

Immunmodulánsok sejtszintű hatásmechanizmusa

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Réthy Lajos Attila

Pécsi Tudományegyetem, 2000

**Témavezető: Dr. Kellermayer Miklós egyetemi tanár
Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Kémiai Intézet**

ELŐSZÓ

Ez az értekezés egy kutatási folyamat során elért részeredmények összefoglalását kísérel meg.

A még orvostanhallgatóként végzett externálás, és főleg a mikrobiális immunológiával, immungenetikával foglalkozó munka egy része a HUMAN Oltó-anyagtermelő és Kutató Intézetben, illetve a PHYLAXIA Állami Oltóanyagtermelő Intézetben készült.

A klinikai és a genetikai munkát a SEMMELWEIS Orvostudományi Egyetem II. sz. Gyermekklinikáján folytattam. Igen sokat jelentett számomra az, hogy mintegy háromnegyed évet tölthettem el a Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Kutató-intézetében, Szegeden, illetve részben az MTA SzBK Enzimológiai Intézetében Budapesten, molekuláris genetikai módszerek tanulmányozásával.

A kísérletek során számos kollaborációs munka alakult ki, elsősorban a SEMMELWEIS Orvostudományi Egyetem Biofizikai és I. sz. Élettani Intézeteivel, a pécsi Orvostudományi Egyetem Mikrobiológiai Intézetével, az Országos Hematológiai és Immunológiai Intézet molekuláris genetikai munkacsoportjával illetve az érdi Független Állatorvosi Kutató laboratóriummal.

Külföldi tanulmányutaim során a University of South Florida Tampa St. Petersburg-i Gyermekklinikáján illetve a tampai St. Joseph Hospital-ban végeztem kollaborációs kutatómunkát. Nagy megtiszteltetést jelentett számomra az 1998-as nizzai 11-es kromoszóma-térképezési munkaértekezletre történő meghívás. Az ott végzett, megfeszített team-munka eredménye a 11-es kromoszóma eddig publikált legrészletesebb térképe lett, amely így hozzájárult az emberi genom-térkép pár napja bejelentett elkészültéhez. Genetikai ismereteimet az Angliában, Cambridge-ben, a Babraham Intézetben tett tanulmányút is bővítette.

A kísérletek során elért eredmények szintézisénel külön segítségemre szolgált a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Kémiai Intézetével, annak vezetőjével, Kellermayer Miklós professzor úrral folytatott folyamatos konzultatív kapcsolat, mely nemcsak tanácsadásra, hanem a folyamatban lévő kísérletek befejezésére is kihatott.

A munka az áttekinthetőség kedvéért témakörökre lebontva, nagyrészt már megjelent vagy megjelenés alatt álló tudományos közleményeket prezentál, az egyes témakörökön belül az időrendi sorrend figyelembe vételével. Az összekötő szöveg csupán az eligazodást segíti az értekezésbe bevont publikációk között, *melyekre saját irodalomként* hivatkozom az egyes témakörök végén. Saját irodalom alatt az első szerzős ill. a társszerzőként jegyzett közleményeimet értem.

Ezzel a megoldással a Pécsi Egyetem Általános Orvosi Kara PhD vizsgaszabályzata adta lehetőségként éltem. A helyesírás tekintetében az Akadémiai Kiadó Orvosi Helyesírási Szótára (Budapest, 1992) útmutatásait igyekeztem követni.

Az értekezésben tehát eddigi szakmai életutam szakaszai körvonalazódnak, melyek sokszínűségükben is egységesen kaleidoszkóphoz vagy egy tarka mezei virágcsokorhoz hasonlíthatnak.

Köszöntésképpen fogadják szeretettel.

Budapest-Pécs, 2000 június.

A doktori értekezés beosztása:

- Rövidítések jegyzéke
- Bevezetés
- A doktori (PhD) értekezésben szereplő témakörök:
 - Minor anomáliák, mint az organogenezis zavarának indikátorai
 - Kóros géntermékek molekuláris genetikai diagnosztikája immundeficiens állapotokban I. A $\Delta F508$ mutáció diagnosztikája, klinikai képe cisztikus fibrosisban.
 - Kóros géntermékek molekuláris genetikai diagnosztikája immundeficiens állapotokban II. Chimaera géntermékek molekuláris genetikai diagnosztikája hematológiai betegségekben.
 - Baktérium, vírus, liposzóma eredetű immunmodulánsok vizsgálata. Az optimális adjuvancia kérdése. Az aktív immunizálást befolyásoló tényezők.
 - Tumorimmunológia: FasL counterattack on lymphocytes. Vizsgálatok melanoma sejtvonallakkal.
 - Beckwith-Wiedemann szindróma, savi szfingomielináz hiány és a genomikus imprinting
A klinikai esettanulmánytól a kromoszómatérképezésig.
- Zárszó, köszönetnyilvánítás
- Melléklet: hivatkozott közlemények

Rövidítések jegyzéke:

AP-1:	aktivátor protein
ASM :	acid sphingomyelinase/savi szfingomielináz
BRM:	biological response modifier
BWS:	Beckwith - Wiedemann szindróma
CF:	cisztikus fibrosis
CFTR:	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
DDA-Cl:	didodecildimetil-ammonium-chlorid
DHEA:	dehydroepiandrosterone
IkappaBalfa	inhibitor kappa B alfa
FasL:	Fas ligand (CD95 ligand)
HMC:	human melanoma cell
IGF-I:	insulin-like growth factor I
LOH:	loss of heterozygosity
MEN:	multiple endocrine neoplasia
NFkappaB	nuclear factor kappa B
NFκB:	nuclear factor kappa B
PMN:	polymorphonuclear (cells)
SMPD:	sphingomyelin- phosphate-dehydrogenase
TIL:	tumor-infiltrating-lymphocytes
TNF:	tumor-necrosis-factor

BEVEZETÉS

A sejtmagban kromoszómákhoz kötöten elhelyezkedő, fehérje-szintézist kódoló DNS funkcióját speciális szabályozó fehérjék befolyásolják, szigorúan meghatározott rendszerben. A rendszer bármely pontján sérülhet, és ha a kompenzáló mechanizmusok nem működnek megfelelően, felborul a sejt normális anyagcseréje. Mindez a sejt apoptotikus vagy nekrotikus jellegű pusztulásához, vagy malignus átalakulásához vezethet.

A liposzomális - vagy vírusvektorokat alkalmazó direkt génterápiás próbálkozásokat, melyek célja egy hibás gén "helyettesítése", a kilencvenes évek elején tapasztalt kezdeti lelkesedést követően manapság óvatos fenntartással fogadják. Az alkalmazott vektorok problémáján (rövid életidő, ill. infekciók és a malignus transzformáció veszélyei, a célzott alkalmazhatóság korlátozott volta stb., MUELLER&YOUNG, 1998) túl felismerésre került, hogy a bejuttatott nukleinsav expresszióját szabályozó transzkripciós fehérjék és az ezek aktivitásáért felelős sejten belüli jelátviteli rendszerek hatását nem lehet figyelmen kívül hagyni. E folyamatok pontosabb megismerése tehát előfeltétele a génterápia alkalmazhatóságának is. E jelátviteli rendszereket mostanában kezdték részletesebben tanulmányozni. (SIPKA, 2000, FIRESTEIN & MANNING, 1999).

