

Vírusok molekuláris diagnosztikája

Füle Tibor, Kovalszky Ilona

Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet

A kísérletes daganatkutatás már sok évtizede mutat be példákat arra, hogy bizonyos daganatokat vírusok idéznek elő. A vírus-karcinogenezis mechanizmusa nagyon változatos. Ahhoz, hogy egy vírus-nukleinsav jelenlétének súlyát megítélhessük, jó tudni, milyen módon segíti elő az adott vírus a daganat kialakulását. Történjek ez indirekt módon, direkt mechanizmussal, vagy a genomba inzertálódva, az emberi daganatok esetén általában más környezeti tényezők, karcinogének, a szervezet immunháztartásának károsodása is szükséges ahhoz, hogy az onkogén vírusok fertőzését követően daganat jöjjön létre. A DNS-diagnosztikát megelőző időszakban a kórokozók közül a vírusok azonosítása volt a legnehezebb feladat. A rekombináns géntechnológia, a hibridizációs módszerek, a polimeráz láncreakció elterjedése azonban kiküszöbölte a vírusok azonosításának fáradságos eljárását. A vírusok kimutatására használható, nem amplifikációs módszerek (Southern, Northern, és in situ hibridizáció), valamint a targetamplifikációs (polimeráz láncreakció), és a jelamplifikációs (hybrid capture, tiramin-amplifikáció) módszerek sokat javítottak a víruskimutatás érzékenységén. A molekuláris daganatvírus-kimutatás jellegzetességeit figyelembe véve leszünk képesek a módszerek eme új fegyvertárát bizonyító erjű eljárásokként hatékonyan felhasználni. A molekuláris vírusdiagnosztika figyelemreméltó eredménye az, hogy olyan tumorokban is igazolta vírus-DNS jelenlétét, ahol azok kóroki szerepe eredetileg nem merült fel. Ezek kimutatása és lehetőség szerint a fertőzés felszámolása segítheti az okozott tumorok gyakoriságának csökkentését. *Magyar Onkológia, 46:17–22, 2002*

For many years data of cancer research indicated that viruses can cause cancer. Virus infections induce cancer by different mechanisms. To predict the significance of a viral DNA fragment in human cells we have to be aware of the changes the particular virus is able to induce there. However, no matter which mechanisms of viral carcinogenesis are utilized, generally other factors (environmental, chemical, immunodeficiency, etc.) are also needed to induce invasive cancer in human. Before the introduction of nucleic acid based detection technique virus identification was a long and cumbersome process. This has been eliminated by the invention of recombinant gene technology and polymerase chain reaction. Virus nucleic acid can be detected without amplification using Southern, Northern and in situ hybridization. Techniques for target (polymerase chain reaction) or signal (hybrid capture, tyramine) amplification improved the sensitivity of detection. In the meantime, for the successful use of the arsenal of new methods we have to consider the characteristic feature of molecular virus research. A major achievement of molecular virus detection is that it proved the pathological significance of viruses in human cancers even in those where this was not expected. Hopefully these informations will increase the effort for elimination of oncogen virus infections. *Füle T, Kovalszky I. The molecular diagnostics of viruses. Hungarian Oncology 46:17–22, 2002*



Bevezetés

A kísérletes daganatkutatás már sok évtizede mutat be példákat arra, hogy bizonyos daganatokat vírusok idéznek elő. Az emberi daganatok között azonban nagyon kevés meggyőző példa volt fellelhető. Történt ez azért, mert Robert Koch a fertőző ágens patogén voltát bizonyítandó feltételei nem teljesültek az emberi daganatvírusok ese-

tén. Az elmúlt három évtizedben azonban olyan adatok láttak napvilágot, melyek egyértelműen megerősítették azt a feltételezést, hogy a vírusok emberben is létrehozhatnak daganatokat. Az RNS-vírusok esetén az onkogének felismerése szorosan kapcsolódott a retrovírus-kutatásokhoz. Ezek a vírusok ugyanis részben eukarióta sejtekből kiragadott nukleinsav-szakaszok nagy dózísát a sejtekbe visszajuttatva idéznek elő tumorokat. Emberben a C típusú HTLV1-2 onkovírusok T-sejtes leukaemiát okoznak, a Lentivírusok közé tartozó HIV-vírus-fertőzés esetén pedig Kaposi-sarcoma és B-sejtes lymphoma alakulhat ki. Nem tisztázott még, milyen módon vezet májrák kialakulásához a hepatitis C, mely szintén RNS-vírus. Az emberi daganatok kialakulásában több DNS-vírus szerepe is igazolódott. A kis DNS-vírusok

Érkezett: 2002. február 7.
Elfogadva: 2002. március 1.

Levelezési cím: Dr. Kovalszky Ilona,
Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és Kísérleti
Rákkutató Intézet,
1085 Budapest, Üllői út 26. Telefon: (1) 266-1638/4449
Fax: (1) 317-1074, E-mail: koval@korb1.sote.hu

közül a hepatitis B és a humán papilloma-vírusok bizonyos típusai, a nagy DNS-vírusok közül a herpes-vírusok családjába tartozó Epstein-Barr-vírus (Burkitt-lymphoma, B-sejtes lymphomák), a herpes simplex vírus 1, 2 és a Kaposi-sarcomákban a HHV8 kóroki jelentősége tisztázódott. Felvetődik a herpesvírusok közé tartozó cytomegalivírus onkogenitása is (5, 6, 17, 18).

