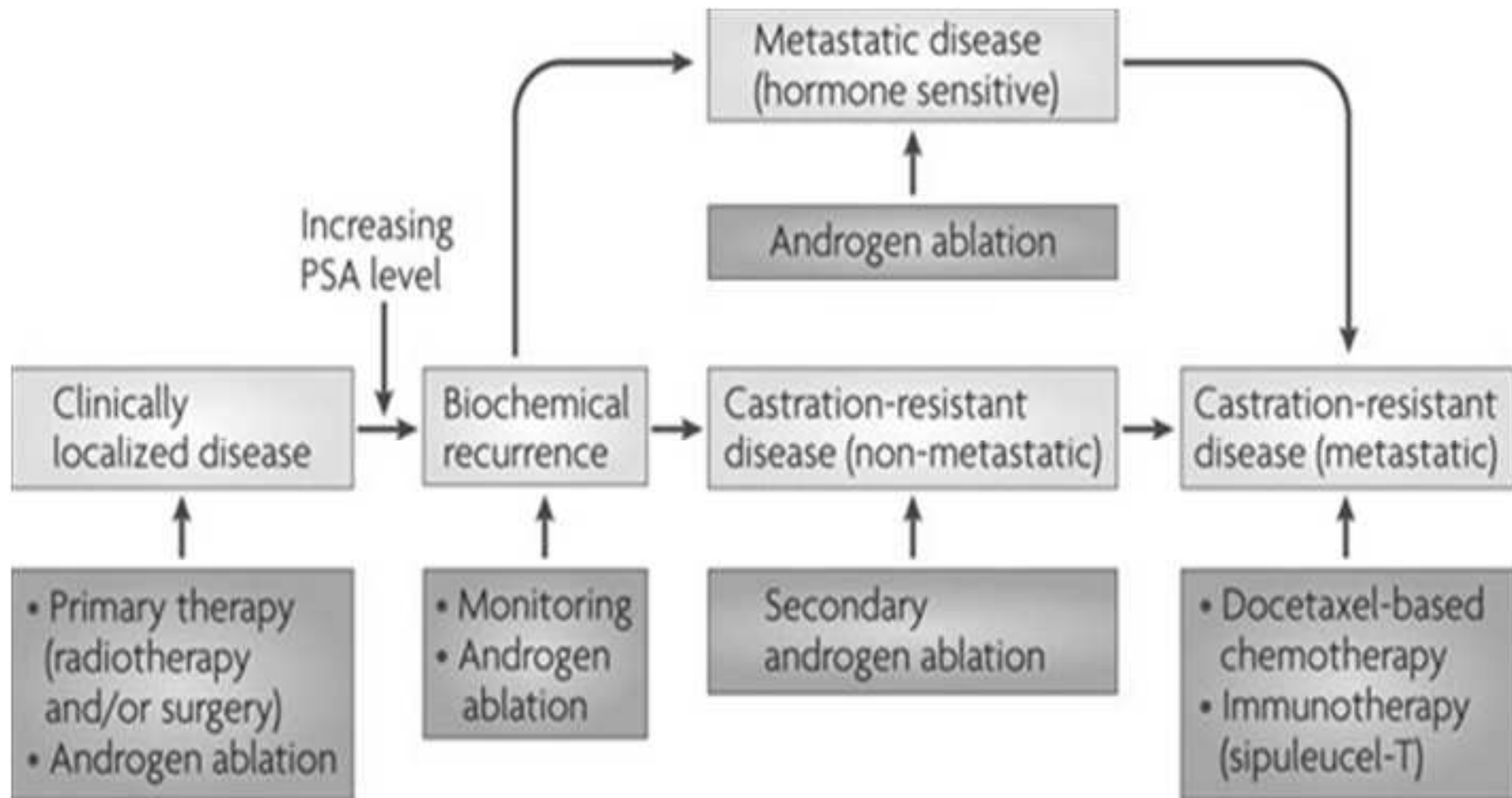
N-methyl-N- nitrosourea (MNU)

synergista hatás androgénekkal

Védő tényezők: ?, szelén, E vitamin, licopének (paradicsom),

diabetes mellitus (csökkent IGF-1)

# Prosztatarák lefolyása



# Öröklődő prosztatarákban kimutatott mutáns gének

Gene	Chromosomal locus	Putative function	Status in prostate cancer
ELAC2	17p	Metal dependent hydrolase	Unknown
RNASEL	1q	Ribonuclease that degrades viral and cellular RNA and can produce apoptosis on viral infection	Deleted
MSR1	8p	Encodes a macrophage scavenger receptor responsible for cellular uptake of molecules, including bacterial cell wall products	Deleted
NBS1	5p	Encodes a protein, nibrin, involved in the processing/repair of DNA double strand breaks and in cell cycle checkpoints	Deleted
CHEK2	22q	Upstream regulator of p53 in the DNA damage signalling pathway	Deleted

# Prosztatarákban leggyakrabban leírt kromoszóma elváltozások

**Table 4** The most commonly described areas of chromosomal loss and gain in prostate cancer

Chromosome locus	Putative genes	Normal function of gene	Status of gene in prostate cancer	Ref
7p	EGFR	Growth factor	Amplified	39
7q	CAV 1	Structural protein of caveolae membranes in fibroblasts and endothelia	Amplified	40
8p	MSR	Encodes a macrophage scavenger receptor responsible for cellular uptake of molecules including bacterial cell wall products	Deleted	41
8p	NKX3-1	Tumour suppressor gene	Deleted	42
8q	c-myc	Transcriptional activator	Amplified	43
10q	PTEN	Tumour suppressor gene	Mutated	44
13q	Rb	Tumour suppressor gene	Deleted	45
16q	E-CAD	Adhesion molecule	Deleted	46
Xq	AR	Androgen receptor	Amplified	47

EGFR, epidermal growth factor receptor; PTEN, phosphatase and tensin homologue; Rb, retinoblastoma.

## Fokozott prosztatatarák kockázatot jelentő gén-polymorphismusok

Gene	Chromosomal locus	Function
TLR4	9q	Encodes a receptor that is a central player in the signalling pathways of the innate immune response to infection by Gram negative bacteria
CDKN1B (p27)	12p	Belongs to the Cip/Kip family and functions as an important cell cycle gatekeeper
AR	Xq	May cause activation of androgen dependent genes
CYP17	10q	Enzyme responsible for the biosynthesis of testosterone.
SRD5A2	2p	Converts testosterone to the more potent dihydrotestosterone

AR, androgen receptor.

## Prosztatarák előrehaladásához társuló gén-polymorphismusok

Gene	Chromosomal locus	Function
Vitamin D receptor	13q	Promotes the differentiation and growth arrest of prostate cancer cells in vitro
CDKN1A (p21)	6p	Belong to the Cip/Kip family and functions as an important cell cycle gatekeeper
CDKN1B (p27)	12p	



# Főbb immunológiai elváltozások prosztatarákos betegekben

## Daganat kialakulása előtt

gyulladás (prealignant proliferative inflammatory atrophy (PIA))

## Daganat korai stádiumaiban

prosztatán belül CD4+ T lymphocyták – Th17 anergiás állapotban (tolerancia)

Treg - gátló hatású reguláló lymphocyták

(mint idős emberekben nagy számban)

CD8+ T lymphocyták – anergiás állapotban, nem aktiválhatók

cytokinek, chemokinek, növekedési faktorok ill. receptoraik megváltozott termelése

androgén EGFR termelését gátló hatása megszűnik

fokozott VEGF, PDGFR- $\beta$  termelés

## Recidivák során

prosztatán belül CD4+ Treg túlsúly

myeloid derived suppressor cells (MDSCs)

nagyobb mennyiségű CD8+ T sejt – anergiás állapotban

T cell receptor b-chain variable region (Vb) – csökkent expresszió,

oligoclonális = antigén specifikus klónok (mint idős egyéneknél)

természetes ölüsejtek gátolt állapotban

tumor growth factor (TGF)-  $\beta$  fokozott termelése (CD4+, CD8+, NK sejtek gátlása)

cytokinek, chemokinek, növekedési faktorok ill. receptoraik megváltozott termelése

androgén EGFR termelését gátló hatása megszűnik

fokozott VEGF, PDGFR- $\beta$  termelés

## Androgén termelés gátlásának immunológiai hatásai

thymus sorvadás megállítása, megfordítása (egerekben)

thymus naív T lymphocyták termelésének fokozása

prosztatában a CD4+, CD8+ T lymphocyták és macrophag infiltráció fokozása

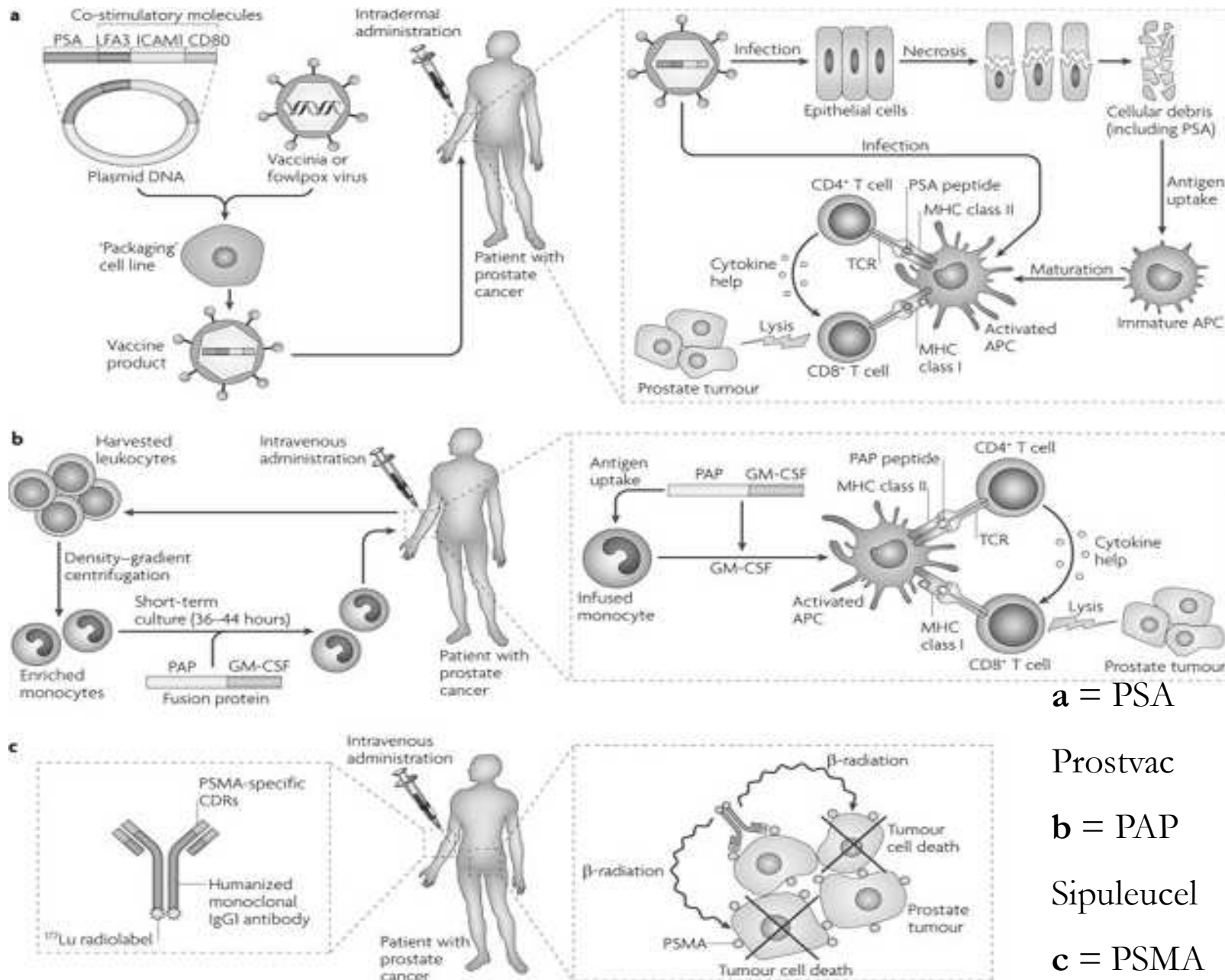
CD4+ T sejt tolerancia enyhítése

immuntherápia hatásfokának javítása (kísérleti állatokban)