Jelen munka célja ehhez kapcsolódóan olyan jelátviteli rendszerek és ezek szabályozásán alapuló, terápiásan is alkalmazható módszerek vizsgálata volt, melyek pontosabb megismerése révén a szervezet homeosztázisának fenntartásában meghatározó szerepet játszó biológiai rendszer, az immunrendszer veleszületett vagy szerzett működészavara korrigálható. Ezen belül

a. Olyan, jól jellemezhető paraméterek vizsgálatát tűztük ki célul:

- melyekkel kapcsolatban nagytömegű, populációgenetikai következtetések levonására is alkalmas állatkísérletes és humán vizsgálati lelet állhat rendelkezésre, amelyek jól jellemzik a rendszer működését,
- amelyek befolyásolásával a homeosztázis megbomlott egyensúlya közel az eredeti szintre állítható vissza, viszonylag egyszerűen.

b. Gyakorló klinikusként értékelni kívántam továbbá olyan, orvosi munkám során megismert kóros állapotokat is, melyek esetében

várható volt, hogy a sejtszintű (subcelluláris és /vagy a genetikai) háttér részletesebb vizsgálata hasznos, előremutató információval szolgálhat e betegségek/állapotok kialakulásának megelőzéséhez/ kezeléséhez, az eredeti, normális sejtfunkciók visszaállításához.

A fenti célkitűzéseknek megfelelő, egymástól látszólag eltérő vizsgálatokban a közös az volt, hogy valamennyi kóros esetben az immunhomeosztázis zavara kimutatható volt.

Egyes esetekben génmutációk vagy kromoszomális transzlokációk kapcsán képződött, kóros, a betegség tüneteire is részben felelős *immunmoduláns hatású fehérjék* meglétének kimutatására szorítkozhattunk, egyelőre csak diagnosztikus célból (pl. kóros CFTR jelenléte cisztikus fibrosisban, chimaera fehérjék jelenléte leukémiákban), más esetekben, főként állatkísérletes rendszerekben célzottan is vizsgálhattuk biológiai eredetű, *exogén* vagy *endogén immunmodulánsok* (baktériumkivonatok, vírusok, nemi/hormonális különbségek) hatását az immunválaszadó képességre.

Foglalkoztunk az *optimális adjuvancia* matematikai törvényszerűségeivel, *immunmoduláns hatású anyagok* esetében. Vizsgáltuk azt is, mennyiben vonatkoztathatók e törvényszerűségek a *génterápiás vektorként alkalmazott liposzómákra*.

Vizsgáltuk a *programozott sejthalál (apoptosis)* folyamatában lényeges molekulák (Fas, FasL, Bcl-2) szerepét a tumor és a citotoxikus lymphociták kölcsönhatásában.

Ugyanakkor *klinikai megfigyelésekből* is igyekeztünk általánosabb érvényű következtetéseket levonni. A minor anomáliák nagyobb számú jelenlétét tumoros betegeknel a megzavart ontogenezissel, a savi szfingomielináz defektusát Beckwith-Wiedemann syndromás betegünknel közvetlenül a fokozott tumorhajlammal hoztuk összefüggésbe. Az utóbbi klinikai eset alapján levont következtetések elősegítették a *savi szfingomielináz* gén pontosabb *lokalizálását* a 11-es kromoszómán, de a *géntérképezés* mellett hozzájárultak a *genomikus imprinting* bizonyos törvényszerűségeinek további vizsgálatához is.

A közölt vizsgálati eredmények alapján a vizsgálatok további folytatását tervezzük.

Referenciák

- Firestein GS, Manning AM: Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 1999 ;42:609-21
- Mueller RF, Young ID : The human genome project, treatment of genetic disease and gene therapy. In: Emery's Elements of Medical Genetics. Churchill-Livingstone, Edinburgh, 1998, 10th ed.319-331
- Sipka S et al: A sejten belüli jelátvitel útjai és kapcsolatai az immunrendszerrel. A Magyar Immunológiai Társaság és a Magyar Allergológiai-és Klinikai Immunológiai Társaság X. Továbbképzése, Salgóháza, 2000 május 5-6

Minor anomáliák, mint az organogenezis zavarának indikátorai

Az első genetikai vizsgálataimat Méhes Károly professzor minor anomáliákkal kapcsolatban 1985-ben megjelent vizsgálatai inspirálták, amire Schuler Dezső és Fekete György professzorok hívták fel figyelmemet.

Méhes professzor svájci vizsgálatai alapján Magyarországon is megvizsgáltuk a minor anomáliák (veleszületett apróbb, önmagukban jelentéktelen morfogenetikai variánsok) gyakoriságát malignus betegségekben szenvedő gyermekeknél. Vizsgálataink megerősítették eredeti megfigyelését, *malignus betegségekben szenvedő gyermekeknél a minor anomáliák előfordulási gyakorisága magasabb*, mint egészséges társaiknál. Mindezek gyakoribb jelenléte egy betegen indikátora lehet tehát az *organogenezis* zavarának. Ebből a vizsgálatsorozatról született az első közös munka az azóta a pécsi Egyetemen dolgozó Méhes professzorral.

Azóta több, az egyedfejlődésben szerepet játszó géncsaládról ismertté vált, hogy közülük lehet a malignus átalakulásokhoz. A malignus tumorokról közismert, hogy több úton modulálhatják az immunrendszert, saját túlélésüket biztosítandó. Mindezekről az értekezés más részeiben lesz szó.

Az egyedfejlődésben szerepet játszó géncsaládok a malignus átalakulásban :

Gén	Kromoszóma	Fejlődési rendellenesség	Malignitás
PAX3	2q35	Waardenburg sy-	Alveolaris rhabdomyosarcoma
KIT	4q12	Piebaldism	Hízósejtes leukémia
PTC	9q22	Gorlin sy	Basalsejtes rák
RET	10q11	Hirschprung-betegség	MEN2A,MEN2B, Pajzsmirigy-rák
WT1	11p13	Denys-Drash sy	Wilms tumor

(Forrás: Mueller RF, Young ID: Emery's Elements of medical genetics 10th Ed. Churchill-Livingstone Edinburgh-London)

Összefoglalva: Hazai gyermekpopuláció nagyszámú, adatgyűjtő jellegű vizsgálata során elért eredményeink tehát alátámasztották azon előzetes megfigyeléseket, hogy az organogenezisben szerepet játszó gének és fehérjetermékeik kóros esetben minor anomáliák nagyobb számú kialakulása mellett fokozhatják a tumorképződés kockázatát is.

Saját irodalom:

- Méhes, K., Fekete, G., Batta, I. und Réthy, L.A.(1985): Dymorphierate beim Kindern mit Tumorkrankheiten. Monatschr. Kinderheilkunde 133.: 646
 Fekete, Gy., Schuler, D., Dobos, M. and Réthy, L.A.(1987): Minor anomalies in children with leukemia and malignant tumours. Orvosi Hetilap: 128.: 725-728

Kóros gének molekuláris genetikai diagnosztikája immundeficiens állapotokban
I. A $\Delta F508$ mutáció diagnosztikája, klinikai képe cisztikus fibrosisban.