A HPV szerepe a méhnyakrákok kialakulásában egyértelmű, a vírus onkogén szakasza a daganatok 100%-ában jelen van (25). Egyre több olyan közlemény jelenik meg, ahol bronchus-, szájüregi laphámrák, vagy vastagbélrák esetén igazolják papillomavírus jelenlétét (3).

Hogyan okozhat rákot a vírusfertőzés?

A vírus-karcinogenezis mechanizmusa nagyon változatos. Ahhoz, hogy egy vírus-nukleinsav jelenlétének súlyát megítélhessük, jó tudni, milyen módon segíti elő az adott vírus a daganat kialakulását.

Indirekt mechanizmus esetén a vírus nem található meg abban a sejtben, melyből a daganat kialakul (21). Ilyen esetben a vírusfertőzés az immunrendszert károsítja, ami ennek következtében nem tudja eredményesen elpusztítani a szervezetben más módon kialakult daganatsejteket. Ezt példázza a daganatok gyakoriságának megnövekedése HIV-fertőzött betegekben.

Más esetekben a vírus proliferációra serkenti a gazdasejteket, ami növeli az osztódások során bekövetkező tévedéseket, ezáltal a génállomány tartós sérülésének és a daganat kialakulásának valószínűségét. Előfordul, hogy a sejtek fokozott regenerációját a vírusok okozta citolízis idézi elő. Ez a hatásmód felvetődik hepatitis B és C esetén is.

A *direkt onkogénhatás* során a daganatot létrehozó sejtek vírusfertőzése szerves része a daganatos folyamat létrejöttének. Ilyenkor is előfordulhat, hogy a vírus átmenetileg fertőzi csak a sejtet, és a daganat kialakulásának időpontjában

már nem mutatható ki, ami nehezíti direkt hatás bizonyítását. Az esetek döntő hányadában azonban a vírusgenom jelentős része megtalálható a kialakult daganatban is.

Kísérletes körülmények között leghatékonyabban a madár és egér retrovírusok (RNS-vírusok) képesek a daganatok előidézésére. Ezek a vírusok olyan, a vírus szaporodásához nem szükséges transzformáló géneket tartalmaznak, melyeket korábbi fertőzések során a gazdasejt DNS-éből (konkrétan ezek az azóta megismert protoonkogének) szakítottak ki. Ezeket a vírusszakaszokat nevezzük virális onkogéneknek. Virális onkogént hordozó vírussal történt fertőzés esetén a sejtek nagy dózisu onkogén DNS-terhelést kapnak. Ilyen fertőzés napok, hetek alatt elvezethet a daganat létrejöttéhez.

A DNS-vírusok, így a HPV, EBV esetén az a jellemző, hogy a vírus rendelkezik egy, a saját működéséhez szükséges onkogén fehérjével, ami kapcsolatba lépve a sejt osztódását szabályozó kulcsfontosságú géntermékekkel, általában szuppresszor fehérjékkel, hatástalanítja azokat. Más esetekben a vírus-fehérje a programozott sejthalált gátolja.

Az *inzerációs mutagenézis* során nem található speciális, daganatot előidéző vírus-géntermék. Ezekben az esetekben a vírus feltehetően a gazdasejt DNS-ének olyan szakaszaiba épül be, melyek fontos, ismert vagy ismeretlen, szabályozó szereppel bírnak.

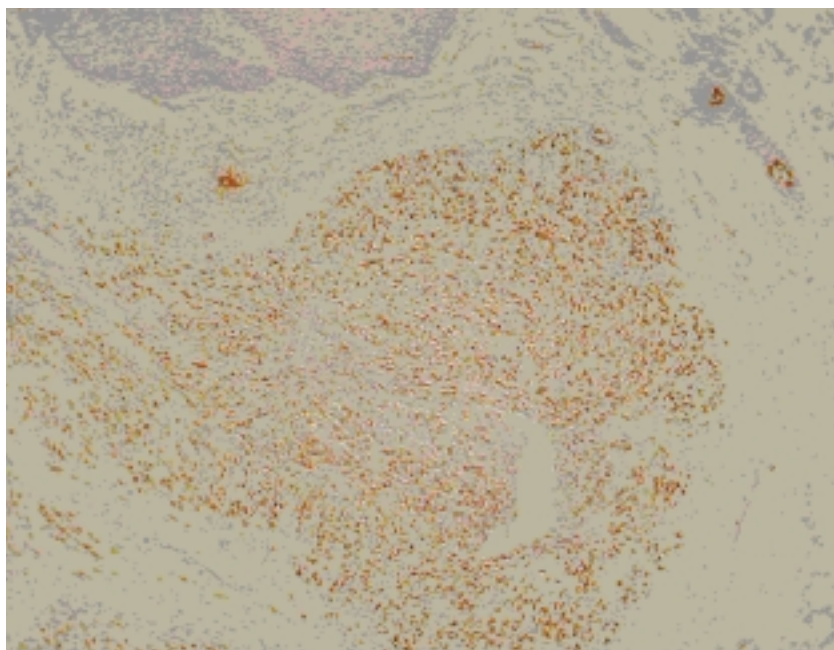
Valószínűleg ezen az úton idéznek elő daganatot azok a retrovírusok, melyek nem hordoznak onkogén szekvenciákat, de a humán papillomavírusok esetén is felvetődik, hogy így jön létre a daganat (19).