# Kísérletes klinikai vizsgálatok prosztatatarák lehetséges kezelésére

Target	Agent	Phase	Summary of trial	Identifier
PI3K/mTOR	Everolimus	II	Docetaxel + everolimus for first-line metastatic CRPC	NCT00459186
	Deforolimus	II	Single-agent deforolimus for second-line metastatic CRPC	NCT00110188
VEGF	Bevacizumab	III	Docetaxel ± bevacizumab for first-line metastatic CRPC	NCT00110214
VEGF receptor	Sorafenib	II	Docetaxel + sorafenib for first-line metastatic CRPC	NCT00589420
	Sunitinib	II	Docetaxel + sunitinib for first-line metastatic CRPC	NCT00137436
		III	Sunitinib versus placebo for second-line metastatic CRPC	NCT00676650
	Vatalinib	II	Single-agent vatalinib for non-metastatic CRPC	NCT00134355
VEGF-Trap	Aflibercept	III	Docetaxel ± aflibercept for first-line metastatic CRPC	NCT00519285
Tumor-VDA	DMXAA	II	Docetaxel ± DMXAA for first-line metastatic CRPC	NCT00111618
PDGFR	Imatinib	II	Docetaxel ± imatinib for first-line metastatic CRPC	NCT00080678
EGFR/Her2	Gefitinib	II	Gefitinib + everolimus for first-line metastatic CRPC	NCT00085566
	Lapatinib	II	Single-agent lapatinib for non-metastatic CRPC	NCT00246753
Bcl-2	Oblimersen	II	Docetaxel ± oblimersen for first-line metastatic CRPC	NCT00085228
	AT-101	II	Docetaxel ± AT-101 for first-line metastatic CRPC	NCT00571675
IGF-1R	IMC-A12	II	Mitoxantrone + IMC-A12 for second-line metastatic CRPC	NCT00683475
	CP-751,871	II	Docetaxel + CP-751,871 for first- and second-line metastatic CRPC	NCT00313781
Endothelin receptor	Atrasentan	III	Docetaxel ± atrasentan for first-line metastatic CRPC	NCT00134056
	Zibotentan	III	Docetaxel ± zibotentan for first-line metastatic CRPC	NCT00617669
RANK ligand	Denosumab	III	Denosumab versus zoledronate for palliation in metastatic CRPC	NCT00321620
Vitamin D	Calcitriol	III	Docetaxel ± calcitriol for first-line metastatic CRPC (closed early)	NCT00273338
CYP17	Abiraterone	III	Abiraterone versus placebo for first-line metastatic CRPC	NCT00887198
		III	Abiraterone versus placebo for second-line metastatic CRPC	NCT00638690
Androgen receptor	MDV-3100	I/II	Single-agent MDV-3100 for non-metastatic or metastatic CRPC	NCT00510718
HDAC	Vorinostat	II	Single-agent vorinostat for second-line metastatic CRPC	NCT00330161
	Panobinostat	II	Single-agent panobinostat for second-line metastatic CRPC	NCT00667862
DNMT	Azacitidine	II	Docetaxel + azacitidine for second-line metastatic CRPC	NCT00503984
<u>Immune therapy</u>	Sipuleucel-T GVAX®	III	Provenge® versus placebo for first-line metastatic CRPC	NCT00065442
		III	GVAX versus docetaxel for first-line metastatic CRPC (closed early)	NCT00089856
		III	Docetaxel ± GVAX for first-line metastatic CRPC (closed early)	NCT00133224
CTLA-4	Ipilimumab	III	Ipilimumab versus placebo for second-line metastatic CRPC	NCT00861614
PD-1	MDX-1106	I	Single-agent MDX-1106 for refractory metastatic solid tumors including CRPC	NCT00441337

# Antigén specifikus immunterápia prosztatatarákban



**a** = PSA

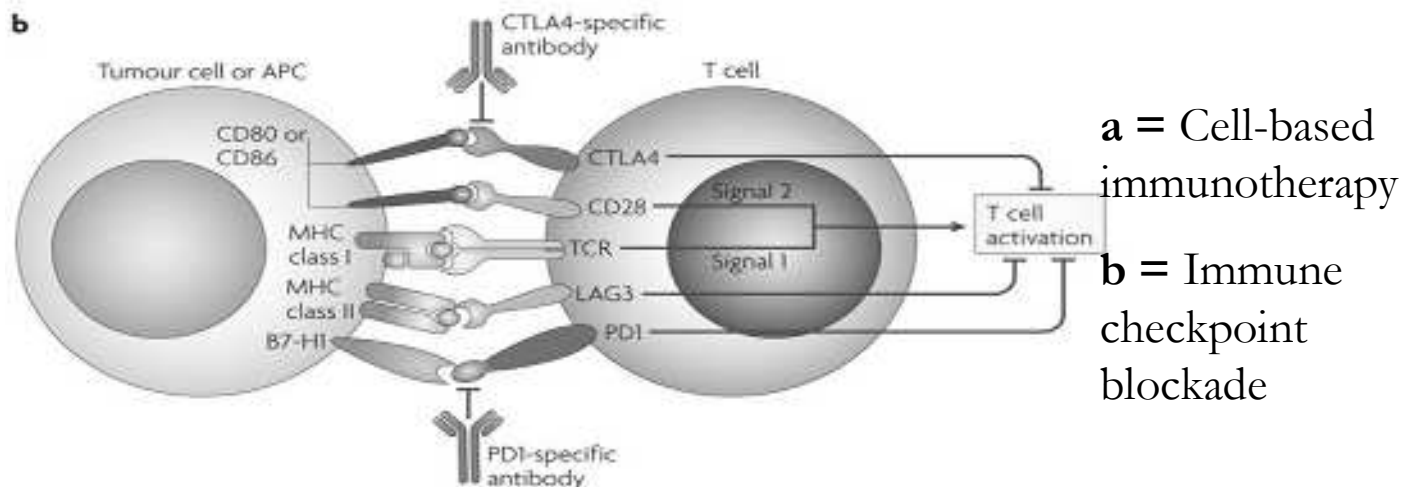
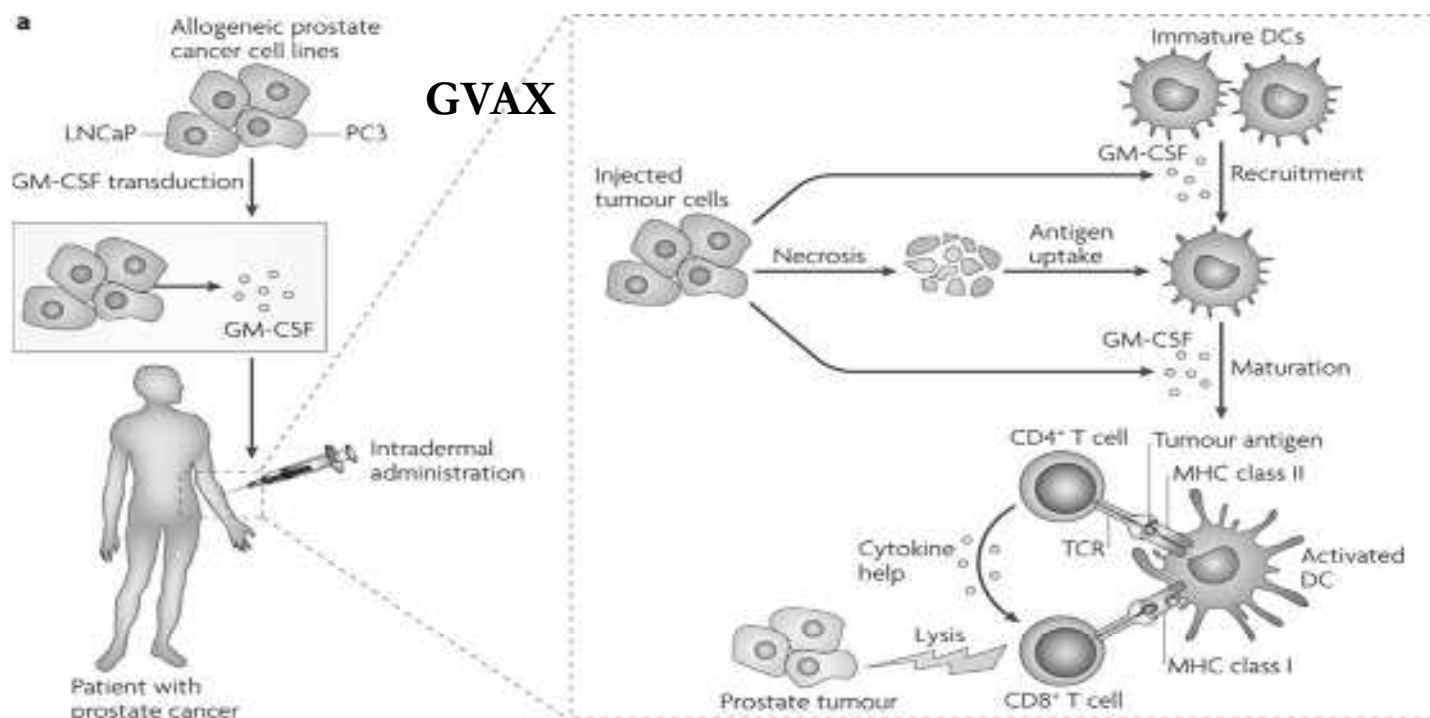
Prostvac

**b** = PAP

Sipuleucel

**c** = PSMA

# Immunterápia prosztatákban



# Immunterápia klinikai vizsgálata

Agent	Sponsoring corporation or institution	Clinical trial phase	Design or description of trial	Number of subjects	Status	Immune system effects	Clinical results or comments	Refs
Sipuleucel-T	Dendreon Inc.	III	Randomized, placebo-controlled trial of sipuleucel-T versus placebo in men with asymptomatic, metastatic CRPC (the D9901 trial)	127	Completed	Increased T cell stimulation index to vector in treated patients	Primary endpoint (TFP) not met; secondary end point (median survival duration) significantly increased (23.9 versus 21.4 months)	101
Sipuleucel-T	Dendreon Inc.	III	Randomized, placebo-controlled trial of sipuleucel-T versus placebo in men with asymptomatic, metastatic CRPC (the D9902B trial)	312	Completed	Not reported	Primary endpoint (overall survival) not met (23.8 versus 21.7 months)	141
ProstVac	Cancer Therapy Evaluation Program (CTEP)	II	Randomized trial testing the relative sequencing of encephalomyocarditis virus (PSA and recombinant vaccinia virus-PSA) in men with biochemically recurrent prostate cancer (the ELCOG 2807 trial)	64	Completed	Increased ELISPOT assay response to vaccinia virus-PSA with homologous virus boost versus homologous virus-PSA with vaccinia virus boost	Well tolerated	53
ProstVac VF	Cancer Therapy Evaluation Program (CTEP)	II	Randomized trial comparing ProstVac VF with hormonal therapy in men with non-metastatic CRPC; enemas allowed	82	Completed	Increased ELISPOT assay response to PSA in evaluable patients (n = 33) in ProstVac VF-treated group versus hormonal therapy-treated group	Increased survival in men treated with ProstVac VF followed by hormonal therapy	30, 119
ProstVac VF	Theoretic Biologics (rights now owned by Bavarian Nordic)	II	Randomized trial comparing ProstVac VF with placebo in men with asymptomatic CRPC (the TBC-PRC-002 trial)	127	Completed	No hormonal responses to PSA	Primary endpoint (TFP) not met; overall survival duration (secondary end point) increased (25.1 versus 18.6 months)	102
Prostate CVAX	Cell Genexys (rights now owned by BioSante)	I/II	Dose escalation of prostate CVAX in men with metastatic CRPC (the C0028 trial)	40	Completed	Increased antibody response to vaccinia cell lines	Well tolerated; defined dose or schedule for subsequent Phase III trials	154
Prostate CVAX	Cell Genexys (rights now owned by BioSante)	III	Open-label, randomized trial comparing prostate CVAX with docetaxel chemotherapy in men with asymptomatic, metastatic CRPC (the VITAL-1 trial)	823	Closed	ND	Closed after an unplanned interim analysis showed futility	79
Prostate CVAX	Cell Genexys (rights now owned by BioSante)	III	Open-label, randomized trial comparing prostate CVAX plus docetaxel chemotherapy with docetaxel chemotherapy in men with symptomatic, metastatic CRPC (the VITAL-2 trial)	114 (600 planned)	Halted	ND	Halted after an interim analysis showed no difference in combined treatment group (6.7 versus 4.7)	128
IgG1 immunab	Bristol-Myers Squibb/Medarex	III	Randomized, placebo-controlled trial comparing low-dose radiation with or without IgG1 immunab in men with metastatic CRPC previously treated with docetaxel chemotherapy (the CALA-043 trial)	800 planned	Ongoing	ND	ND	<a href="#">www.ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00591014</a>
<sup>177</sup> Lu-PSMA (PSMA-specific antibody)	West Medical College of Cornell University	I	Single-arm trial of <sup>177</sup> Lu-labelled PSMA-specific antibody	38	Completed	ND	Dose-limiting myelotoxicity; well tolerated, Phase II dose determined	68
<sup>177</sup> Lu-PSMA (PSMA-specific antibody)	West Medical College of Cornell University	II	Randomized trial comparing hormonal therapy (bicalutamide) with or without <sup>177</sup> Lu-labelled PSMA in men with non-metastatic CRPC	140	Ongoing	ND	ND	<a href="#">www.ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00540751</a>
DNA vaccine (prostatic acid phosphatase)	University of Wisconsin-Wisconsin Clinical Immunodiagnostics Facility	I	Testing the safety and tolerability of a novel DNA-based immunotherapy platform in men with biochemically recurrent prostate cancer	22	Completed	8 out of 22 patients showed increased T cell proliferation in response to PAP; humoral response to PAP not detected	No significant treatment-related adverse events; increase in PSA doubling time versus baseline	62

CRPC, castration-resistant prostate cancer; ELISPOT, enzyme-linked immunosorbent spot; ND, not determined; PAP, prostatic acid phosphatase; PSA, prostate-specific antigen; PSMA, prostate-specific membrane antigen; TTP time to tumor progression.\* These studies show the variety of immunotherapy approaches that have been translated from the laboratory to a clinical setting, as well as the various stages of clinical development. Only selected, illustrative trials are shown here; additional trials are discussed in several recent reviews<sup>100-102</sup>.