(Kollaboráció az MTA-SzBK Enzimológiai Intézetével)

A cisztikus fibrosis (CF) a leggyakoribb anyagcserezavar a kaukázusi populációban, incidenciája kb. 1:2500. A potenciálisan halálos betegség tüneteier (magas sótartalmú, sűrű váladékot termelő, nehezen kiürülő mirigyek, váladékpangás, következményes légúti infekciók: főként *Pseudomonas aeruginosa*, továbbá felszivódási zavar stb.) a klorid ion transzportjában kulcsszerepet játszó CFTR fehérje hibás működése felel. Utóbbit a CF gén kódolja, kromoszóma-lokalizációja 7q31. *Az immunvédekezés másodlagos zavara mellett egyre több adat válik ismertté a CFTR helyi és szisztémás immunmoduláns hatásáról is* (MOSS, 2000).

Az elsők között vizsgáltuk az esetek legnagyobb részéert felelős $\Delta F508$ mutáció gyakoriságát beteganyagunkon polimeráz láncreakcióval (FEKETE G et al, 1992). A gyakoriság (67,9%) nagyjából megegyezett a hasonló közép-európai adatokkal.(ROMEO, 1990)

Feltűnő volt a légúti-pulmonális tünetek megléte valamennyi $\Delta F508$ mutációt hordozó betegnél. Ennek molekuláris háttere csak mostanában látszik tisztázódni.

Lokálisan $\Delta F508$ mutáció esetén az epithelsejtek apoptózisa hibás, gátolt, részben a hibás CFTR-nek tulajdonított savanyítási képtelenség miatt, ami az apoptózis-indukció elmaradásához vezethet (GOTTLIEB, 1996; MAIURI, 1997). A beteg epithelsejtekben részben endogén úton, részben a *Pseudomonas* infekciók hatására az IkappaBalfa termelés csökken, következményes NFkappaB és IL-8 szint emelkedéssel. Utóbbival magyarázzák a lokális PMN akkumulációt a légutakban. A Genistein, egy isoflavon molekula képes megakadályozni ezt a folyamatot (TABARY, 1999). Magunk és mások vizsgálatai alapján tehát fölvetődik, hogy a Genistein hatását a hazai, légúti tüneteket produkáló, főként $\Delta F508$ mutációt hordozó CF-betegek többségénél is indokolt lenne széles körben vizsgálni.

Szisztémás hatását a kóros CFTR részben a CD4 T limfociták IL-10 mRNS termelésének fokozása és IFN γ szekréciójuk csökkentése révén fejti ki (MOSS, 2000). Ez részben magyarázatot adhat arra a klinikai tapasztalatra, hogy az atopiás-asthmás tünetek gyakoribbak CF-es betegeknel.

Konklúzió: A molekuláris genetikai módszerek alkalmazása a diagnosztikai lehetőségeken túl a jövőben segítséget adhat a kiegészítő immunterápia pontosabb meghatározásához, szükségességének eldöntéséhez cisztikus fibrosisban.

Saját irodalom:

Fekete, G., Váradi, A., Pipiras É., Németh, K., Réthy, L.A., Holics, K. és Ujhelyi, R (1992)
A delta F 508 kimutatása cysticus fibrosisban. Orvosi Hetilap 133.: 2423-2430

A szövegben hivatkozott egyéb irodalom:

Gottlieb RA, Dosanjh A: Mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibits acidification and apoptosis in C127 cells: possible relevance to cystic fibrosis.
Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93(8):3587-91

Maiuri L, Raia V, De Marco G, Coletta S, de Ritis G, Londei M, Auricchio S: DNA fragmentation is a feature of cystic fibrosis epithelial cells: a disease with inappropriate apoptosis?
FEBS Lett 1997; 408(2):225-31

Moss RB, Hsu Y, Olds L: Cytokine dysregulation in activated cystic fibrosis (CF) peripheral lymphocytes.
Clin Exp Immunol 2000;120(3):518-525

Mueller RF, Young ID: Emery's Elements of medical genetics 10th Ed. Churchill Livingstone
Edinburgh-London 1998. pp 88-89

Romeo G, Devoto M: Population analysis of the major mutation in cystic fibrosis. Hum Genet
1990; 85: 391

Tabary O, Escotte S, Couetil JP, Hubert D, Dusser D, Puchelle E, Jacquot J:
Genistein inhibits constitutive and inducible NFkappaB activation and decreases IL-8
production by human cystic fibrosis bronchial gland cells. Am J Pathol 1999;155(2):473-81

Kóros gének molekuláris genetikai diagnosztikája immundeficiens állapotokban

II. Chimaera géntermékek egyes hematológiai betegségekben.

(Kollaboráció az Országos Hematológiai –és Immunológiai Intézettel)

Sejtszinten *immunmoduláns hatásúak* lehetnek azon *chimaera géntermékek* is, melyek bizonyos daganatos betegségekért felelős molekuláris elváltozások eredményeként jönnek létre. Az egyes betegségekben rendre kimutatható *kromoszomális rendellenességek*, pl. egyes hematológiai *betegségekre jellemző transzlokációk*: krónikus myeloid leukémiákban és egyes akut limfoid leukémiákban t(9;22), akut promyelocytás leukémiában t(15;17) és az akut myeloid leukémiában t(8;21) - vizsgálata vezetett el a chimaerákat alkotó gének szerkezetének megismeréséhez is.

A *chimaera géntermékek kimutatása* jelenleg *még főként a diagnosztika területén* bír gyakorlati jelentőséggel.

Mindennek gyakorlati alkalmazásában Földi János kutatócsoportjával közös OTKA-pályázat (OTKA F 5428) keretén belül vehettem részt.

A vizsgálatok a mindennapi diagnosztikában a *következő lehetőségeket* nyújtják:

Csontvelőátültetés előkészítésében (donorkeresés, csontvelő “*purging*” hatásfok-vizsgálata és a köldökzsinórvér minőségének ellenőrzése területén), a *terápia követésében: minimális maradék leukémiák* detektálásában ill. a *csontvelő-transzplantátum* megtapadásának bizonyításában.

Az alkalmazható metodikák fejlődésével e módszerek egyre közvetlenebb hatással lehetnek magára a *terápiára* is.

(Saját) irodalom:

Földi J, Gyódi É, Páldi-Haris P, Réthy LA: Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása a myeloproliferatív betegségek gyógykezelésében. Magyar Belorvosi Archivum 1996;49: 266-270

**Baktérium, vírus, liposzóma eredetű immunmodulánsok vizsgálata.
Az optimális adjuvancia kérdése. Az aktív immunizálást befolyásoló tényezők.**

Részletesen az alábbi témákkal foglalkoztunk a mellékelt közleményekben:

1. Baktérium eredetű anyagok immunmoduláns hatása
2. *Az optimális adjuvancia* elvének általános alkalmazása a vizsgált immunmoduláns hatású anyagokra. *Liposzómák* hatásának vizsgálata és *optimalizálása* az optimális adjuvancia elv alapján, *immunmodulánsként* ill. *vírus-és potenciális génterápiás vektorként* történő felhasználásuk céljából.
3. *Életkor és nemi hovatartozás hatása* az immunválaszadó képességre.
Anyai aktív immunizálás, passzív anyai ellenanyagok hatása.
Az LPS immunmoduláns hatása az életkor és a nemi hovatartozás által befolyásolt immunológiai válaszadó képességre

A vizsgálatok a következő intézetek kollaborációjával történtek, 1980-2000 között:

Humán Oltóanyagtermelő-és Kutatóintézet, MTA-Állatorvostudományi Kutatóintézete, Pécsi OTE (Pécsi Egyetem) Mikrobiológiai Intézete, Phylaxia Állami Oltóanyag-és Tápszertermelő Vállalat, Semmelweis OTE (Semmelweis Egyetem) I. Élettani Intézete. A munkákba a későbbiekben az Érdi Független Állatorvosi Laboratórium, Független Genetikai –és Immunológiai Munkacsoport, Budapest is bekapcsolódott.