Az emberi daganatok esetén általában más környezeti tényezők, karcinogének, a szervezet immunháztartásának károsodása is szükséges ahhoz, hogy az onkogén vírusok fertőzését követően daganat jöjjön létre.

A víruskimutatás módjai

A DNS-diagnosztikát megelőző időszakban a kórokozók közül a vírusok azonosítása volt a legnehezebb feladat. Tenyésztéssel, szerológiai módszerekkel, elektronmikroszkóppal ugyan mód volt kimutatásukra, a módszerek eszköz- és időigényessége azonban gátat szabott az eljárások széleskörű alkalmazásának (1). Előrelépést jelentett az immunhisztokémia és alkalmazása sok esetben kielégítő eredményt nyújt (1. ábra). Számos, a kereskedelembe hozzáférhető ellenanyag érzékenysége azonban messze elmarad a nukleinsav-kimutatási módszerektől. A rekombináns géntechnológia, a hibridizációs módszerek, a polimeráz láncreakció elterjedése kiküszöbölte a vírusok azonosításának fáradságos eljárásait. Ezekkel a diagnosztikai módszerekkel a kórokozók kimutatása egyszerű feladattá vált. Szövetek sokaságában nyílt mód a vírusrészecskék közvetlen kimutatására (7). A lymphomák és leukemiák mellett szolid daganatokban is találtak, főleg DNS-vírus-szakaszokat. Mivel a vírusok génál-

1. ábra.
Humán herpesvírus 8 kimutatása immunhisztokémiával Kaposi-sarcomában. Az ellenanyag a late nuclear antigenet ismeri fel.
A kép dr. Nagy Károly gyűjteményéből származik.



lománya elvileg ép körülmények között nincs jelen az emberi szervezetben, megfelelő gondossággal kiválasztott vírusnukleinsav-szekvencia jelenléte az egyén fertőzöttségére utal. Nem felelkezhetünk meg azonban a korábban már említett tényről, hogy az evolúció során bizonyos vírusok beépülhetnek a sejt genetikai állományába, más esetben (retrovírusok – virális onkogének) DNS-szakaszokat szakíthatnak az eukarióta genomból. Sok esetben az RNS- és DNS-vírusok defektív formában integrálódnak a gazdaszervezet DNS-ébe, anélkül, hogy patogének lennének. A vírusnukleinsav kimutatása tehát nem feltétlenül azonos a patogenitással vagy az infektiiv vírusfertőzéssel. Ennek megítélésében kellő óvatossággal kell eljárunk.

A nukleinsav-diagnosztika

A vírusok szerkezetének tisztázásával és genomjuk klónozásával specifikus DNS-szondákat hoztak létre. Ezeket radioaktív jelölést követően ismeretlen nukleinsavmintákhoz hibridizálva a pozitív reakció felfedte a vírus jelenlétét a vizsgált anyagban. A DNS- és RNS-vírusok hibridizációval (Southern és Northern) történő kimutatása semiben nem különbözik az általános módszerektől, ezek azonban még munka- és költségigényes eljárások. A filterhibridizációs módszerekkel párhuzamosan fejlesztették ki az in situ hibridizációs eljárást, ami a kórokozót a szöveti környezetben mutatta ki. Kezdetben ehhez is izotóppal jelölték a DNS- vagy RNS-szondákat. A radioaktív izotópok gyors felezési ideje, a háttér magas volta miatt gyorsan teret nyertek a nem radioaktív jelzéssel működő in situ eljárások. Ezek napjainkban is népszerűek és számos már jelzett vírusnukleinsav-próba kapható a kereskedelemben. A legismertebb eljárások alapjait, hasznosíthatóságukat, korlátaikat, buktatóikat szeretnénk bemutatni saját tapasztalataink figyelembevételével.

A vírusok kimutatására használható, nem amplifikációs módszerek

Ezek közé tartozik a már említett Southern, Northern, és in situ hibridizáció.

Az eljárás során friss vagy fagyasztott szövetből, vagy vérből megfelelő módszerekkel DNS-t vagy RNS-t kell izolálni. Természetesen ilyenkor az adott szövetben található összes nukleinsavat kinyerjük, nemcsak a vírusokét. A DNS-vírusok esetén a DNS-izolálást követően a nukleinsavat restriktációs endonukleázzal kisebb darabokra kell hasítani, mert különben mérete miatt nem fér be az elválasztó gél pórusaiba. RNS esetén erre nincs szükség. Az előkészített nukleinsavmintákat agaróz gélen futtatva méret szerint szétválasztjuk, majd nylon- vagy nitrocellulóz-alapú filterre juttatjuk át (blottoljuk). A filterhez kötött nukleinsavat radioaktív vagy színreakciót adó szondával hibridizáljuk. In situ hibridizáció esetén a vírust szöveti környezetében mutatjuk ki, általában fluoreszkáló festékekkel jelzett próba segítségével. A hibridizálás hátránya az, hogy nem

túlságosan érzékeny. Alacsony kópiaszám esetén a vírus a kimutathatóság határa alatt maradhat.