# Vírusok kapcsolata emberi daganatokkal

Virus	Family	Cancer	Causal role established	Mechanism
HPV 6, 18, 31, 35, etc.	Papovavirus	Cervix, anogenital, laryngeal carcinoma	Yes	Direct
Epstein-Barr virus	Herpesvirus	Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, AIDS lymphoma, Hodgkin's lymphoma	Yes	Direct
Kaposi's sarcoma herpes virus/HHV-8	Herpesvirus	Kaposi's sarcoma, pleural effusion lymphoma, multicentric Castleman's disease	Yes	Direct
Human T cell leukemia virus type I	Retrovirus	Adult T cell leukemia	Yes	Direct/indirect
Hepatitis B virus	Hepadna-virus	Hepatocellular carcinoma	Yes	Indirect
Hepatitis C virus	Flavivirus	Hepatocellular carcinoma	Yes	Indirect
HERK	Retrovirus	Testicular cancer, other cancers	No	Direct?
MMTV	Retrovirus	Breast cancer	No	?
XMRV	Retrovirus	Prostate cancer	No	Indirect?

# Prosztatarákban vizsgált mikrobák

Country/Study Description	Pathogen	Samples (+)	Total +/(n)	Findings	Reference
Sweden/201 prostate tissue samples from patients with BPH that later progressed to PC and 201 matched controls that did not.	Epstein-Barr Virus.	31		There were no differences in the prevalence of adenovirus, herpesvirus, papillomavirus, polyoma virus and <i>C. albicans</i> DNA.	Bergh J. British Journal of Cancer 2007.
	JCV.	10	43		
	BKV, HPVs, CMV.	0	(352)		
	Adenovirus, HSV1 and 2 <i>C.albicans</i> .	0 2			
Baltimore, USA/30 PC subjects for bacterial DNA and 200 PC cases for viral-parasite DNA detection.	BKV.	1	18	Most prostatectomies (87%) contain bacterial DNA from one or more species. The majority of individual tissue core samples were negative, suggesting regional heterogeneity in the presence of bacteria and a lack of a generalized or ubiquitous prostatic flora.	Sfanos KS. The Prostate 2008.
	<i>Chlamydia T</i> .	1	(200)		
	CMV.	1			
	Epstein-Barr Virus. HPVs, XMRV.	16 0			
Greece/42 samples of prostatic malignancies.	BKV.	8	10	BKV was frequently detected and could play a relevant role in the development and progression of human PC, whereas HPV does not seem to be implicated in this type of human neoplasia.	Balis V. Int J Biol Markers. 2007.
	JCV.	0	(42)		
	HPVs..	2			
LongBeach, USA/ 12 PC Fresh frozen tissues and 20 paraffin-embedded archival samples.	HPVs..	0 (20), 6 (12)	10 (20)	The prostate is a complex habitat where mixed infections with oncogenic DNA viruses frequently occur and opens the discussion to the potential role of these viruses in the PC.	Zambrano A, Prostate 2002.
	JCV.	10 (20),6 (12)	And		
	BKV.	0 (20), 3 (12)	7(12)		
Monterrey, Mexico/55 Cases of PC and 75 Controls.	JCV, BKV, SV40.	0	22	HPV frequency was significantly higher in PC cases than in controls; this finding suggests their participation in PC development or tumor progression.	This work.
	HPVs.	15	(130)		
	HCMV.	6			
	XMRV.	1			

# XMRV felfedezése

Robert H. Silverman PhD, Cleveland, OH



Hereditary prostate cancer gene 1 (HPC1) = RNase L = RNASEL  
RNASEL károsodás öröklődő prosztatatarák sejtekben →  
magnövekedett fogékonyság vírusfertőzés iránt → vírus szűrés  
(Virochip) →

XMRV = xenotropic murine retrovirus-related retrovirus  
xenotróp egér-retrovírussal rokon retrovírus

**XENOTRÓP:** - reservoir provírus DNS egyik faj sejtjeinek  
kromoszóájába integrálódott,  
- a termelődött vírusok más faj sejtjeit fertőzik

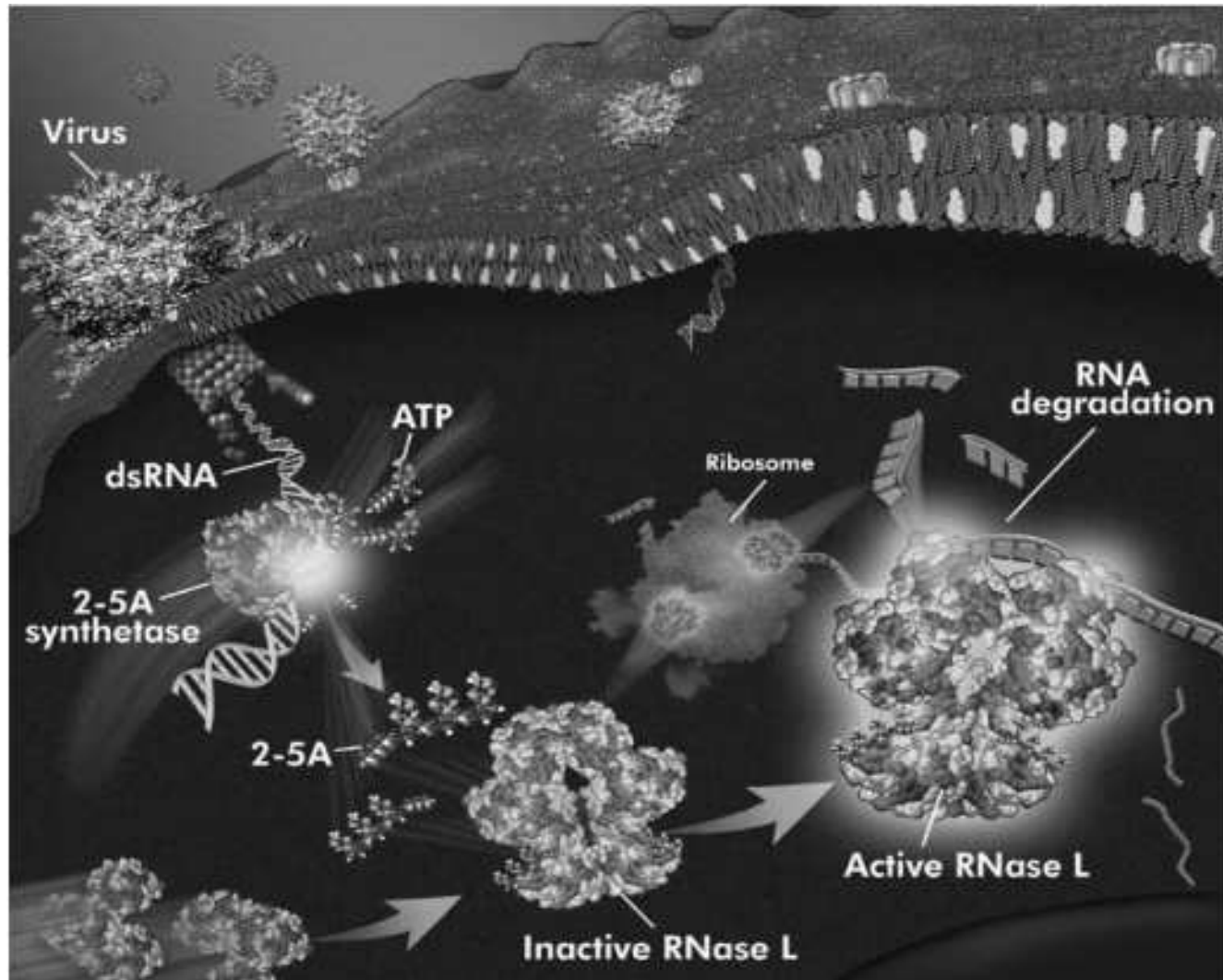
**XMRV RENDSZERTANI HELYE:**

**RETROVIRIDAE CSALÁD**

**GAMMA-RETROVÍRUS ALCSALÁD**



# A 2-5A/RNase L rendszer mint a természetes antivirális immunitás része



# Retrovírusok rendszertana

## ALPHA-RETROVÍRUSOK

- ALV.....madár leukaemia (avian leukosis) vírusok (RSV...Rous sarcoma vírus)

## BETA-RETROVÍRUSOK

- MMTV.....egér emlőtumor (mouse mammary tumour) vírusok
- HERV-K.....humán endogén retrovírus K

## GAMMA-RETROVÍRUSOK

- MLV (vagy MuLV)....egér (murin) leukaemia vírus
- FeLV, GALV....macska ill. gibbon ape leukaemia vírusok
- XMRV.....xenotróp egér retrovírussal rokon retrovírus
- HERV-H, -W, PERV.....humán ill. sertés (porcin) endogén retrovírusok

## DELTA-RETROVÍRUSOK

- HTLV-I/II.....humán T-sejtes lymphoma-leukaemia vírusok
- BLV.....bovin leukémia vírus

## EPSILON-RETROVÍRUSOK

- WDSV.....Wallaye dermal sarcoma vírus halakban

## LENTI-RETROVÍRUSOK

- HIV, SIV, FIV, BIV...emberi, majom, macska, szarvasmarha immundeficiencia vírusok

## SPUMAVÍRUSOK

- „Foamy vírusok” .....emberi, csimpánz, bovin, macska „foamy vírusok”
- HERV-L

# Gammaretrovírusok

## A RETROVÍRUS CSALÁD NAGYON KÜLÖNÁLLÓ ALCSALÁDJA

- sok onkogén hatású vírus különböző emlős fajokban

RNS → REVERZ TRANSZKRIPCIÓ → PROVIRÁLIS DNS → SEJT-DNS-BE INTEGRÁLÓDÁS  
A PROVÍRUS LAPPANG A KROMOSZÓMÁBAN, SEJTOSZTÓDÁS SORÁN ÁTÖRÖKLŐDIK

## RETROVÍRUS „LONG TERMINAL REPEAT” (LTR) AKTIVÁLÓDHAT

- részleges aktiválódás → sejtgén működés befolyásolása
- teljes aktiválódás → vírustermelés