A metodológiai részt ld. a Mellékletben.

1. Baktérium eredetű anyagok immunmoduláns hatása

A Phylaxia és a Human Állami Oltóanyagtermelő Intézetekben munkatársaimmal az 1980-as években *Brucella*, *Bordetella* és *Corynebacterium* készítmények aduváló, immunmoduláns hatását vizsgáltuk, részben Ehrlich- ascites tumoros egerek élettartamára, részben a Prigge-féle aktív, tetanuszimmunizálási-toxintűrési tesztet alkalmazva, szintén egereknél.

Eredményeinket, melyek bevezetését jelentették az optimális adjuvancia vizsgálatával foglalkozó tanulmányainknak, **az alábbi közleményekben** publikáltuk:

Géresi, M., Réthy, L., Bácskai, L. and Réthy, L.A. (1980) Antitumor effect of different corynebacterium immunomodulators in non isogenic mouse-tumor system. *Acta vet. Acad. Sci. hung.*: 28.: 279-282.

Réthy, L., Géresi, M., Gelencsér F., Écsy R., Padányi M., Pogány I., Bácskai L. and Réthy L.A. (1980) Heat-inactivated Brucella suspensions as modulators of hosts' defense against tumors. *Acta vet. Acad. Sci. Hung.*: 28.: 277- 279

Gelencsér F., Réthy L., Bácskai L., Géresi M., Pogány I., Padányi M. and Réthy L.A. (1980) The effect of anaerobic corynebacterial immunostimulants on the primary immune response to tetanus toxoid and perfringens epsilon toxoid. *Acta vet. Acad. Sci. hung.*: 28.: 285-287.

Réthy, L., Réthy, L.A. and Géresi, M.: (1983) Immunomodulation of primary antitoxic-type immunity with inactivated Brucella suspensions. *Acta. Vet. Acad. Sci. hung.*: 34.: 43- 49

Magyar T., Géresi M., Semjén G., Solténszky J., Réthy L.A. and Réthy L. (1983) Studies on the immunological adjuvant activity of Bordetella bronchiseptica in mice. *Acta Vet.Hung.* 31.: 31- 35

Magyar, T., Géresi M., Solténszky J., Réthy LA, and Réthy L: (1983) Some factors influencing the immunological adjuvant effect of Bordetella bronchiseptica on the immune response to tetanus toxoid. *Acta Vet. Hung.* 31.: 37- 42

2. Az optimális adjuvancia elvének általános alkalmazása a vizsgált immunmoduláns hatású anyagokra. Liposzómák hatásának vizsgálata és optimalizálása az optimális adjuvancia elv alapján immunmoduláns, vírus-és potenciális génterápiás vektorként történő felhasználásuk céljából.

2.1. Az optimális adjuvancia elvének általános alkalmazása a vizsgált immunmoduláns hatású anyagokra:

Megkíséreltük standardizálni egyes baktérium-eredetű biológiai anyagok adjuváló, immunmoduláns hatását .

Ezzel kapcsolatban **megjelent közleményeink:**

Magyar, T., Solténszky, J., Kontrohr, T., Lendvai, N., Réthy, L.A., Géresi, M., Hegedűs, L., Écsy, R., Réthy, L. and Bácskai, L. (1984):
Trials to define the degree of adjuvant activity of immunomodulants of microbiological origin. I. Launching a model for standardization. *Ann. Immunol. hung.*: 23.: 197-203.

Solténszky J., Magyar T., Lendvai N., Kontróhr T., Réthy L.A., Acharya M.P., Géresi M., Réthy L.: Trials to define the degree of adjuvant activity of immunomodulants of microbiological origin. (1984) II. The control of the standardization model in Practice Ann. Immunol. hung.: 23.: 205-210.,

Réthy, L.A., Réthy L, Erdős L, Géresi M, Magyar T, Solténszky J, Écsy R and Bácskai L (1984) Trials to standardize the in vivo immunomodulant activity. I. Effect of Corynebacterium immunomodulators on the events connected with the development of primary antitoxic immunity and hosts' defense. Ann. Immunol. hung.: 24.: 191-197

Réthy, L., Erdős L, Géresi M, Solténszky J, Magyar T, , Réthy L.A. and Bácskai L (1984): Trials to standardize the in vivo immunomodulant activity II. Brucella whole-cell immuno-modulants' effect on the development of antitoxic immunity and changes in the hosts' defense-degrees. Ann. Immunol. hung.: 24.: 199-205

Padányi M., Réthy L.A., Kulcsár Á., Géresi M., Réthy L and Bácskai L (1984) Trials to standardize the in vivo immunomodulant activity III. Corynebacterium-and Brucella originating immuno-modulants and changes in the development of antibacterial immunity and hosts' defense-degrees. Ann. Immunol. hung.: 24.: 207-212

2.2. Az adjuvancia mértékének optimalizálása immunmodulánsok alkalmazásakor:

Réthy L.A.: Az optimális adjuvancia immunmodulánsok alkalmazásakor (Ld. külön, a Mellékletben)

2.3. Liposzómák immunmoduláns hatása és virusterápiás vektorként való alkalmazhatósága:

Liposzómák immunmoduláns hatásával és potenciális onkolitikus virusterápiás vektorként való alkalmazhatóságával egérkísérletekben foglalkoztunk. Immunmoduláns hatásuk mellett előnyük, hogy *képesek az onkolitikus vírust az immunfelismeréstől megóvni*, és azt így eljuttatni a célsejtekhez. (RÉTHY L.A. et al., 2000a.,b., SÓLYOM et al, 2000).

Miután hatásuk *dózis-dependens* (ld. optimális adjuvanciával foglalkozó részek ill. BÁTHORI 2000), feltételezhető, hogy hatásukat receptorokon keresztül fejtik ki. Összetett voltuk , lehetséges interakcióik miatt (koleszterin, sztearilamin, lecitin tartalmuk mellett egyes liposzóma-preparátumaink lipid-A-t is tartalmaztak, továbbá kationos liposzómákat is vizsgáltunk) hatásuk sejtszintű értékelésével jelen munkában nem foglalkozhatunk. A lipidek ilyen jellegű hatásával közvetetten számos közlemény foglalkozik, a korlátozott terjedelem miatt itt RIDGWAY és mtsai friss összefoglaló közleményére hivatkozom.