Vírusnukleinsav-kimutatás amplifikációs módszerekkel

Az amplifikációs módszerek két nagy csoportja különíthető el, a *targetamplifikáció* és a *jelamplifikáció* (22).

Mindkét amplifikációs megközelítés használható. A választandó eljárás tekintetében a fő szempont a módszerek érzékenysége és specifitása.

A kiindulási minta lehet friss szövet, de DNS-vírusok esetén az amplifikációs eljárások lehetővé teszik a paraffinos anyag felhasználását is a nukleinsavkivonás céljára. Ez óriási előnyt jelent, hiszen így retrospektív vizsgálatokat is végezhetünk. A morfológiai diagnózis céljára készített metszetekkel azonos, vastagabb metszetet, vagy újabban a metszet egy meghatározott területét használjuk fel DNS-izolálásra. A laser capture módszerrel már célzottan néhány kitüntetett sejt vizsgálata is elvégezhető. Az in situ vizsgálatokhoz is sok esetben megfelel a formalinban fixált, paraffinba ágyazott anyag. Kiváló minőségű nukleinsav izolálását és egyben paraffinos beágyazást tesz lehetővé az RNA later fixálóban történő anyagrogzítás.

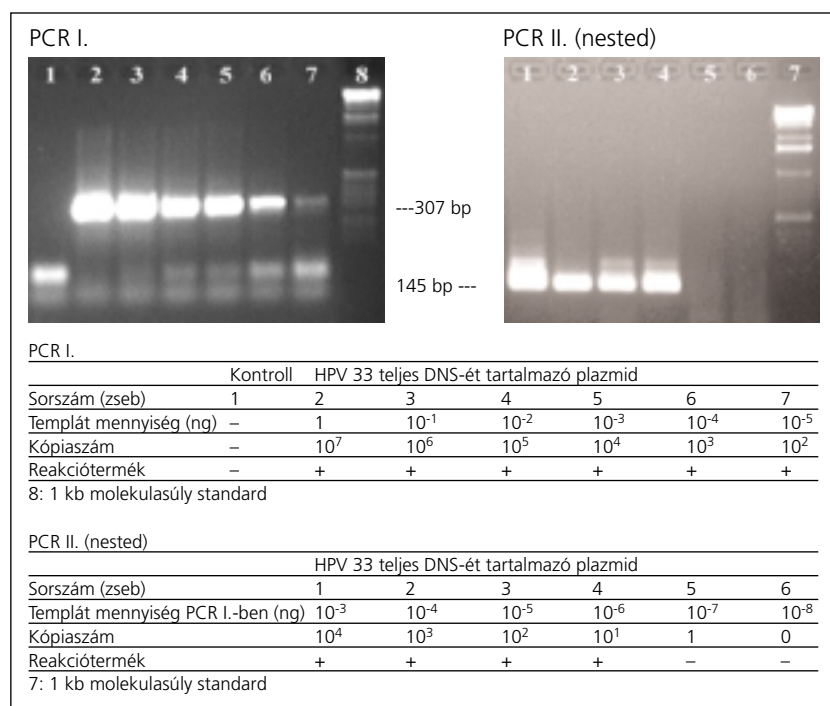
Targetamplifikációs módszerek

A legismertebb és ma is leghatékonyabb módszer a keresett vírusnukleinsav felszaporítására a *polimeráz láncreakció*.

Több olyan diagnosztikus PCR-alapú kit van forgalomban, melyek az eljárás klinikai pontosságát és használhatóságát bizonyították. A PCR-al akár 10^5 -szeres jelsokszorosítás is elérhető. Ez azt jelenti, hogy 5-10 víruskópia már kimutatható (2. ábra).

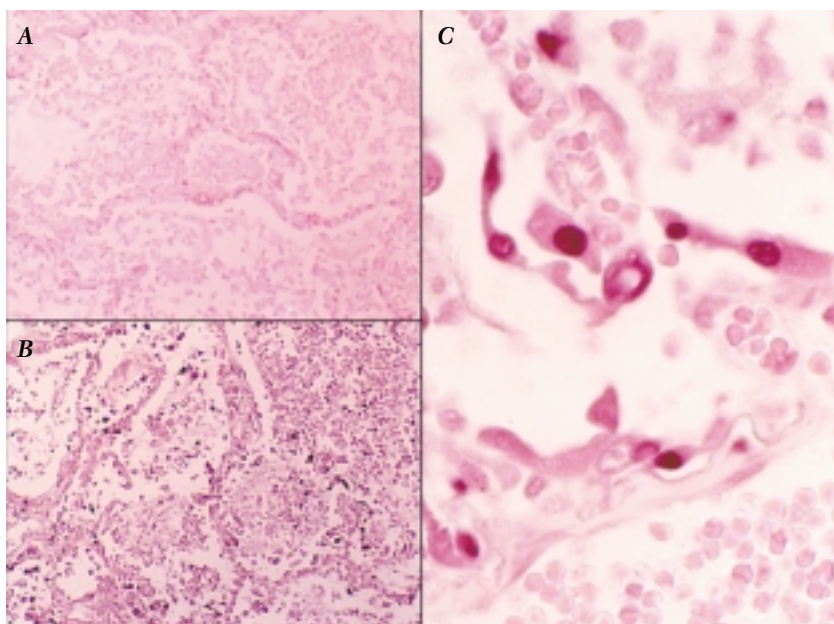
2. ábra.
Humán papillomavírus-kimutatás érzékenysége nested PCR-rel.