## AKTIVÁLÓ ÁGENSEK

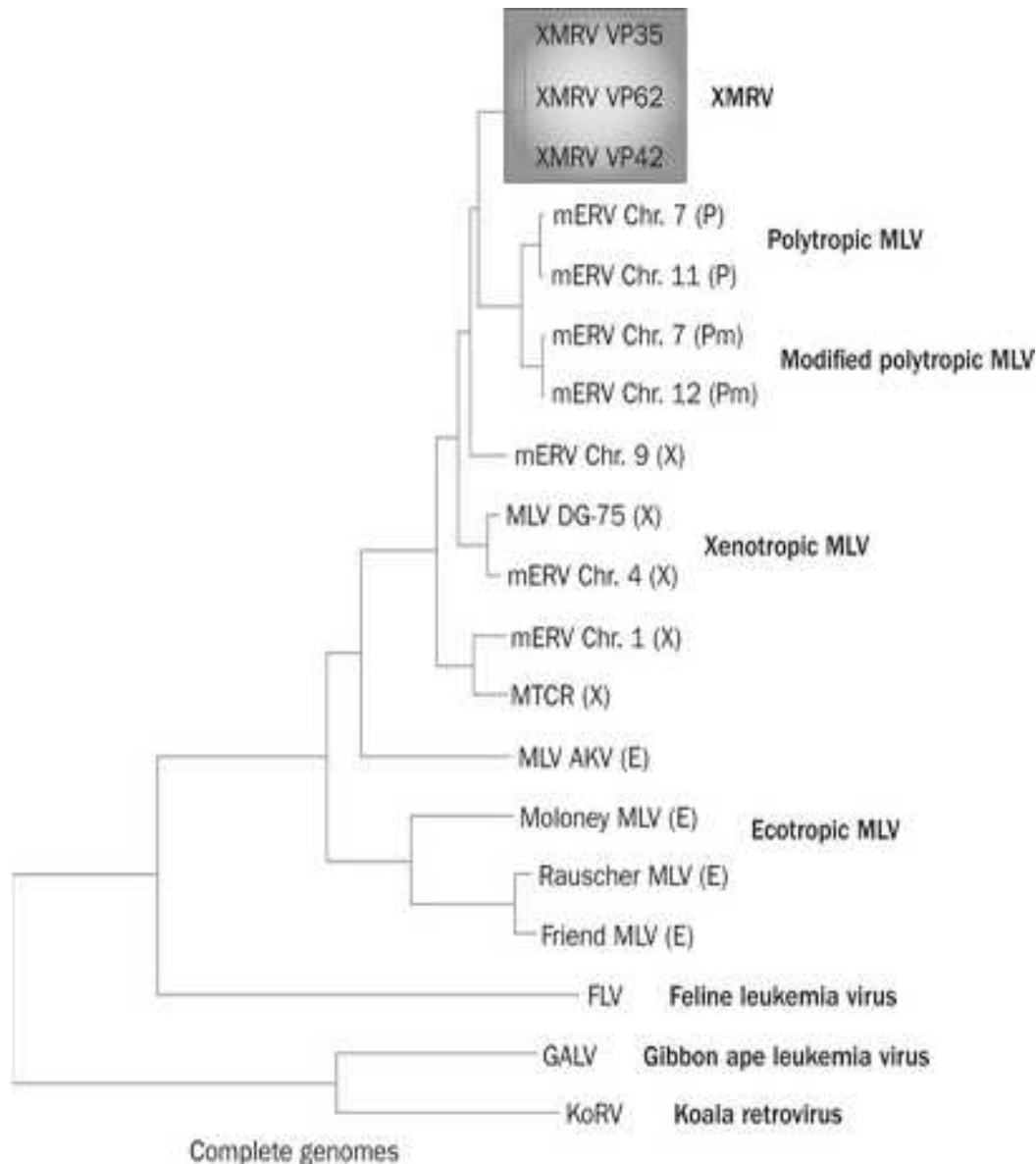
- egyéb (heterológ) vírusok transzaktiváló hatása
  - ugyanazon sejtben vagy sejtek között mediátorok révén
- carcinogén vegyületek, mitogének, UV sugárzás
- hormonok, citokinek, chemokinek, gazdaszervezeti változások

## RETROVÍRUS LTR AKTIVÁLÓDÁS KÖVETKEZMÉNYEI

- enhancer hatással a szomszédos sejtgének / onkogének aktiválódása
- promoter hatással álgének létrehozása, expressziója
- polyadenyláció hatásaként génkifejeződés megszakadása
- mRNS-ek átszabása (splicing) megváltozik
- RNS interferencia révén génkifejeződés gátlása