Hivatkozott irodalom:

Ridgway ND, Byers DM, Cook HW, Storey MK
Integration of phospholipid and sterol metabolism in mammalian cells.
Prog Lipid Res 1999 ;38(4):337-60

A témával kapcsolatos saját munkák:

Réthy, L.A., Báthori, G., Sólyom, F., Kontrohr, T. Réthy L.(2000 a) Liposome entrapped viruses for oncolytic therapy in the presence of antiviral antibodies: Anticancer Res: in press

***Az EFIS 2000 évi, Poznanban megrendezendő kongresszusára beküldött és elfogadott munkák (az absztraktokat az Immunol. Letters közli) :**

Réthy, L.A., Sólyom, F., Kontrohr, T., Réthy, L.(2000 b): Viruses in liposomes: Oncolysis in the presence of neutralising antibodies-I.

Sólyom, F., Réthy, L., Kontrohr, T., and Réthy L.A. (2000):: Viruses and liposomes: Oncolysis in the presence of neutralising antibodies-II.

Báthori Gy., Réthy L.A., Kontrohr T., And Réthy L: (2000):
Optimal adjuvation: A cardinal principle during application of liposome adjuvants

***Az MMT 2000 évi Kongresszusára beküldött és elfogadott munkák (az absztraktokat az Acta Microbiol et Immunol Hung közli):**

Réthy, L.A., Sólyom, F. és Báthori, Gy. (2000 c):: Az IBDV-virus onkolitikus hatásának növelése hagyományos és kationos liposzóma komplexek alkalmazásával

Réthy Lajos Attila ,Báthori György és Réthy Lajos: (2000 d): Túlélési idő növelése tumoros egerekben kationos lipid / bakteriális-BRM komplexekkel

*Id. külön, a Mellékletben (a 2000. évben elfogadott, folyóirat által közlésre kerülő kongresszusi absztrakt-gyűjteményben)

3. Életkor és nemi hovatartozás hatása az immunválaszadó képességre.

Anyai aktív immunizálás, passzív anyai ellenanyagok hatása.

Az LPS immunmoduláns hatása

Az életkor és a nemi hovatartozás szerepét az immunválaszadó képességben humán tetanusz-immunizálási *eredmények és állatkísérletek* alapján analizáltuk. Külön vizsgáltuk az anyai aktív immunizálás hatását, az anyai passzív ellenanyagok szerepét illetve az idősödő immunrendszer válaszadó képessége fokozásának lehetőségeit.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy:

-Tetanusz és diftéria ellen immunizált *csecsemőknél* az anyai passzív ellenanyagok jelenléte esetén az emlékeztető oltást követően is jelentős a védettséget nem szerzők aránya. A

harmadik oltást követően azonban a kiindulási statustól függetlenül biztos védettség alakul ki az esetek döntő többségében. (RÉTHY 1986a)

-A *neonatalis tetanus megelőzésének* legjobb eszköze a komplett anyai immunizálás (RÉTHY 1986b).

Humán tetanusz immunizálások eredményeit vizsgálva az életkor szerint női és férfi csoportokban (csecsemők-fiatalok-idősek) összehasonlítottuk a tetanusz ellenanyagszintek változását ill. annak dinamikáját (alapimmunizálás után mért szint, booster előtt /után mért tetanusz ellenanyagszintek alapján). A vizsgálatok szerint megállapítható volt, hogy

1. Az immunizálások során észlelt ellenanyagszint-változások dinamikája *a serdülő és a felnőtt* korcsoportban *nemi különbséget* mutat: Nők ellenanyagszintje az alapimmunizálást követően nagyobb mértékben csökken, emlékeztető oltás után viszont nagyobb mértékben emelkedik a férfiakéhoz viszonyítva. Vagyis az immunológiai *memória jobb funkcionalitása nőknél* alacsonyabb nyugalmi ellenanyagszintek esetén is *a férfiakéval azonos értékű védettséget biztosíthat*.
2. *Csecsemőknél* ezek a különbségek nem jelentkeznek, ami az immunológiai memória funkcionalitásának hormonális szabályozottságára utalhat.
3. Bakteriális *endotoxint* tartalmazó készítmények (Ty-Te) alkalmazásakor a reprodukív korban lévőknél sem észleltünk szignifikáns különbséget az ellenanyagszintekben.

Vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy az *LPS* az immunológiai memória *funkcionalitását a női hormonhatással megegyező irányban* módosítja a reprodukív korban lévőknél : LPS tartalmú oltóanyag alkalmazásakor kifejezett, nagymértékű ellenanyagszint-csökkenés illetve növekedés észlelhető alapimmunizálást követően illetve a booster után, a nemi hovatartozástól függetlenül.

Időseknél booster előtt a nők ellenanyagszintje az esetek döntő többségében (83%) mérhetetlenül alacsony. Férfiaknál ez az arány 56%. Emlékeztető oltást követően az ellenanyagszintek kiegyenlítődnek. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy a reprodukív korban a memóriasejteket ért hormonok hatása részben megmarad a későbbiekben is. Ezt a későbbiekben további vizsgálatokkal szeretnénk tisztázni. (RÉTHY, 1986c)

Mindazonáltal vizsgálataink alapján megállapítható, hogy bakteriális *endotoxint* tartalmazó tetanusz toxoid oltóanyaggal sikeresen, *biztonságosan immunizálhatóak tetanusz ellen az idősebb korosztályok* is (RÉTHY & RÉTHY 1988)

A kor-és a nem által meghatározott immunválaszadó képesség vizsgálatának fentebb részletezett eredményeit *tengerimalacokon végzett vizsgálatainkkal összevetve* (RÉTHY, 2000 a,b) kitűnik, hogy a reprodukív korban lévő állatoknál az LPS adása tovább fokozta a tendenciajelleggel meglévő nemi különbségeket az elleanyagszintekben. Nőstény állatok ellenanyagszintje erőteljesebb csökkenést /növekedést mutatott booster előtt/ után a hímekéhez képest.

A tetanusz antitoxinnal végzett alapimmunizálást követő alacsonyabb ellenanyagszinteket minden korcsoportban észleltük nőstény tengerimalacoknál, ez a hormonhatástól független (kizárólag a *nemi kromoszómák* típusához kötötten jelentkező) eltérés volt.

A nemi hormonok közül a *DHEA-t* és származékait tartják az egyik fő immunreguláló hormonnak, hatásaival kiemelten foglalkoznak, talán az endotoxin sokkban játszott kiemelt szerepe miatt (BERCZI & SZENTIVÁNYI, 1996, BERCZI, 1998) .

A DHEA *pleiotrop* hatású, a Th1 (IL-2) hatások mellett mellett a Th2 jellegű (IL-4, IL-5, IL-10) immunválaszt is befolyásolja (CHENG 2000). Atopiás dermatitisben szerepét TABATA vélelmezte 1997-ben. Időskorú férfiak immunfunkcióinak helyreállításában is próbálkoztak adásával, hatását részben IGF-I mediálnak tulajdonítva (KHORRAM, 1997).