A sokszorosítást vektorba klónozott HPV 33 DNS-ről végeztük. A reakcióelegyben található DNS-koncentrációt és a megfelelő víruskópiaszámot a gélképek alatti táblázat mutatja be.

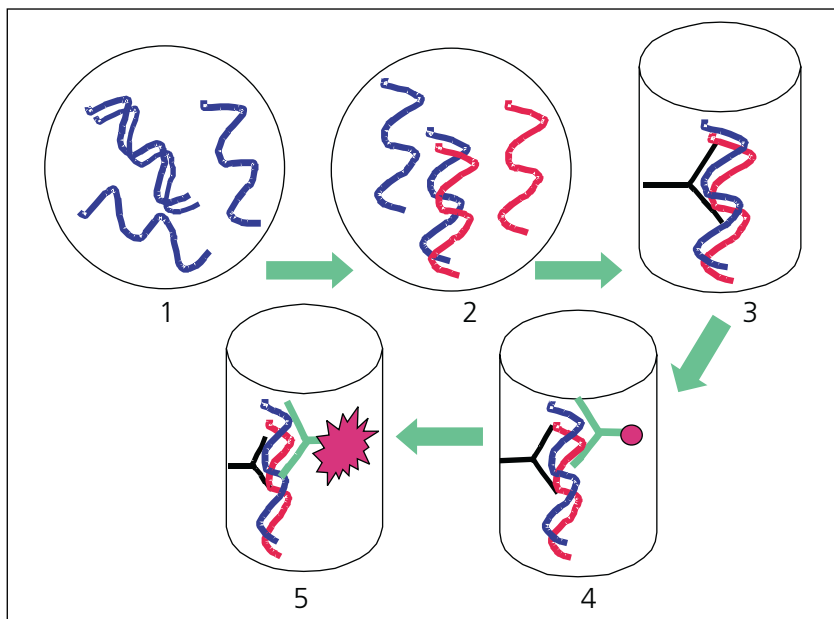


Nagy fejlődést jelentett a kvantitatív „real time” PCR rendszerek bevezetése, ahol a vírusok kópiaszáma egyszerűen és pontosan meghatározható (15). Ezeknél az eljárásoknál a PCR-os amplifikálást valamilyen próba hibridizálásával kombinálják, ami fluoreszcens jelet hoz létre. A jel intenzitása arányos a kiindulási DNS mennyi-

3. ábra. Cytomegalovirus kimutatása direkt in situ PCR-ral AIDS-ben elhunyt beteg tüdejéből. A: negatív kontroll (amplifikálás primer nélkül) B: pozitív reakció a mononukleáris sejtek és a pneumociták magjában, anti-digoxigenin alkalikus foszfatázzal előhívva 100x, C: ugyanaz 400x



4. ábra. A hybrid capture módszer lényege. 1. a betegtől nyert sejteket megfelelő oldatban feloldják, és a DNS-t denaturálják (ez a kettős szál szétválasztását jelenti). 2. a denaturált DNS-hez egyszálú RNS-próbát adnak, mely a komplementaritás elve alapján a megfelelő DNS-szakaszhoz hibridizál. 3. a megfelelő ellenanyag az RNS-DNS hibrid molekulát a vizsgálati edény falához rögzíti. 4. a falhoz nem rögzített komponenseket mosással eltávolítjuk és ezt követően a HPV magas, vagy alacsony kockázatú csoportját specifikus jelzett ellenanyaggal különítjük el. 5. a jelzést megfelelő színreakcióval hívjuk elő.



ségével. A módszer előnye az, hogy fluoreszcens jel csak akkor keletkezik, ha a primerek specifikus DNS-szakaszt szaporítanak fel. A jelenleg használatban lévő megoldások közül a FRET, TaqMan, molecular beacon és Scorpions módszerek terjedtek el leginkább.

Egyes cégek más-más megoldást részesítenek előnyben készülékeikhez. Ezek bemutatása azonban meghaladja a jelen cikk kereteit. A real time rendszerek érzékenysége nagyobb, az eredmények specifikusabbak, és alkalmasabbak multiplex vizsgálatokra, mint a hagyományos PCR.