# Az XMRV

## rendszertani helye és rokonsága más retrovírusokkal



**Mus musculus**

**Egér Gammaretrovírusok**

**(MLV)**

Sejtek fertőzése

**Egér**

**Nem**

**rágcsáló**

Polytropic +

+

Ecotropic +

-

Xenotropic -

+

**de: Bxv1, F/St,**

**SWR, SJL,**

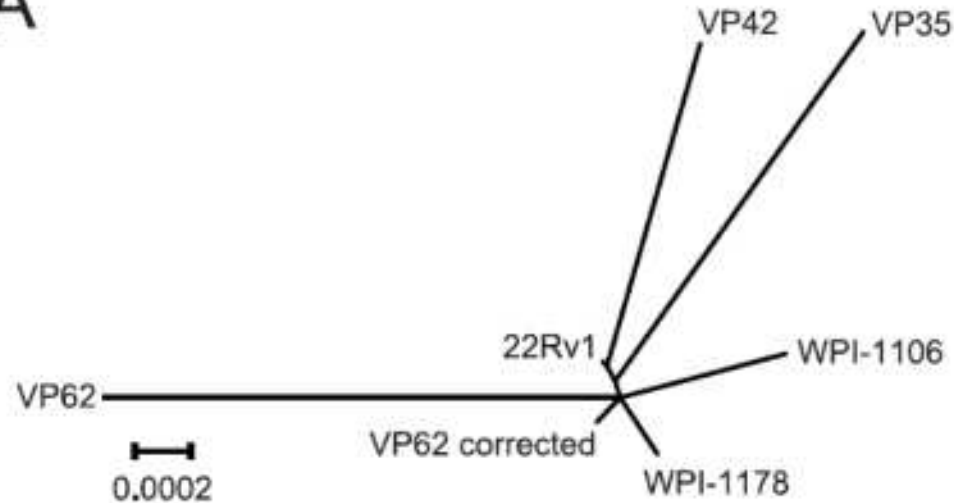
**SIM.R+**

**Mus pahari +**

**Mus molissinus +**

# XMRV törzsek csoportosítása

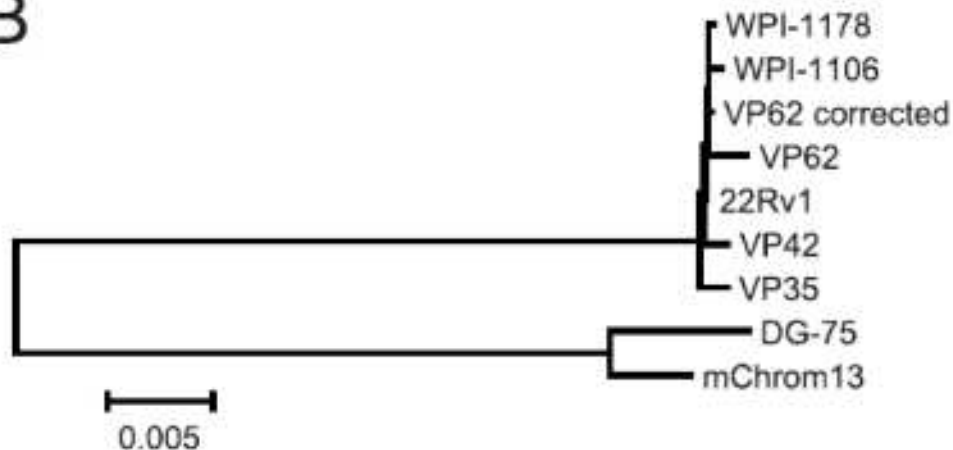
A



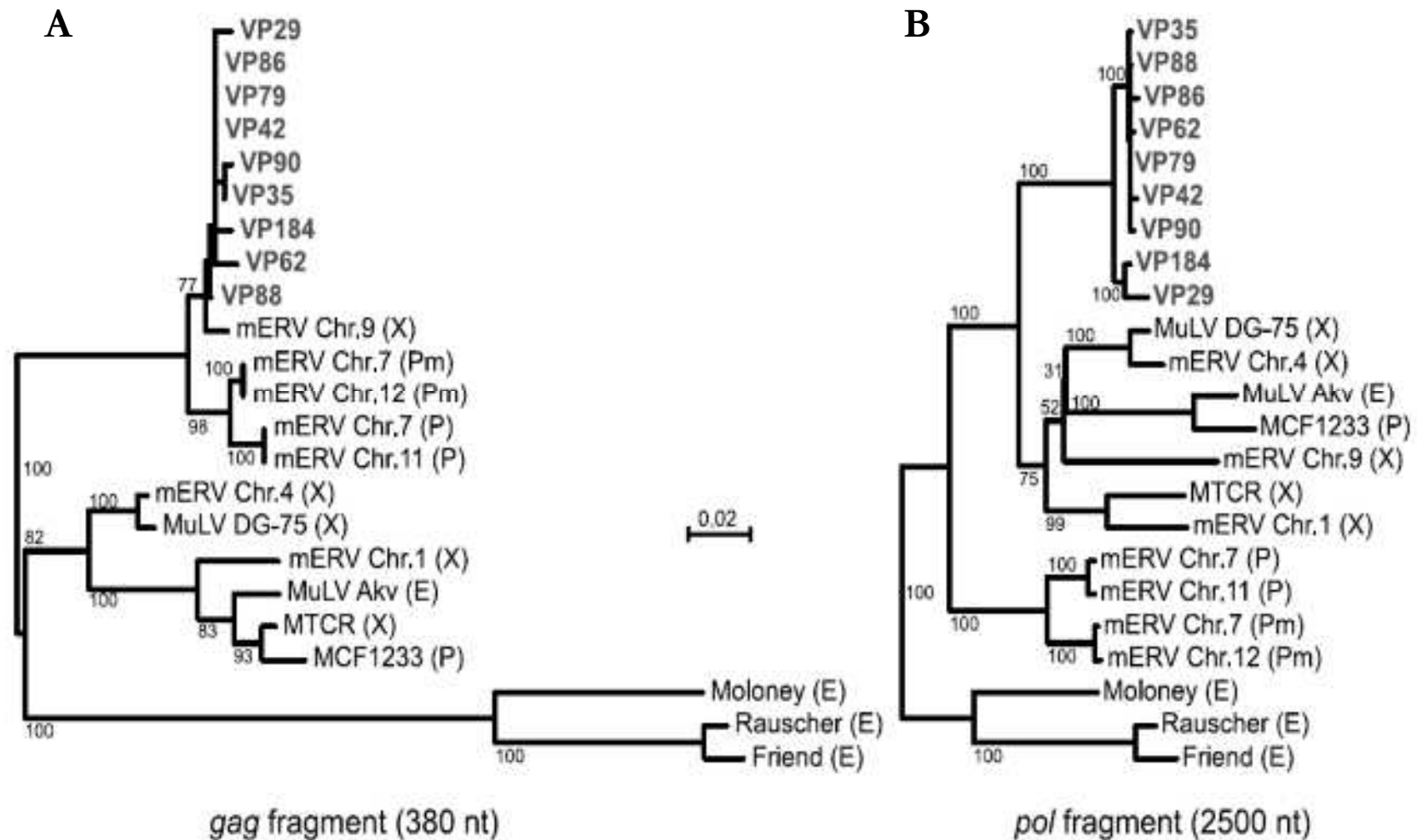
■ Nukleotid eltérés:  
0,03%

■ Kevés variáns =  
1 egyénben kevés  
replikációs ciklus

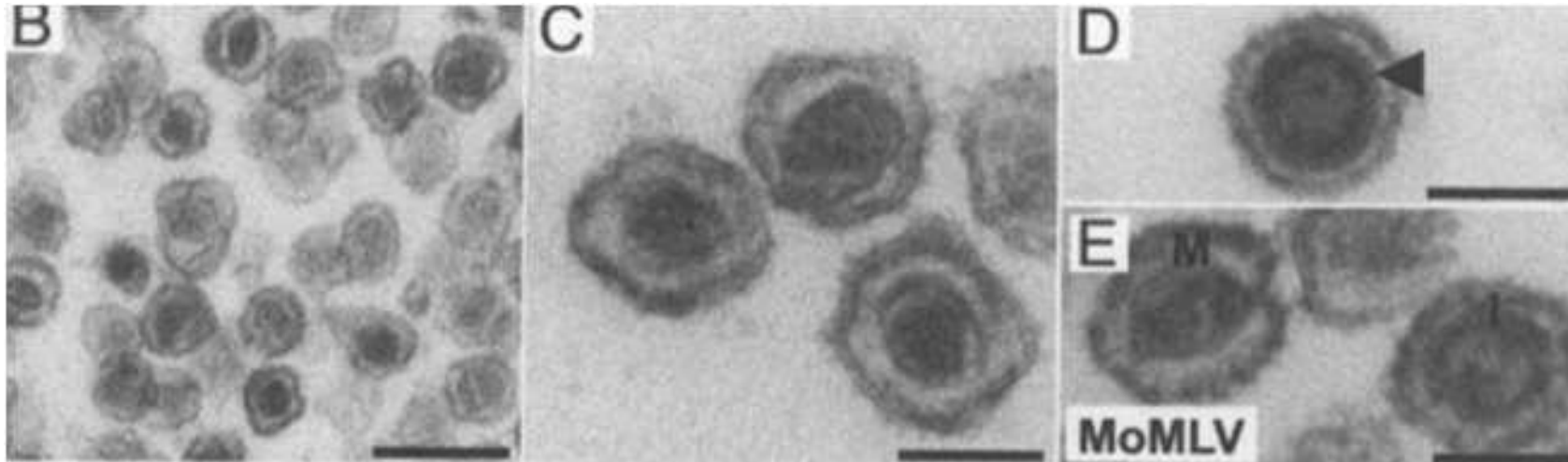
B



# XMRV előfordulása prosztatarákos betegekben



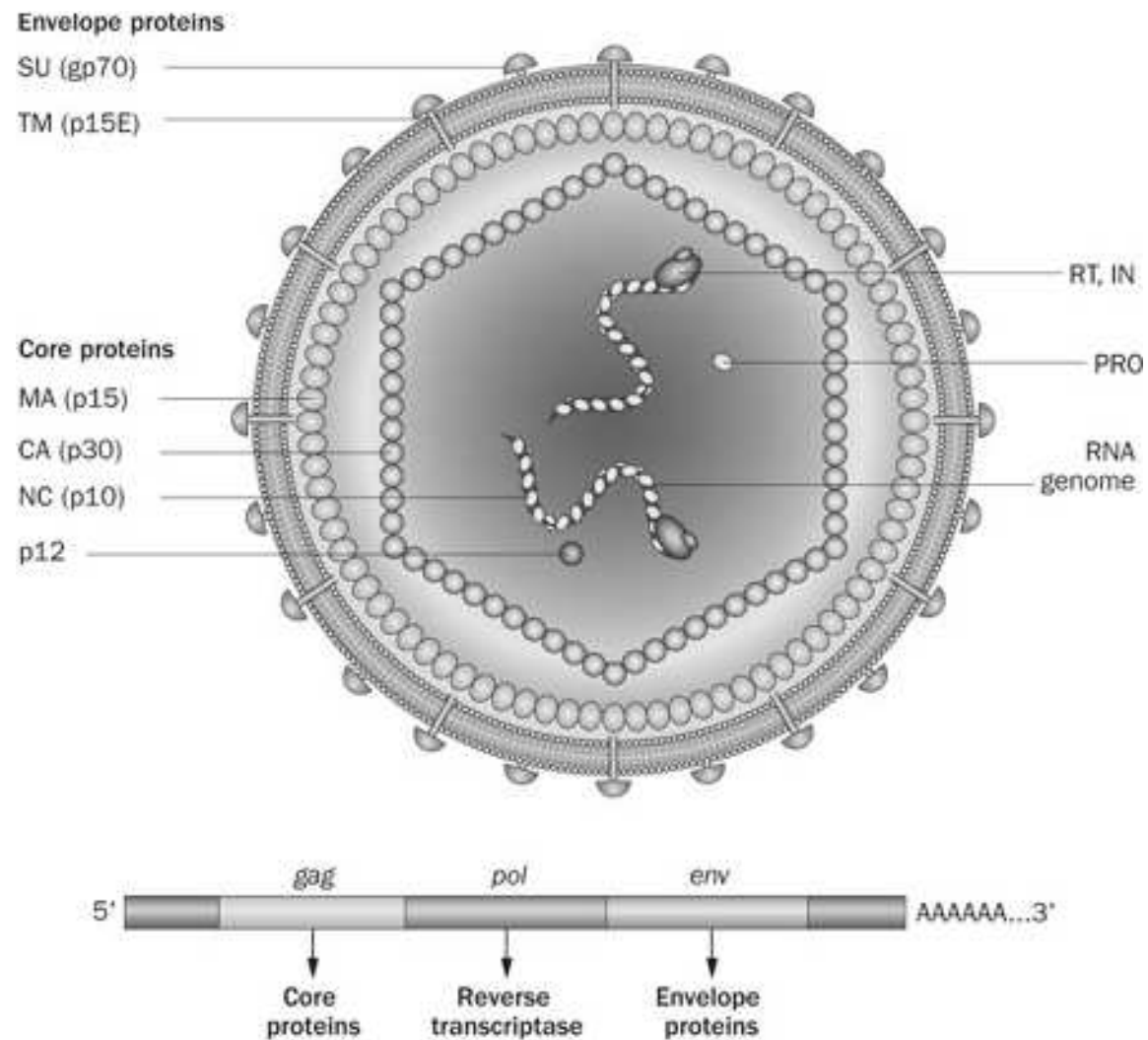
# XMRV morphológiája



**B – D = XMRV**

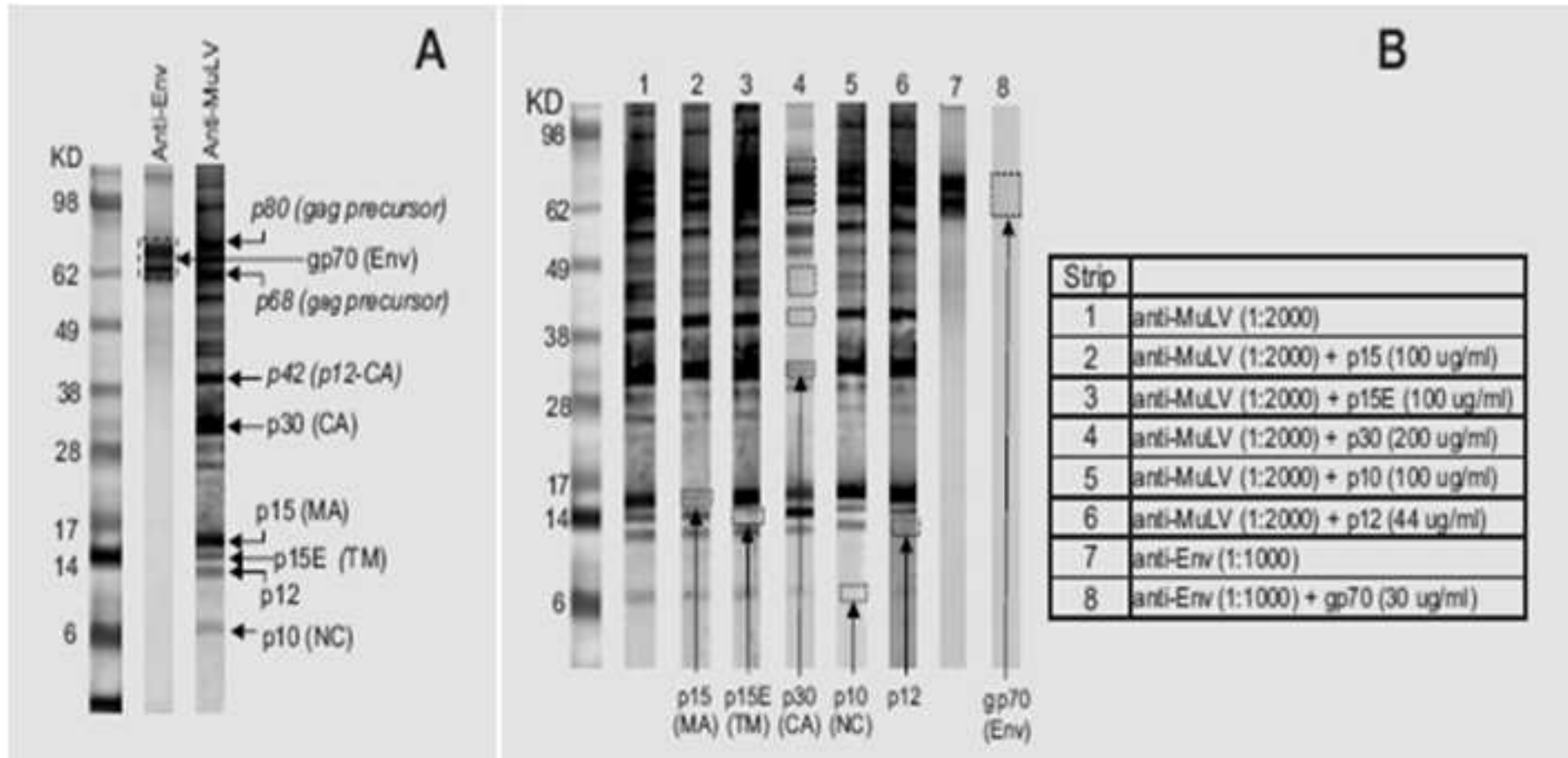
**E = MoMLV = Moloney murin leukémia vírus**

# XMRV szerkezete





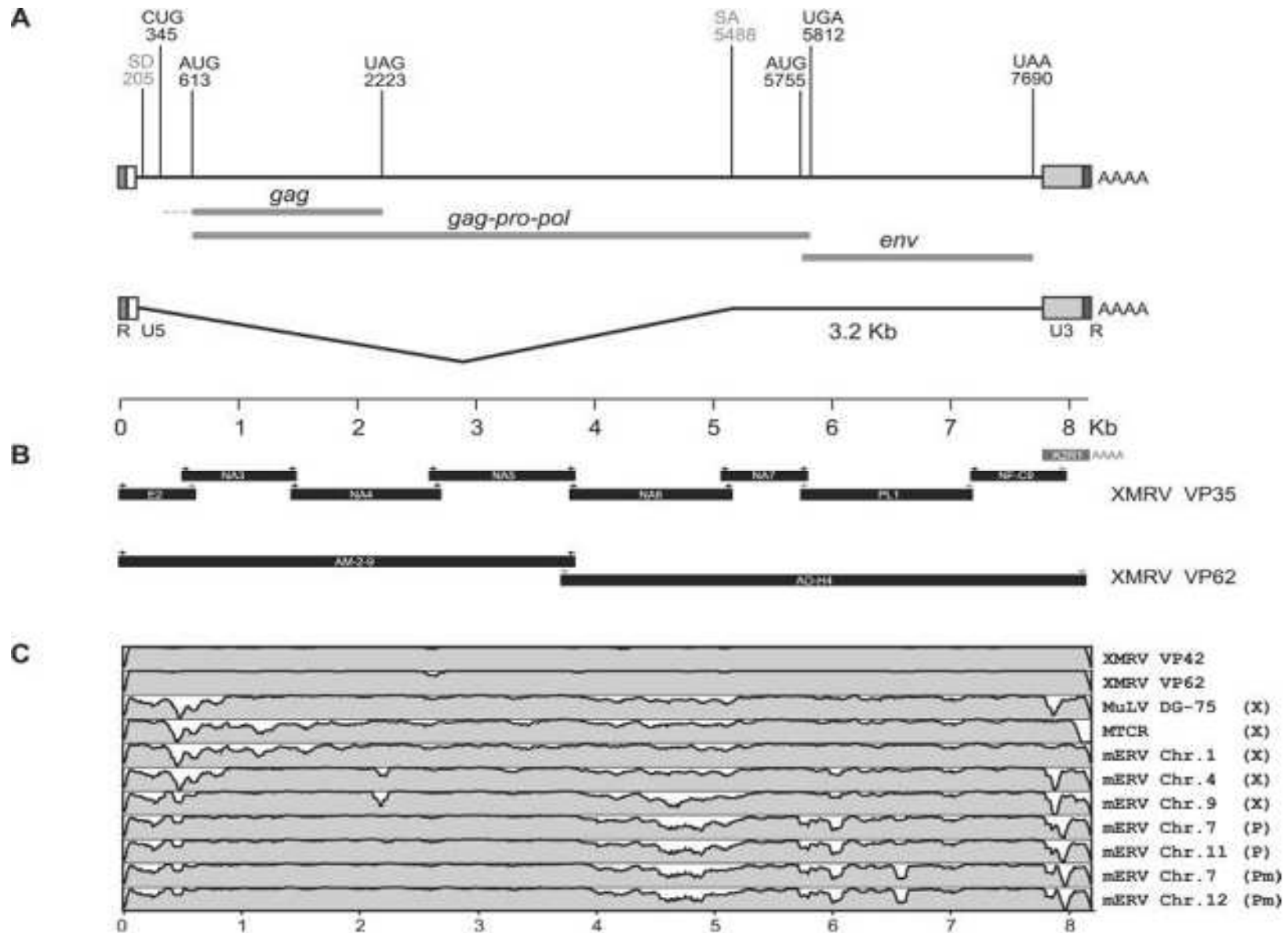
# XMRV fehérjéinek vizsgálata (WB)