Vizsgálataink alapján úgy tűnik, a nemi hormonok immunológiai moduláló hatását tekintve a *női nemi hormonok (ösztrogének, progeszteron) szerepe sem elhanyagolható. Az ösztrogének LPS-el együttműködve képesek dózis-függő módon IL-1 β promoter aktivitást kifejteni (RUH, 1998).Az NF κ B és AP-1 aktivitást sejtspecifikus módon regulálják. (CERILLO, 1998). Az ösztrogén és a progeszteron gátolja az IL-1 termelést monocitákban. Alacsony női hormonszintek esetén az LPS által kiváltott IL-1 termelés fokozódását MORISHITA 1999-ben közölte. Elképzelhető, hogy az LPS vizsgálataink során észlelt immunválasz-kiegyenlítő hatása is ezen a mechanizmuson alapszik.*

Hivatkozások:

Berczi I & Szentiványi A: 1996. The pituitary gland, psychoneurology and infection. In: Psychoneurology, Stress and Infectious Disease. H. Fredman, T. Klein & A.L. Friedman, Eds. pp 79-109 CRC Press, Boca Raton, FL.

Berczi I: Neurohormonal host defense in endotoxin shock. Ann N Y Acad Sci 1998 ;840:787-802

Cheng GF, Tseng J: Regulation of murine interleukin-10 production by dehydroepiandrosterone. J Interferon Cytokine Res 2000 ;20(5):471-8

Cerillo G, Rees A, Manchanda N, Reilly C, Brogan I, White A, Needham M:
The oestrogen receptor regulates NFkappaB and AP-1 activity in a cell-specific
manner.
J Steroid Biochem Mol Biol 1998;67(2):79-88

Khorram O, Vu L, Yen SS: Activation of immune function by dehydroepiandrosterone (DHEA) in
age-advanced men.
J Gerontol A Biol Sci Med Sci 1997 ;52(1):M1-7

Morishita M, Miyagi M, Iwamoto Y (1999): Effects of sex hormones on production of interleukin-1
by human peripheral monocytes. *J Periodontol*;70:757-60

Ruh MF, Bi Y, D'Alonzo R, Bellone CJ: Effect of estrogens on IL-1beta promoter activity.
J Steroid Biochem Mol Biol 1998;66(4):203-10

Tabata N, Tagami H, Terui T: Dehydroepiandrosterone may be one of the regulators of cytokine
production in atopic dermatitis.
Arch Dermatol Res 1997 ;289(7):410-4

Saját közlemények:

Réthy, L.A. and Réthy, L. (1986a) DTP immunisation of infants: the role of passive antibodies of
maternal origin. *Ann. Immunol. hung.*: 26/2.: 563 - 569

Réthy, L.A. and Réthy, L.(1986b). Active anti-tetanus immunisation of females to control neonatal
tetanus. (Research Letter to the Editor) *The Lancet* 8481(i):. 616.,

Réthy, L.A. and Réthy, L.(1986c). The age- and sex-dependent features of the development of human
immune memory. *Ann. Immunol. hung.*: 26/2.: 551-563

Réthy, L. and Réthy, L.A. (1988) LPS-induced immunomodulation in man. In: "Advances in Immuno-
modulation" [Ed.: B. Bizzini and E. Bonmassar], PYTHAGORA, Roma - Milano, 1988. pp.: 381- 392

Réthy, L.A., Géresi, M. and Réthy L: (2000 a) The age- and sex-determined differences in the
establishment of tetanus antitoxin production in guinea pigs.
Acta Vet. Hung. Közlésre elfogadva/Accepted

*Réthy L.A, Géresi M and Réthy, L. (2000 b) : Tetanus immunisation: a better functionality of the
female (or LPS-effected) immune memory.
Abstr. Accepted : EFIS 2000 Congress, Poznan / publ. accepted in: *Immunol. Letters*

*Id. külön, a Mellékletben, a 2000. évben elfogadott, folyóirat által közlésre kerülő kongresszusi
absztrakt-gyűjteményben.

**Tumorimmunológia: FasL counterattack on lymphocytes:
Vizsgálatok melanoma sejtvonalakkal**

(kollaboráció : All Children's Hospital, St. Petersburg-Tampa, Univ. of South Florida,
St. Joseph's Cancer Center, Tampa, FL.

A *tumorsejtek* több úton képesek kitérni az immunrendszer támadása elől. Leginkább az immunfelismerés számára megfelelő antigén és/vagy kiegészítő molekulák hiánya az, ami a hatékony immunválasz elmaradásához vezet. E mechanizmusokat STEELE idei munkája részletesen tárgyalja.

HAHNE és O'CONEL 1996-ban publikálták először, hogy FasL+ tumorsejtek képesek *apoptosist* indukálni Fas+ lymphocytákban. CHAPPELL és mtsai 1999-ben az általuk vizsgált melanoma sejtvonalakon nem tudták a FasL jelenlétét igazolni sem immunhisztokémiai módszerekkel, sem mRNS-expresszió vizsgálatával, ezért vitatják a mechanizmust. További részletekkel egy másik, az Értekezés részét képező közleményem megbeszélés részében is foglalkozom (RÉTHY, in press) Az elsők között vizsgáltuk a jelenséget melanoma sejtvonalon (HMC), munkatársaimmal a University of South Florida, Tampa Gyermekklinikáján (All Childrens' Hospital St Petersburg), a tampai St Joseph's Hospital rákkutató laboratóriumával együttműködve.

Eredményeink szerint a vizsgált friss melanoma sejtvonalak apoptosissra készítették a Jurkat T-lymphoma sejteket és egyes TIL sejteket is. Öt régebbi sejtvonalakon FasL nem volt jelen, és csupán egyikük mutatott Jurkat sejtek elleni aktivitást. Valószínű, hogy a HMC-k lymphocytamentes in vitro környezetben fokozatosan csökkentik/megszüntetik a FasL expresszióját. Mindez magyarázhatja CHAPPELL eredményeit is.

A vizsgált sejtvonalak egy részén immunhisztokémiai módszerekkel Fas, FasL és Bcl-2 molekulák együttes jelenlétét sikerült igazolnunk (A St Joseph Hospitalból származó fibrosarcoma sejtvonalakon hasonló eredményeket kaptunk: nem publikált adat). FERRARINI (1999) szerint mindez a Fas-mediálta intracelluláris szignálrendszer blokkját jelenti. Mi lehetséges magyarázatként Sinkovics professzorral együtt azt valljuk, hogy a fenti konstellációt a tumorsejtek autokrin növekedési faktorként alkalmazhatják, hasonlóan a neuroblastoma által használt Fas-rokon TNF-úthoz (GOILLOT, 1992). Mindezek további vizsgálata tervezett.