Ismertek egyéb targetamplifikációs módszerek, ezek közül azonban diagnosztikus eljárás-ként egyelőre kevés honosodott meg, részben azért, mert nem kaptak jogositványt az amerikai Food and Drug Administration-tól. (Nevezett intézmény jogosult dönteni többek között arról, milyen eljárások alkalmazhatók az Amerikai Egyesült Államokban az egészségügy területén.) Felsorolás szintjén ilyen eljárások a ligáz láncreakció (LCR) (2), a nukleinsav-szekvencia-alapú amplifikáció (NASBA) (4), a lánceltávolítás amplifikációval (SDA) (14), és talán a jövőben teret hódít a forgó kör amplifikáció (RCA) (24). A NASBA elsősorban RNS-vírusok kimutatására alkalmas, itt 3 enzim, az RNS-polimeráz, RNáz H és reverz traskriptáz segítségével sokszorozzák meg a nukleinsavat. Ezt az eljárást használják többek között HIV kimutatására (Organon Technika) de az elmúlt év során a Qiagen is megjelentetett a piacon NASBA-alapú RNS-amplifikációs kiteket.

Nagy várakozás fűződött az in situ PCR-hoz, ami a vírusfertőzés lokalizációját, kiterjedését is képes megmutatni. A módszer leírása Nuovo névéhez fűződik (20). Sajnos az eljárás nehézkes, nem egyszerű kiküszöbölni a keletkezett termék diffúzióját, és a specificitás érdekében itt sem kerülhető el az in situ hibridizáció (3. ábra). Ezért úgy tűnik, hogy az in situ eljárások esetén előnyösebbek azok a módszerek, melyek a képződött jelet szaporítják fel.

Jelamplifikációs eljárások

A módszernek in vitro és in situ megközelítése egyaránt ismert.

Az egyik elterjedt és hazánkban is alkalmazott in vitro eljárás a *hybrid capture* módszer. HBV és HPV kimutatására kitíben kapható, melyeket a Digene cég állít elő (23) és jelenleg a Roche forgalmazza. A módszer lényegét a 4. ábra mutatja.

A minta DNS-éhez RNS-próbát hibridizálnak. A DNS-RNS hibridet egy speciális ellenanyag mikroplate falához köti ki. Az immobilizált hibrid molekulákat egy másik, jelölt ellenanyag segítségével lumineszcenciás mérésrel mutatják ki.

Jelamplifikációval felerősíthető az in situ hibridizáció és immunhisztokémia is. A legismertebb eljárás a tiramin amplifikáció. A tiraminra jellemző, hogy oxidáló környezetben lerakódik. Ezért beköt minden olyan helyre, ahol peroxidáz reakció miatt nascens oxigén keletkezik (5. ábra).

A tiraminhoz kötött biotin sztreptavidin-peroxidáz reakcióval tovább amplifikálható, de az is lehetséges, hogy a tiraminhoz fluoreszcens festéket kötnék a jel kimutatására. A rendszer nagyon változatos módon alkalmazható a jel megsokszorozására. Kereskedelembe a NEN cég terméke kapható, melyet hazánkban az Izinta forgalmaz.

A molekuláris daganatvírus-kimutatás jellegzetességei

Akár ellenanyaggal, de különösen abban az esetben, ha vírus-DNS-próbákkal dolgozunk, vagy PCR amplifikációt végzünk, lényeges tudni, hogy nem a vírus egészét, csak a vírus-DNS egy darabját vagy fehérje építőját mutatjuk ki.

Ez pedig nem szükségszerűen jelenti az infekzív vírus jelenlétét és szaporodását a szervezetben. Az onkogenitáshoz azonban az a lényeges, hogy a vírusfertőzés ne pusztítsa el a sejtet, és az a nukleinsav-szekvencia, mely az onkoprotein termelését kódolja, legyen jelen. Ilyen esetekben sokszor vírustermelés nem mutatható ki. A Southern és in situ hibridizáció mellett ma már bizonyos, speciális DNS-amplifikációs megközelítések lehetővé teszik annak bizonyítását, hogy a vírus beépült a genomális DNS-be (11,16). Ilyenkor a tumóvírusok szerológiai kimutatása akár eredménytelen is lehet, mert a keringésben nincsenek olyan vírusfehérjék, melyek ellenanyag-termelést idéznek elő (6. ábra).

Mi a jelentősége az onkogén vírusok kimutatásának?

Az elmúlt néhány hónap során tanúi és szenvedő alanyai lehettünk azoknak a megszorításoknak, melyeket a társadalombiztosítás a molekuláris diagnosztikával szemben foganatosított. A lépés háttérben az állt, hogy a humán papillomavírus meghatározását olyan nagy számban végezték el a társadalombiztosítás terhére, hogy az már nem volt képes fedezni a költségeket.

Szükséges-e a női populáció rutinszerű HPV-szűrése, vagy általában a lakosság szűrése potenciálisan onkogén vírusok jelenlétére?