**A:**  $\alpha$ -MLV polyclonális antitestek

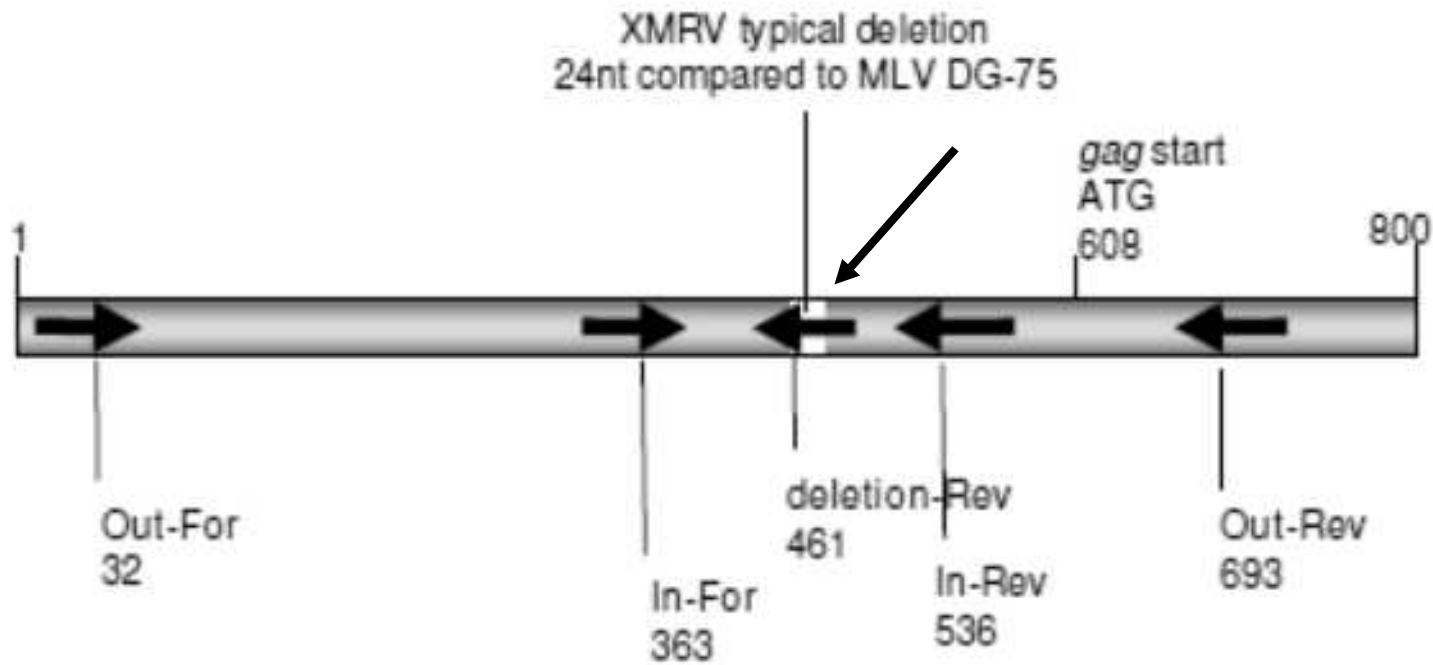
**B:** kompetitív gátlás rXMRV fehérjékkel

# Az XMRV genomja (8185 nucleotid)



# XMRV spezifikus 24 nucleotid deletio

A



# XMRV génszerkezete és rokonsága más retrovírusokkal

## XMRV GÉNJEI

- LTR-gag-pro/pol-env-LTR, 8185 nukleotid (nt)
- nem tartalmaz onkogén szekvenciákat

## - LTR REGULÁLÓ SZEKVENCIÁK

- 535 nt, köztük „glucocorticoid response element” – steroidok, androgének aktiváló hatása
- 94-96% szerkezeti rokonság más retrovírusokkal
  - egerek fertőző leukaemia vírusai (96%: MuLV NFS-Th1)
  - emberi B-lymphoblastoid sejtvonalból nyert vírus (94%: DG-75)
- különböző egyének daganataiból nyert sejtvonalakból kimutatott retrovírusok nt azonossága 98%, aminosav azonossága 99%

## Gag

- nem kódoló régiók, vírusfehérjéket kódoló régiók → nagy változékonyság, daganat progresszió oka (?)
- 24 nt deléció más MuLV-hoz képest → emberi fertőzés lehetősége (?)

## Pro/Pol

- virális proteáz és polymeráz (=reverz transzkriptáz)
- 1197 aminosavból álló fehérje
- rokonság egér leukaemia vírusokkal (96%), DG-75 emberi retrovírussal (97%)

## Env

- vírus boríték („envelope”) fehérje 645 aminosavból álló fehérje
- rokonság emberi kissejtes tüdőrák sejtvonalból (NCI-417) nyert retrovírussal (95%)
- Moloney murin leukémia vírus SU fehérjével 50% homológia: sejtspecificitás oka

# XMRV és MoMLV aminosav homológiája

	MW	MW <sub>Calc.</sub>	Similarity	HIV
<b>Gag</b>	p62	60.4	87%	
<b>MA</b>	p15	14.1	79%	
<b>p12</b>		8.7	79%	
<b>CA</b>	p30	30.7	95%	
<b>NC</b>	p10	6.4	92%	
<b>PR</b>		13.3	96%	28%
<b>RT</b>		74.9	95%	17%
<b>IN</b>		45.5	81%	14%
<b>Env</b>	gp75	69.9	66%	
<b>SU</b>		47.8	54%	
<b>TM</b>		19.6	91%	
<b>p2E</b>		2.5	75%	

# Kísérletesen vizsgált prosztata sejtek főbb tulajdonságai

Sejtvonal	Eredete, jellege	RNase L	Egyéb	Hormon érzékenysé g	APOBEC	XPR1	XMRV termelés
22Rv1	Prosztatarák, hámsejt				A3G hiány		10 kópia/sejt integrált ++++
DU145	Prosztatarák, hámsejt		IFN- $\beta$ reaktív	AR – GR +	A3G hiány	+	-
LNCaP	Prosztatarák, Nyirokcsomó áttét, hámsejt	hiány JAK/ STAT hiány	IFN- $\beta$ zavar	AR + GR -	A3G hiány	+	++++
PC3	Hámsejt					+	
Pm151T	Prosztata, simaizom	RR					
Pf179T	Prosztata, fibroblaszt	RQ					
Ep156T	Hámsejt	RQ					

# XMRV integrálódása DU145 klónokban

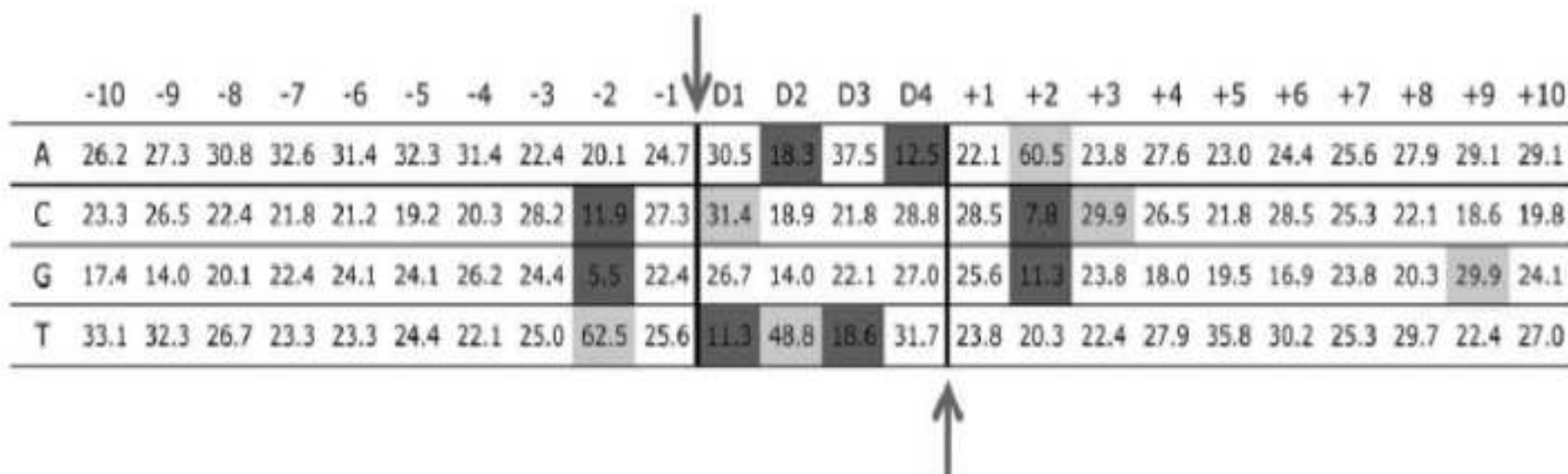
Cell Clones	Integration Site* (chromosome; nucleotide position)	Duplication Length (bp)
C-1	13; 77,016,416 (+)	4
C-3	2; 33,211,657 (+)	273 †
C-4	5; 34,622,591 (+)	4
C-5	10; 25,254,665 (+)	4
C-6	1; 19,788,033 (+)	4
	2; 19,118,533 (+)	4
C-7	4; 109,005,770 (–)	4
	5; 64,073,721 (+)	4
	9; 94,680,941 (–)	4
	19; 2,119,434 (+)	4
C-8	1; 8,643,694 (+)	4
	1; 9,804,426 (+)	4 ‡
C-9	2; 109,669,551 (–)	4
C-10	6; 30,858,925 (+)	5
C-12	16; 67,648,746 (–)	4

\*The nucleotide position corresponds to the position of viral DNA insertion at the top strand of the chromosome indicated. Symbols + and – within the parenthesis indicate the orientation of the viral transcription is the same and opposite, respectively, to the polarity of the top strand. GenBank accession numbers for the integration site sequences are GU816075 to GU816104.

†The left LTR of the provirus contains a 5-bp deletion that includes the conserved CA dinucleotide at the viral end.

‡The target DNA contains a T to A transversion immediately adjacent to the left LTR (position 4).

# XMRV integrálódási helyeinek nukleotid összetétele DU145 sejtekben



	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	D1	D2	D3	D4	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	+8	+9	+10
A	26.2	27.3	30.8	32.6	31.4	32.3	31.4	22.4	20.1	24.7	30.5	18.3	37.5	12.5	22.1	60.5	23.8	27.6	23.0	24.4	25.6	27.9	29.1	29.1
C	23.3	26.5	22.4	21.8	21.2	19.2	20.3	28.2	11.9	27.3	31.4	18.9	21.8	28.8	28.5	7.8	29.9	26.5	21.8	28.5	25.3	22.1	18.6	19.8
G	17.4	14.0	20.1	22.4	24.1	24.1	26.2	24.4	5.5	22.4	26.7	14.0	22.1	27.0	25.6	11.3	23.8	18.0	19.5	16.9	23.8	20.3	29.9	24.1
T	33.1	32.3	26.7	23.3	23.3	24.4	22.1	25.0	62.5	25.6	11.3	48.8	18.6	31.7	23.8	20.3	22.4	27.9	35.8	30.2	25.3	29.7	22.4	27.0

D1-D4: target site duplication

High fidelity direct repeats



# XMRV familiáris prosztatatarákban

## FAMILIÁRIS PROSZTATA RÁK

- az összes prosztatata rákos eset kb. 10-20%-a
- öröklődő, egy családban >3 beteg
- korán fellép (<55 éves kor)
- „hereditary prostate cancer gene (HPC) 1” =  
RNase L (RNASEL) gén mutációja
- öröklődő mutáció: európai eredetű népességben  
nt: G1385A → aminosav csere: R462Q (Arg → Gln)  
(Japánban RNase L 3 más mutációja fordul elő)
- következmény: enzimaktivitás 1/3ra csökken → IFN I aktivitása során a  
főlegessé vált saját RNS és a virális RNS molekulák lebontása  
csökken →  
vírus elimináció (XMRV, influenza, HSV, EMCV, WNV, Coxsackie-v.)  
romlik
- RNASEL aktivitás gyógyszeres serkentése: XMRV, VSV, EMCV gátlása
- mutációt nem hordozó egyénekben és sejtkultúráikban (DU145) az  
XMRV IFN- $\beta$  érzékeny
- apoptosis nem következik be, további gének (pl. MIC-1) aktiválása  
csökken
- rák kockázata: homozygóták: 2x, heterozygóták: +50%