Hivatkozott irodalom:

- Chappell DB, Zaks TZ, Rosenberg SA, Restifo NP Human melanoma cells do not express Fas (Apo-1/CD95) ligand. *Cancer Res* 1999;59(1):59-62
- O'Conel, J., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K., Shanahan, F.: The Fas counterattack: Fas-mediated T-cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J. Exp. Med.*1996; 184.: 1075 - 1082.,
- Ferrarini M, Imro MA, Sciorati C, Heltai S, Protti MP, Pellicciari C, Rovere P, Manfredi AA: Blockade of the Fas-triggered intracellular signaling pathway in human melanomas is circumvented by cytotoxic lymphocytes. *Int J Cancer* 1999;81:573-9
- Goillot E, Combaret V, Ladenstein R, Baubet D, Blay JY, Philip T, Favrot MC: Tumor necrosis factor as an autocrine growth factor for neuroblastoma. *Cancer Res* 1992;52:3194-200
- Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J: Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996; 274:1363-6
- Steele TA: Recent Developments in the Virus Therapy of Cancer. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;223:118-27

Saját irodalom:

- Réthy L.A., Horvath J.C., Sinkovics J.G., Uckan D., Steele A. Horvath E, Horak A. and Good R.A.: (1997) Subversion of host immunity by human melanoma cells (HMC): I. FasL counterattack on lymphocytes:
- i. 88th Annual Meeting of AACR, San Diego, CAL
 - ii. *Proc Amer Assoc Cancer Res*, 38: 122-122

**Beckwith-Wiedemann szindróma, savi szfingomielináz hiány és genomikus imprinting:
Klinikai esettanulmánytól a kromoszómatérképezésig.**

A 11-es kromoszóma rövid karján a 11p15 régió meglehetősen figyelmet érdemel a humán tumorok szempontjából. Lényeges *tumor-suppresszor lókuszt*, melynél a heterozigótaság elvesztése (*loss of heterozygosity: LOH*) számos gyermekkori és felnőtt malignitás hátterében kimutatható (KARNIK, 1998). Ide lokalizálják a *Beckwith-Wiedemann szindróma (BWS)* kialakulásában szerepet játszó, eddig megismert géneket is (GAUDRAY 1999).

A BWS egy generalizált túlnövekedéssel járó tünetegyüttes, melyet nagy születési súly, újszülöttkori hypoglicaemia, visceromegalia, macroglossia, füldeformitások, durva arcvonások, köldöksérv és hemihypertrophia változatos társulása jellemez. A betegség gyakran jár együtt Wilms tumor, rhabdomyosarcoma, hepatoblastoma vagy más embrionális tumor kialakulásával. Számos, a régióban elhelyezkedő gén imprinting szabályozás alatt áll (ELLIOTT, 1994).

Genomikus imprinting esetén a gén aktivitása, expressziója az allél szülői eredetétől függ. Az ilyen lokuszokon anyai imprinting esetén csak az apai, apai imprinting esetén csak az anyai eredetű allél expresszálódhat normálisan. Az "imprinting-fegyelem" lazulásának vagy elvesztésének (*relaxation of imprinting, loss of imprinting*) igen jelentős szerepet tulajdonítanak a BWS és a társult tumorok kialakulásában (REIK, 1995)

A SOTE II Gyermekklinikáján munkatársaimmal együtt a világon elsőként írtuk le BWS tüneteit mutató betegünkénél a savi szfingomielináz enzim (ASM) csökkent aktivitását: (RÉTHY és mtsai 1998, 2000)

Az érdekes esetet a következő okokból tartottam érdemesnek további vizsgálatra.

Az ASM génjét (SMPD1) előzetes vizsgálatok szintén e régióba lokalizálták: 11p15.1-15.4 területre (da VEIGA PEREIRA, 1991). REDEKER ezt 1995-ben tovább szűkítette a 15.3-15.4 területre, de a humán genetikusok "Bibliája", a McKUSICK-katalógus a kérdést nyitva hagyta.

Az ASM felel a szfingomielin-ceramid átalakulásért is. Az így keletkezett *ceramid* molekulát a *programozott sejthalál (apoptózis)* egyik kulcsmolekulájának tartják (HAIMOVITZ-FRIEDMAN, 1997). Kézenfekvőnek látszott a feltételezés: a csökkent ASM aktivitás ill. ceramid-képződés esetleg szerepet játszhat a BWS-re jellemző tünetek kialakulásában. BWS-el foglalkozó kutatók gyakorlatilag egyöntetűen feltételezik a genomikus imprinting zavarát a betegség kialakulásában (REIK 1995; FEINBERG 1999), így megvizsgáltam azt is, hogy az

ASM termelődéséért felelős gén, az SMPD1 mennyiben mutat az imprinting-szabályozás alatt álló génekre jellemző tulajdonságokat (RÉTHY, 1998, 2000)

A feldolgozott eset segítségünkre volt az SMPD1 helyének pontosabb meghatározásához, az 1998-as nizzai, nemzetközi 11-es kromoszómatérképezési munkaértekezleten, amelyen a 11-es kromoszóma *eddig legpontosabb térképét* állítottuk össze, publikálásra. Az ismertett adatok és számítások:(RÉTHY, '98: URL: <http://www-iag.unice.fr/workshop/SCW11-6-Abstracts.html>) hozzájárultak ahhoz, hogy az SMPD1 helyét a 11p15.4 régióba lokalizáljuk (GAUDRAY et al, 1999)

Jelen munka nem teszi lehetővé, hogy a kromoszómatérképezés részleteivel behatóan foglalkozzunk. További részletekkel kapcsolatban utalok saját mellékelt közleményünkre: GAUDRAY et al, 1999) illetve a hozzáférhető szakirodalomra (MUELLER & YOUNG, 1998;; Genome Database 2000)

Hivatkozások:

da Veiga Pereira L; Desnick R.J.; Adler D.A. és mtsai: Regional assignment of the human acid sphingomyelinase gene (SMPD1) by PCR analysis of somatic cell hybrids and in situ hybridization to 11p15.1---p15.4. Genomics. 2, 229-234, 1991

Elliott M., Maher E.R.: Beckwith-Wiedemann syndrome. J. Med.Genet. 31, 560-564, 1994

Feinberg,AP: Imprinting of a genomic domain of 11p15 and loss of imprinting in cancer: an introduction. Cancer Res 1999 ; 59 (= Suppl):1743s-1746s

Gaudray P, Carle GF, Gerhard DS, Gessler M, Mannens MM, Athanasiou M, Bliet J, Calender A, Debelenko LV, Devignes M, Evans GA, Favier R, Forbes S, Gaudray G, Gawin B, Gordon M, Grimmond S, Grossfeld P, Harris J, Hattori M, Hosoda F, Hummerich H, James M, Kalla J, Katsanis N, Little P, Mattina T, Negrini M, Ohki M, Osborne Lawrence S, Parente F, Quincey D, Raynaud S, Reid L, Rethy LA, Schuurin E, Sellar G, Stilgenbauer S, Talbot C, Taschner P, Thangarajah T, Tunnacliffe A, Turc-Carel C, Van Heyningen V, Weber G, Zabel B:

Report of the Sixth International Workshop on Human Chromosome 11 Mapping 1998.

Cytogenet Cell Genet 1999;86:168-186

Genome Database: <http://gdbwww.org>

Haimovitz-Friedman A, Kolesnick RN, Fuks Z: Ceramide signaling in apoptosis. Brit. Med. Bulletin. 1997;53: 539-553

Karnik P, Paris M, Williams BR, Casey G, Crowe J, Chen P: Two distinct tumor suppressor loci within chromosome 11p15 implicated in breast cancer progression and metastasis. Hum Mol Genet 1998 ;7:895-903

Karnik P, Chen P, Paris M, Yeger H, Williams BR: Loss of heterozygosity at chromosome 11p15 in Wilms tumors: identification of two independent regions. Oncogene 1998 ;17: 237-40

McKusick, V.A.: Mendelian Inheritance in Man. Catalogs of Human Genes and Genetic Disorders. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1998 (12th edition)

Mueller RF, Young ID: Emery's Elements of Medical Genetics. Churchill-Livingstone, Edinburgh, 1998, 10th ed.