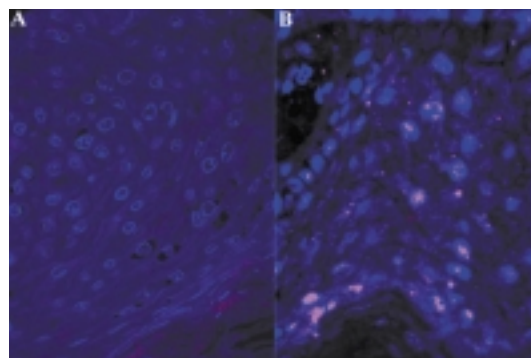
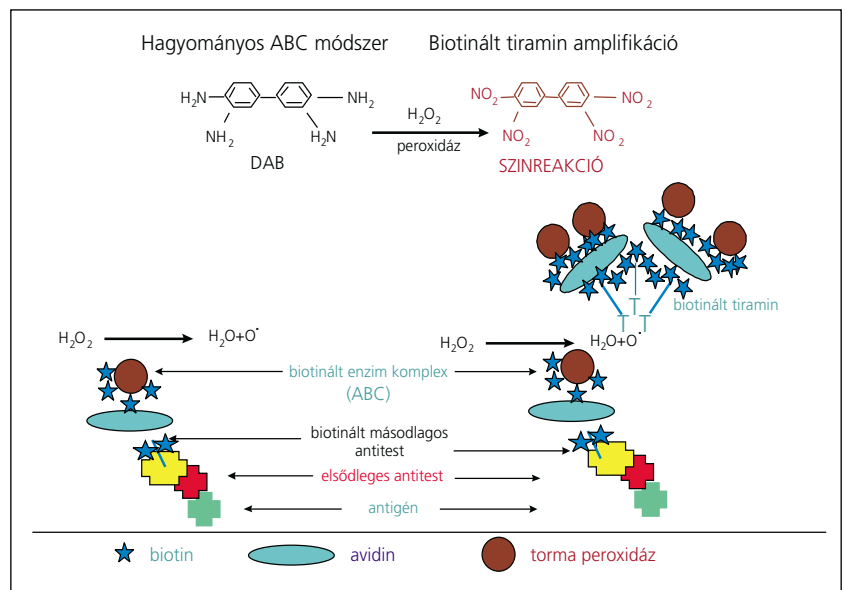
Természetesen nem. Tudnunk kell, hogy az emberi onkogén vírusokkal történő fertőzés az esetek döntő hányadában nem vezet daganat kialakulásához.

A HPV-fertőzés a fiatal nők között igen gyakori és tünetmentesen lezajlik. A CMV és EBV is ubiquitáer vírusok. Vannak azonban olyan állapotok, melyek esetén a daganatok kialakulásának veszélye fokozódik. Ilyenkor egyéb vizsgálatok kiegészítéseként jogos igény az onkogén vírusok jelenlétének felderítése.

Ilyen állapot egyértelműen az immunszuppresszió. HIV-fertőzés, a szervátültetést követő immunszuppresszió fokozza a vírus által előidézett daganatok kialakulásának kockázatát. Ismétlően P3 citológiájú és CIN I-III esetek vizsgálatát az indokolja, hogy a magas kockázatú HPV-altípusokkal történő fertőzés biztosan elősegíti az

in situ rákok invazívá alakulását. Az általunk vizsgált in situ rákoknak csak 50%-ában tudtuk kimutatni a magas kockázatú HPV-típusok onkogenitáért felelős E6 génszakaszt, ami az invazív rákok 100%-ában jelen van. Ez arra utal, hogy a fertőzés jelentős szereppel bír a méhnyakrákok progressziójában. A HPV esetén különös hangsúlyt kell fektetni a vírusintegráció tényére. Amíg vírustermelés zajlik és a hámsejtek elpusztulnak, a daganat kialakulásának veszélye csekély. A problémát a vírusintegráció jelenti. Ennek során már csak bizonyos vírusfehérjék termelődnek, elsősorban az E6 és E7 fehérje, melyek az onkogenitáért felelősek. A gondot növeli, hogy az integráció során nagyon gyakran károsodik az onkogén mRNS-ek átírásának szabályozása, ezért az onkoproteinek nagy mennyiségben termelődnek, semlegesítik a p53, pRb és más szuppresszor géntermékeket. Kedvezőbb a helyzet, ha az integrált DNS-szakaszok mellett még zajlik vírustermelés az epizomálisan jelenlévő

5. ábra. Biotinált tiramin jelamplifikálás. A mintában található jelet specifikus ellenanyaggal reagáltatjuk. Ehhez kötjük a biotinnal jelzett másodlagos ellenanyagot. A következő lépésben avidin-biotin-peroxidáz komplexet adunk a mintához, ekkor az avidin a biotinhoz kötődik. A peroxidáz a következő lépésben alkalmazott hidrogénperoxidot redukálja, a szabad gyökként viselkedő nascens oxigén felszabadulási helyére bekötődik a biotinált tiramin, ami az ABC komplexel újra amplifikálható. A reakciót végül diaminbenzidinnel tesszük láthatóvá. A tiraminhoz más molekulát kötve (fluoreszcein, digoxigenin) a reakció fluoreszcens kimutatásra is használható.



6. ábra. Malignusan el-fajult condyloma AIDS-es betegben. PCR-ral HPV 16-fertőzés volt igazolható. Indirekt in situ hibridizáció HPV 16 próbával, tiramin amplifikálással. A mag jelentős részét kitöltő reakció epizomális, a kis pontszerű jelek integrált vírusnak felelnek meg.

vírusgenomról. Ilyenkor ugyanis még termelődik az E2 szabályozó fehérje, mely képes a már integrált onkogén DNS-szakaszokról történő génátírást is féken tartani (16).