# **XMRV kimutathatósága familiáris prosztatarákban**

**Kimutathatóság aránya: homozygótákban (QQ) 40%**

**heterozygótákban (QR) 2%**

**egészségesekben (RR) 2%**

**Kimutatás módszerei: PCR, DNS-microassay /Virochip/, FISH, IHC**

- **Gag antigének a stroma fibroblastokban és immunsejtekben (FLC ellenes monoklonális antitestekkel vizsgálva)**
  - **QQ: a prosztata sejtek 0,4-1,2%-ában, QR és RR: 0,15%**
- **provirális DNS az előbbi sejtek magjában és a mag körül**
- **nincs vírus a daganatsejtekben !**

**Feltételezhető hatás: stroma sejtek által termelt cytokinek, növekedési faktorok idézik elő a daganatos elfajulást (parakrin mechanizmus)**

- **„semen derived enhancer of virus infection (SEVI)” – amyloid molekula = prosztata savanyú foszfatáz elősegíti a vírus sejtreceptorokhoz való kötődését**

# XMRV kimutatása prosztatarákos betegekből

Patient	<i>RNASEL</i> Genotype <sup>a</sup>	Number of Cells Counted <sup>b</sup>	Number of FISH-Positive Cells (%)	XMRV FISH <sup>c</sup>	XMRV <i>gag</i> RT-PCR
VP 88	QQ	408	5 (1.23)	++	+
VP 31	QQ	526	6 (1.14)	++	–
VP 42	QQ	530	6 (1.13)	++	+
VP 62	QQ	904	10 (1.11)	++	+
VP 29	QQ	659	7 (1.06)	++	+
VP 79	QQ	464	2 (0.43)	+	+
VP 10	QQ	872	1 (0.12)	+/-	–
VP 35	QQ	849	1 (0.12)	+/-	+
VP 90	QQ	843	1 (0.12)	+/-	+
VP 45	RQ	987	0 (0)	–	–
VP 46	RQ	794	0 (0)	–	–
VP 30	RR	661	1 (0.15)	+/-	–
VP 50	RR	787	1 (0.13)	+/-	–
VP 51	RR	842	0 (0)	–	–

<sup>a</sup>*RNASEL* genotypes are as follows: QQ, homozygous R462Q variant; RQ, heterozygous; RR, homozygous wild-type.

<sup>b</sup>All types of prostatic cells are included.

<sup>c</sup>+/- = 0.1%–0.2%; + = 0.2%–1%; ++ = >1%.

DOI: 10.1371/journal.ppat.0020025.t002

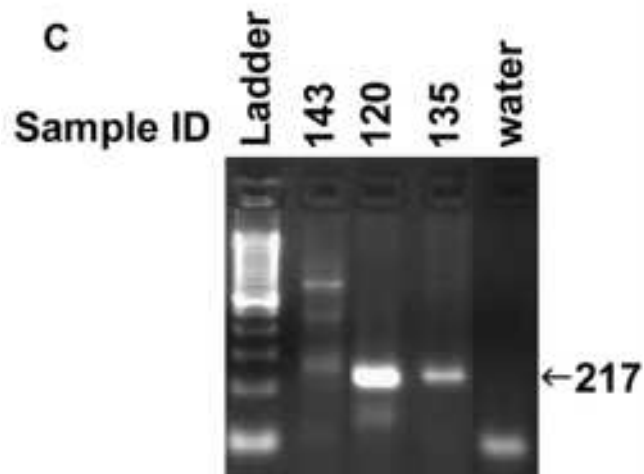
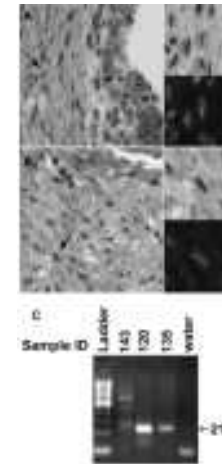
# Az XMRV vizsgálatra kerülő betegek csoportosítása

	Sample ID						
Characteristic	22	69	120	135	143	177	324
Age at surgery	69	43	50	57	56	42	48
Race	White	Black	White	White	White	Black	White (Turkish)
Preoperative PSA (corrected) (ng/mL)	2.97 (6)	4.6	22	2.5	3.9	3.8	16.86
Preoperative stage	T1c	T1c	T2a	T1c	T2a	T1c	T2a
Biopsy Gleason score	3 + 3 = 6	3 + 3 = 6	3 + 4 = 7	3 + 3 = 6	4 + 3 = 7	3 + 3 = 6	3 + 3 = 6
Stage	pT2cNxMx	pT2cNxMx	pT3bN0Mx	pT2cNxMx	pT3aN0Mx	pT2cNxMx	pT3bN1Mx
Operative Gleason score	3 + 4 = 7	3 + 3 = 6	3 + 4 = 7	3 + 3 = 6	3 + 4 = 7	3 + 3 = 6	4 + 3 = 7
Percentage of involvement	<u>40%</u>	<u>5-10%</u>	20%	15%	<u>5%</u>	<u>40%</u>	25%
Bilateral or unilateral	Bilateral	Bilateral	Bilateral	Bilateral	Bilateral	Bilateral	Bilateral
Extracapsular extension	Negative	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Negative
Margin status	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Perineural involvement	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Positive	Positive
Seminal vesicle involvement	Negative	Negative	Positive (R)	Negative	Negative	Negative	Positive (R)

# Prosztatarákos szövetek vizsgálata

A: Haematoxin-eosin festés (HE)  
és Fluorescein In Situ Hybridisation  
(FISH)

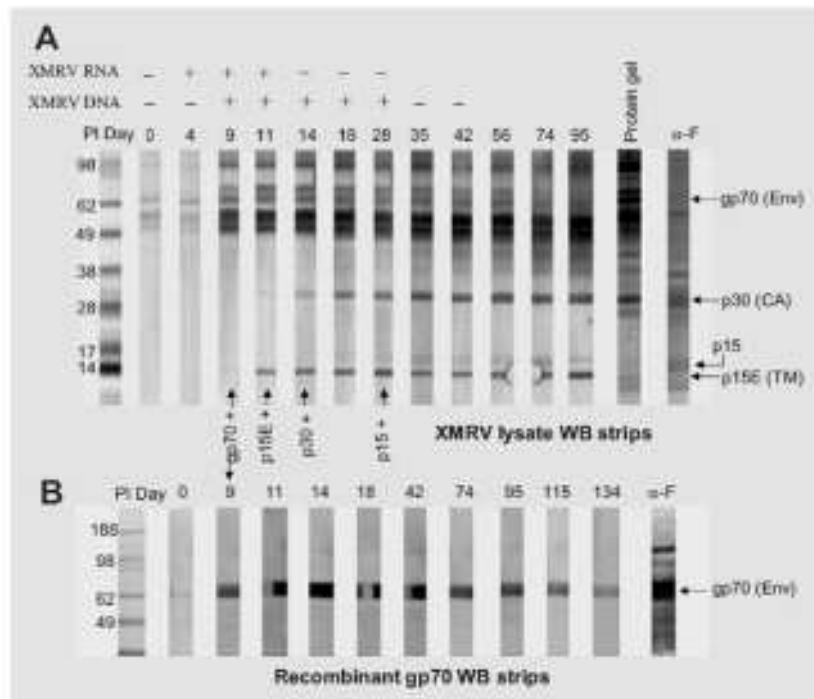
→ = XMRV pozitív stroma sejtek



B: HE és FISH

C: XMRV env specifikus fézkes PCR

# XMRV szerokonverzió időbeli kialakulása Rhesus majmokban (WB)



# XMRV sporadikus prosztatatarákban

**XMRV kimutathatósága:**

- XMRV DNS a daganatok 6,2 %-ban, 1-10 kópia/sejt kontroll minták (TURP) 2 %-ban
- XMRV protein expressio a daganatminták 23 %-ban  
XMRV ellenes, nyúlban termelt antitestekkel kimutatva  
XMRV nincs minden daganatsejtben !

**XMRV detektálása a páciensek különböző prosztatasejtjeiben:**

- 85% csak a rákos hámsejtekben
- 7,5% rákos hámsejtekben és stroma sejtekben
- 7,5% csak a stroma sejtekben

legtöbbször a daganatos sejtek 1-1 csoportja pozitív

**XMRV pozitivitás aránya növekszik:**

- magasabb Gleason pontértékű ill. agresszív daganatokban
- pT2 → pT3 növekszik a klinikai stádiumban

kontroll minták (TURP) 4 %-ban (3%: csak a hámsejtekben,  
1%: hámsejtekben és stroma sejtekben)

**Feltételezhető hatásmechanizmus: direkt**

„hit and run” – XMRV genom elveszett  
indirekt, mediátorokon keresztül

# XMRV klinikai vizsgálata

Study	XMRV detected	RNase L QQ association	Methods	Cell types or fluid
<b>Prostate cancer</b>				
Urisman et al. (2006) <sup>4</sup>	Yes; 10%	Yes (8/20 QQ; 1/66 RR or RQ)	Pan-viral DNA microarray, RT-PCR, FISH, IHC	Stromal fibroblasts and hematopoietic cells
Kim et al. (2008) <sup>29</sup> ; Dong et al. (2007) <sup>28</sup>	Yes	Yes (8/9 QQ; 1/9 RR)	Integration site mapping	Peripheral zone prostate tissue
Arnold et al. (2010) <sup>36</sup>	Yes; 27.5%	Yes (8/20 QQ; 3/20 RQ or RR)	Immune response (neutralizing antibodies), PCR, FISH	Serum, stromal fibroblasts
Knouf et al. (2009) <sup>31</sup>	Yes	Yes	RT-PCR	Epithelial cells (22Rv1)
Hong et al. (2009) <sup>67</sup>	Yes	No	Quantitative RT-PCR, nested RT-PCR	Expressed prostate secretions
Schlaberg et al. (2009) <sup>30</sup>	Yes; 27%	No	Quantitative PCR, IHC	Epithelial cells
Furuta (2009) <sup>38</sup>	Yes; 6%	ND	Immune response, RT-PCR	PBMCs
Fischer et al. (2008) <sup>39</sup>	Low	No	RT-PCR	Peripheral zone prostate tissue
Sfanos et al. (2008) <sup>7</sup>	No	ND	PCR	Prostate tissue
Hohn et al. (2009) <sup>32</sup>	No	No	PCR, RT-PCR, ELISA	Prostate tissue, serum
D'Arcy et al. (2008) <sup>40</sup>	No	No	RT-PCR	Prostate tissue
<b>Chronic fatigue syndrome</b>				
Lombardi et al. (2009) <sup>33</sup>	Yes; 67%	No	PCR, western blots, culturing virus, immune response	PBMCs, T cells, B cells, plasma
Erlwein et al. (2010) <sup>44</sup>	No	ND	PCR	Whole blood
Groom et al. (2010) <sup>37</sup>	No	ND	PCR, serum neutralization assay	PBMCs, serum
Van Kuppeveld et al. (2010) <sup>45</sup>	No	ND	PCR	PBMCs
<b>Amyotrophic lateral sclerosis</b>				
McCormick et al. (2008) <sup>46</sup>	No	No	Real-time PCR, RT-PCR	PBMCs, serum

Silverman, R. H. et al. Nat. Rev. Urol. 2010.



# Chronic Fatigue Syndrome (CFS)

Idült fáradtság tünetegyüttes. Más fáradtság tünetegyüttesek is vannak.

Etiológia: ismeretlen

korábbi vizsgálatok: bétaherpesvírusok

különösen humán herpesvírus 6 (B) mint kofaktor

EBV, enterovírusok, parvovírus B19, Borrelia burgdorferi, mycoplasmák, Coxiella burnetti

Előfordulás: népesség 0,4-1 %-ában

Kórkép: fertőző betegségekre utaló, gyorsan lezajló kezdeti tünetek - járványok

A betegség kritériumai nincsenek jól meghatározva:

diagnózis legtöbbször kizárásos alapon

Régi Oxford/1994 Fukuda kritériumok

Új: Canadian Consensus Criteria (CCC)

myalgic encephalomyelitis/CF immune deficiency syndrome

idegrendszeri + immunológiai károsodások

természetes ölüsejtek károsodása

daganatok incidenciája gyakori

RNase L károsodás gyakori!

Kezelés: empirikus, nem konvenciális: homeopátia, hypnosis, akupunktúra,

immunstimulánsok (pl. S. aureus toxoid), i.v. Ig, hydrocortison,

anti-depresszánsok, -allergiás szerek, vérnyomás emelők

IFN- $\beta$  gátlók TNF- $\alpha$  ,

hatásos: viselkedés terápia, tornagyakorlatok

XMRV vizsgálat indokoltsága: ismert RNase L károsodás

járványos, orvos által diagnosztizált esetekből (Incline, Nevada)

Virochip: élőben elérhető perifériás fehérvérsejtekből 7-14 napos aktiválást követően

# XMRV vizsgálata egyéb betegekben

## Egészséges véradókban

CFS beteg ne adjon vért

Kanada, Ausztrália, Új-Zéland – 2010. április)

USA

2010. június

## HIV fertőzött férfiakban

Hollandia: ondófolyadékban vizsgálták csak: negatív

Kamerun, Uganda (kiszűrt véradók): vérplasma, PBMC: negatív

Nagy-Britannia (HIV+, HCV+): vérplasma, PBMC: negatív

## Egészségesek és betegek légutaiban

Németország (orrváladék, köpet): pozitív

## Gyermekekori és reumás betegségekben

Franciaország: -

## Feltételezés: XMRV és PERV (porcin endogén retrovírus) rekombináció

élő sertésszövetek xenotranszplantációja esetén

3 recipiensben (n=200) PERV Gag p27 antitestek WB + (?)

Env -

XMRV/PERV szekvencia azonosság: 53%

PERV-A human tropic

PERV-C ecotropic

# XMRV antigének elleni antitestek véradókban

Donor ID	p15E CMIA	p30 CMIA	gp70 CMIA	WB		Designation for specificity calculation	
USA				$\alpha$ -MLV			
	S/CO	S/CO	S/CO	Viral Lysate	gp70*		
	p81	2.5	0.14	0.12	-	nt**	false positive
	s44	0.2	0.16	2.6	-	gp70 band	excluded
	s52	0.1	0.17	2.2	-	-	false positive
	p52	0.1	0.15	3.6	-	-	false positive
	p62	0.3	1.0	0.11	-	nt	false positive
	s176	0.3	1.1	0.13	p30 band	nt	excluded
	p43	0.2	1.2	0.12	p30 band	nt	excluded
	s161	0.3	1.7	0.13	-	nt	false positive
	s12	0.2	1.7	0.12	-	nt	false positive
	s88	0.2	1.8	0.13	-	nt	false positive
	s210	0.2	3.7	0.12	-	nt	false positive
p228	0.3	3.7	0.12	-	nt	false positive	

\* Mammalian expressed recombinant gp70

\*\* not tested

CMIA: chemoluminescent immunoassay

S/CO: S. CORE számítógépes képelemző program

# XMRV vizsgálata HIV fertőzött férfiakban

	Homosexual men	Heterosexual men	All men
<b>No. of patients</b>	29	25	54
<b>Mean age (range)</b>	42.4 (32–66)	37.8 (29–46)	40.1
<b>Origin*</b>	Dutch: 21 Non-Dutch: 2 Unknown: 6	Dutch: 18 Non-Dutch: 7	Dutch: 39 (72%) Non-Dutch: 9 (17%) Unknown: 6 (11%)
<b>No. of seminal samples tested</b>	30	63	93
<b>Blood plasma HIV-1 &gt;50 copies/ml</b>	28/30	5/63	33/93 (35%)
<b>Seminal plasma HIV-1 &gt;50 copies/ml</b>	20/30	3/63	23/93 (25%)
<b>XMRV+</b>	0/30	0/63	0/93 (0%)

\*All men are currently living in The Netherlands.  
doi:10.1371/journal.pone.0012040.t001

+AZT

## XMRV kimutatása a légutakban

Group	Patient median age, y	Underlying disease	Sample	XMRV+
1 (75 patients with RTI)	42	None	Sputum, nasal swab	3/75 (2.3%)
2 (31 patients with RTI)	60	COPD	BAL	1/31 (3.2%)
3 (161 patients with RTI)	32	Immunosuppression after SOT or BMT	BAL, TS	16/161 (9.9%)
Control (62 persons with no RTI)	35	None	BAL, throat swab	2/62 (3.2%)

\*XMRV, xenotropic murine leukemia virus; +, positive for XMRV-specific sequences by PCR; RTI, respiratory tract infection; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; BAL, bronchoalveolar lavage; SOT, solid organ transplantation; BMT, bone marrow transplantation; TS, tracheal secretion.

# XMRV vizsgálata gyermekkori betegségekben

Pediatric Pathology	Age range*	Number of patients		Sample origin
Idiopathic thrombocytopenic purpura	11 m -16 y	9	7	Whole blood
			1	Bone marrow
			1	Whole blood - Bone marrow
Autoimmune hemolytic anemia	4 y - 16 y	3	2	Whole blood
			1	Whole blood - Bone marrow
Aregenerative anemia	1.5 y -8 y	3	1	Whole blood
			1	Bone marrow
			1	serum
Idiopathic aplasia	12 y	1		Whole blood
Neutropenia	1 m - 3 y	4	3	Whole blood
			1	Bone marrow
Juvenile idiopathic arthritis	2 y -16 y	34	5	Whole blood
			21	Synovial fluid cells
			8	Whole blood - Synovial fluid cells
Henoch-Schönlein syndrome	6 y- 6 y	2		Whole blood
Encephalitis	3 y - 9 y	3		Whole blood
Dermatomyositis	9 y	1		Whole blood
Leucosis	1.5 y -15 y	2		Whole blood

\* m = month, y = year

**XMRV env fészkes PCR: negatív**

Jeziorski E. et al. Retrovirology 2010, 7,

# XMRV tulajdonságai

Endogén XMRV nincs a normál emberi DNS-ben, nincs rokonság HERV családokkal  
C típusú retrovírus, átmérője:  $137 \pm 9$  nm (Moloney murin leukémia vírusához hasonló)

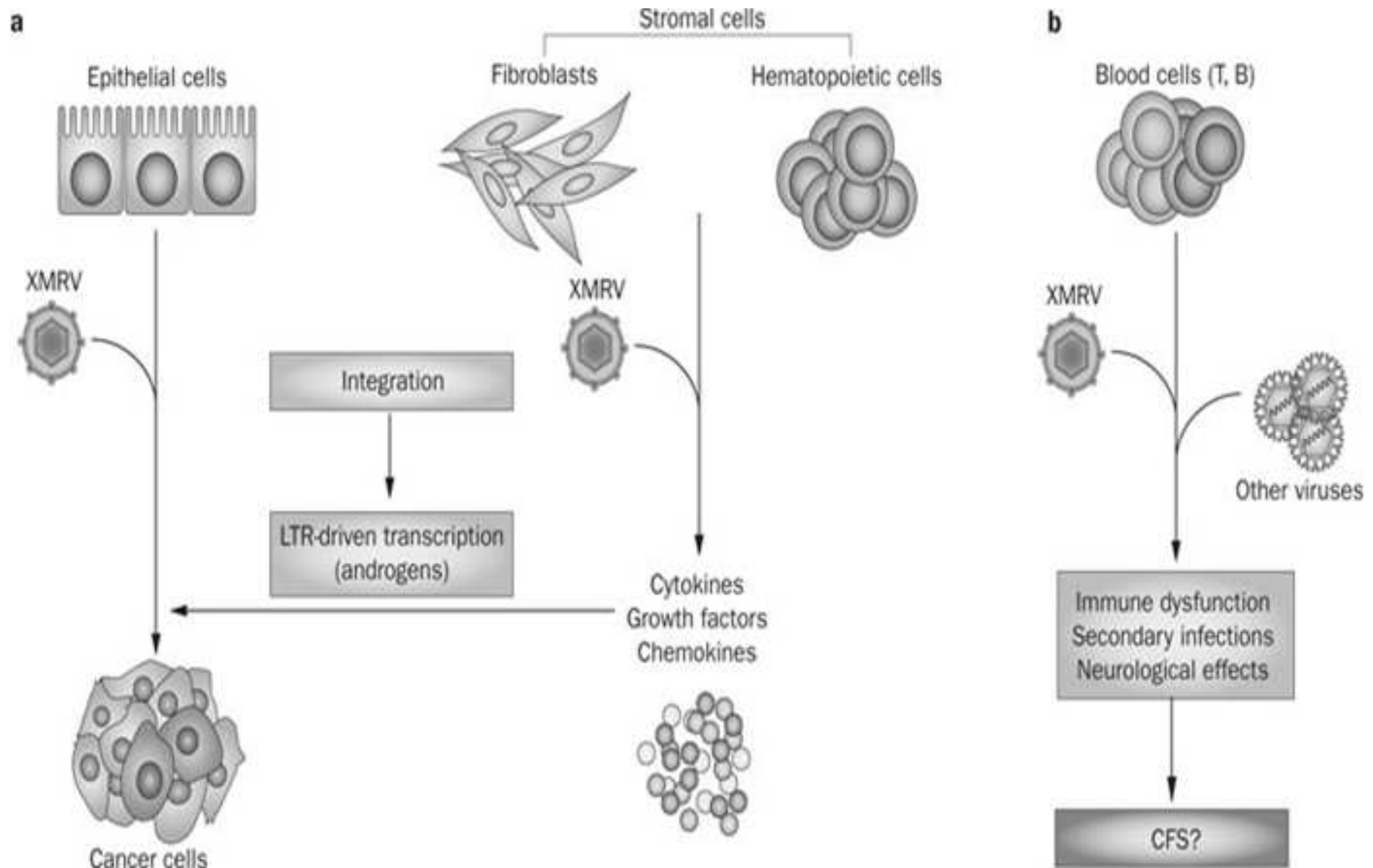
## AZ EMBERI FERTŐZÉS: KÜLSŐ FORRÁSBÓL

- reservoir: eredetileg egerekből, újabban emberről-emberre terjedés lehet ?  
cseppfertőzés ?, vér útján ?, nemi úton ?
- rákos betegek ondójában XMRV RNS megtalálható
- receptor: xenotróp és polytróp retrovírus receptor (XPR) 1 legtöbb gerinces sejt felszínén
- nem akut fertőzés váltja ki a rákot, hanem évtizedekig történő lappangás és transzaktiválást követően indukál rákot az XMRV
- osztódó sejtekben az XMRV jobban szaporodik
- in vitro: DU145, LNCaP prosztata rák sejtek, HeLa méhnyakrák, Hey1b ovarium ráksejtek, aktivált T és B lymphocyták, Raji, SupT1

## XMRV SZAPORODÁSA

- 7, 16, 17. kromoszómába történt integrációt követően  
integráció CpG szigetekbe, a szabályozó gének közelében történik,  
de nem proto-onkogének elé
- NF-ATc3 gén – transzkripciós faktor (T-sejt génkifejeződés szabályozása)
- CREB5 – transzkripciós faktor („cAMP response element binding protein 5”)
- APPBP2 – androgén receptor transzaktiválás gátló faktor (androgén kiváltotta jelátvitel zavarása)

# XMRV hatásmechanizmusa





# Egyéb hatások befolyása az XMRV szaporodására

## ■ Belső

- Hormonok (androgének, glycocorticoidok)

- Cytokinek, chemokinek, növekedési faktorok  
EGFR

- Sejtfaktorok

APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme,

Zn dependent cytidine deaminase

(C → U, G → A hypermutációk)

Fv1, tetherin

## ■ Külső

- Interferon induktorok

- Antivirális gyógyszerek

# Általános virológiai következtetések

1. Bármilyen idegen DNS-kontaminációt ki kell zárni

- a legtöbb sejtkultúrára/vírus laboratórium veszélyben, mert egér eredetű DNS kontamináció gyakori

-- általánosan használt laboratóriumi reagensekben

-- PCR pufferekben

-- RT-PCR enzim készítményekben

2. Bármilyen újnak vélt vírus (főleg emberi vírus)

teljes genom szekvenciáját meg kell állapítani

- nem elegendő PCR termékek szekvenálás

- bizonyítani kell, hogy a vírus szaporodóképes

3. Kísérleti mintákat és a kontrollokat ugyanabban az időben és módon kell vizsgálni

4. Sejtkultúrákat rendszeresen és széles körben ellenőrizni kell vírus kontamináció irányában

- feltehetően a vírus kontamináció sokkal gyakoribb a feltételezésnél

- új módszereket kell kidolgozni a rendszeres rutin ellenőrzésre

# XMRV mint jövőbeli emberi kórokozó?

Egér – PreXMRV-1 + PreXMRV-2

PreXMRV-1/2

XMRV

Sejtvonalak, emberi daganat és PBMC minták  
kontaminációja

... és ha mégis átkerül az XMRV  
az emberre?