A molekuláris vírusdiagnosztika figyelemre méltó eredménye az, hogy olyan tumorokban is igazolta vírus-DNS jelenlétét, ahol azok kóroki szerepe eredetileg nem merült fel. A HPV-fertőzés kimutatható szájüregi laphámrákok egy részében és a fertőzés nagyszámú eset feldolgozása alapján szignifikáns független kockázati tényező a tumor létrejöttében (9). Más vizsgálatok hörgő- és nyelőcsőrákok, sőt vastagbélrákok egy részében is igazolták a HPV jelenlétét (3, 10, 12, 13). A laphámrákoknál a HPV 16, vastagbélrákokban a HPV 18 E6 E7 onkogén fehérjét kódoló szakaszok fordulnak elő. Nem kétséges, hogy a vírusok ezekben az esetekben más tényezőkkel együtt vezetnek a daganat kialakulásához.

A rákkeltő vírusok tehát emberi daganatokat is okozhatnak. Ezek kimutatása és lehetőség szerint a fertőzés felszámolása segítheti az okozott tumorok gyakoriságának csökkentését. Kérdés az, lehet-e szerepe a kórokozó vírus kiiktatásának, vagy az onkogén vírusszakasz semlegesítésének a vírus okozta daganat gyógyításában?

Kísérletes adatok szerint a válasz igen (8). Ha megtaláljuk a megfelelő (feltehetően gén-) terápiás módszert, számos, ma még nehezen gyógyítható daganatokkal szemben kerül új fegyver a gyógyító orvosok kezébe.

Irodalom

1. Abe K, Kurata T, Shikata T. NonA, nonB hepatitis: visualization of virus-like particles from chimpanzee and human sera. *Arch Virol* 104:351-355, 1989
2. Barany F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:189-193, 1991
3. Cheng Y-W, Chiou H-L, Sheu G-T, et al. The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer Res* 61:2799-2803, 2001
4. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350:91-92, 1991
5. de-Thé G, Geser A, Day NE, et al. Epidemiological evidence for casual relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study. *Nature* 274:756, 1978
6. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1:702, 1964
7. Erlich HA. *PCR Technology*. Ed. Stockton Press, New York, London, Tokyo, 1989
8. Ghim SJ, Sundberg J, Delgado G, Jenson AB. The pathogenesis of advanced cervical cancer provides the basis for an empirical therapeutic vaccine. *Exp Mol Path* 71:181-185, 2001
9. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *JNCI* 92:709-720, 2000
10. Kawaguchi H, Ohno S, Araki K, et al. p53 polymorphism in human papillomavirus-associated esophageal cancer. *Cancer Res* 60:2753-2755, 2000
11. Klaes R, Woerner SM, Ridder R, et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogene. *Cancer Res* 59:6132-6136, 2000
12. Lee YM, Leu SY, Chiang H, et al. Human papillomavirus type 18 in colorectal cancer. *J Microbiol Immunol Infect* 34:87-91, 2001
13. Li T, Lu ZM, Chen KN, et al. Human papillomavirus type 16 is an important infectious factor in the high incidence of esophageal cancer in Anyang area of China. *Carcinogenesis* 22:929-34, 2001
14. Little MC, Andrews J, Moore R, et al. Strand displacement amplification and homogenous real-time detection incorporated in second-generation DNA probe system, BDProbeTecET. *Clin Chem* 45:777-784, 1999
15. Loeb K, Jerome K, Goddard J, et al. High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in serum using TaqMan fluorogenic detection system. *Hepatology* 32:626-629, 2000
16. Luft F, Klaes R, Nees M, et al. Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. *Int J Cancer* 92:9-17, 2001
17. Macnab JCM. Herpes simplex virus and human cytomegalovirus: their role in morphological transformation and genital cancer. *J General Virology* 68:2525-2550, 1987
18. Mann DL, De Santis P, Mark G, et al. HTLV-1-associated B-cell CLL: indirect role for retrovirus in leukemogenesis. *Science* 236:1103-1106, 1987
19. Minson A, Neil J, McCrae M. *Viruses and cancer*. ed. University Press Cambridge 1944
20. Nuovo JG, Gallery F, MacConnel P, et al. An improved technique for the in situ detection of DNA after polymerase chain reaction. *Am J Path* 139:1239-1244, 1991
21. Sarngadharan MG, Gallo RC, Clark J, Blattner W. HTLV-1 associated B-cell CLL: indirect role for retrovirus in leukemogenesis. *Science* 236:1103-1106, 1987
22. Schweitzer B, Kingsmore S. Combining nucleic acid amplification and detection. *Curr Opin Biotechnol* 12:21-27, 2001
23. Wick M. Diagnosis of human papillomavirus gynecologic infection. *Clin Lab Med* 20:271-287, 2000
24. Yu M, Chuang W, Dai C, et al. Clinical evaluation of the automated COBAS AMPLICOR HCV MONITOR test version 2.0 for quantifying serum hepatitis C virus RNA and comparison to the Quantiplex HCV version 2.0 test. *J Clin Microbiol* 38:2933-2939, 2000
25. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 92:690-698, 2000