Reik-W; Brown-KW; Schneid-H; Le-Bouc-Y; Bickmore-W; Maher-ER Imprinting mutations in the Beckwith-Wiedemann syndrome suggested by altered imprinting pattern in the IGF2-H19 domain. Hum-Mol-Genet. 4(12), 2379-85, 1995.

Reik W and Maher ER Imprinting in clusters: lessons from Beckwith-Wiedemann syndrome: Trends Genet 1997; 13: 330-34

Saját irodalom:

Réthy Lajos Attila, Kálmánchey Rozália, Klujber Valéria, Koós Rozália és Fekete György (1998) Niemann-Pick betegség és Beckwith-Wiedemann szindróma együttes előfordulása: Gyermekgyógyászat, 49: 358-364

Gaudray P, Carle GF, Gerhard DS...Réthy L.A....et al (1999): Report of the Sixth International Workshop on Human Chromosome 11 Mapping 1998. Cytogenet Cell Genet;86:168-186

Réthy; L.A., Kálmánchey R; Klujber V; Koós R and Fekete G (2000): Acid Sphingomyelinase Deficiency in Beckwith -Wiedemann Syndrome Pathology Oncology Research, 6: 295-297

Réthy, L.A (2000): Growth regulation, acid sphingomyelinase gene and genomic imprinting: Lessons from an experiment of nature: Pathology Oncology Research 6: 298-300

A PhD értekezés tárgyát képező témákban elért új eredmények:

Hazánkban és nemzetközi összehasonlításban is:

-Az elsők között vizsgáltuk nagy populáción a megzavart organogenezis indikátorának tartott minor anomáliák előfordulási gyakoriságát egészséges és malignus betegségben szenvedő gyermekeknél. Az eredmények felvetik annak lehetőségét, hogy az organogenezisben szerepet játszó gének és fehérjetermékeik kóros esetben minor anomáliák nagyobb számú kialakulása mellett fokozhatják a tumorképződés kockázatát is. (1.)

-Az elsők között vezettük be egyes immundeficiens állapotokban (CF, egyes malignus hematológiai betegségek) megváltozott gének korszerű, PCR-technikán alapuló molekuláris genetikai vizsgálatát, mely a rutindiagnosztikai lehetőségek mellett alapot adhat későbbi terápiás próbálkozásokhoz is. (2.)

-Anyák tetanusz elleni aktív immunizálásával kapcsolatos nagyszámú vizsgálatunk eredményeinek közlése bizonyító erejű volt a neonatális tetanusz aktív immunizálással történő megelőzésének lehetőségével kapcsolatban. (3.)

-Eldöntő jellegű vizsgálati eredményeket szolgáltatunk az anyai passzív ellanyagok és az aktív immunizálás egymásra hatásáról, melynek a csecsemők aktív immunizálásában van döntő jelentősége. (4.)

-Elsőként közöltük emberen és tengerimalacon végzett aktív tetanusz-immunizálási vizsgálatok alapján az immunológiai válaszadó képesség és az immunológiai memória életkortól és a nemi hovatartozástól függő sajátosságait, különbségeit. (5.)

-Elsőként mutattunk rá arra, hogy az LPS az immunológiai memóriára és válaszadó képességre gyakorolt hatásánál fogva képes a kortól -és nemi hovatartozástól függő "hátrányosabb helyzet" kiküszöbölésére (6.)

Elsőként igazoltuk in vivo, állatkísérletekben, hogy

-Előzetes, az adott vírussal történt aktív immunizálás rontja az onkolitikus virusterápia hatékonyságát. (7.)

-Ez a hatás liposzóma-vektorban a szervezetbe juttatott onkolitikus vírus alkalmazásával kiküszöbölhető. (8.)

-LPS/Lipid-A fokozza az onkolitikus vírusok hatását. (9.)

-Elsőként terjesztettük ki az optimális adjuvancia elvét biológiai eredetű immunmodulánsok mellett a génterápiás vektorként is alkalmazott liposzómákra, amelynek a génterápia effektusának javításában lehet jelentősége. (10.)

Elsők között mutattuk ki melanoma sejtvonalakon

-A tumorok immunrendszerrel szembeni aktív védekezését biztosító "FasL-counterattack" mechanizmus létét. (11.)

-Az apoptózisban szerepet játszó Fas, FasL és Bcl-2 molekulák együttes előfordulását immunhisztokémiai módszerekkel. (12.)

-Ezzel kapcsolatban elsőként publikáltuk azt a felvetést, hogy a melanoma túlélését a neuroblastomához hasonló módon egy "autocrin loop" biztosíthatja (13.)

-Elsőként közöltük, hogy melanoma sejtvonalakon többszöri passzálással a FasL expresszió csökkenhet, megszűnhet, ami magyarázhatja a Fas-counterattack elmélettel kapcsolatosan nemrég fölmerült ellentmondásokat. (14.)

A fenti eredmények, kiegészítve további vizsgálatokkal jelentős hatással lehetnek a melanoma adoptív immunterápiájára.

-Elsőként közöltük a fokozott tumorhajlammal járó Beckwith-Wiedemann szindróma (BWS) és savi szfingomielináz (ASM) defektus együttes előfordulásának esetét. (15.)

Elsőként vettem föl annak lehetőségét, és szolgáltatam adatokat azzal kapcsolatban, hogy

-Az ASM defektusnak a gátolt apoptózis révén szerepe lehet a BWS és a társuló malignus daganatok kialakulásában. (16.)

-Az apoptózisban szerepet játszó ASM gén imprinting szabályozás alatt állhat. -(17.)

-Elsőként sikerült meghatároznunk a 11-es kromoszóma rövid karján az ASM gén (SMPD1) pontos helyét. (18.)

-Megalkottuk és publikáltuk a gyermekkori tumorokban és az apoptózis szabályozásában kiemelkedő jelentőségű emberi 11-es kromoszóma teljes, eddig ismert legrészletesebb térképét, ami hozzájárult a humán genom napokban lezárult feltérképezéséhez. (19.)

Zárszó:

Az értekezésben taglalt lényeges témakörökkel kapcsolatban (immunmodulancia, apoptózis) két alapvető, általunk is vizsgált molekula szerepe mellett nem lehet “szó nélkül” elmenni. Ezek: a Gram negatív baktériumok lipopoliszacharidák (LPS és Lipid A) valamint döntően az eukaryota sejtekben képződő ceramid. Mindkettővel behatóan foglalkoztunk mellékelt közleményeink egy részében.

A Gram negatív baktériumok sejtfalának lipopoliszacharidája (LPS) - illetve annak aktiv hatóanyaga, a lipid-A struktúra-alkotó szerepén kívül számos élettani és patológias történés elindítója a humán szervezetben is, melynek legszélsőségesebb megnyilvánulási formája az endotoxin-sokk.

A ceramid, az eukaryota szervezetekben jelen lévő szfingolipidek vázát alkotó molekula (HAIMOVITZ-FRIEDMAN 1997) meglepően hasonló strukturális és funkcionális sajátosságokat mutat a bakteriális endotoxinokkal. Mindezeket részleteiben WRIGHT ÉS KOLESNICK 1995-ben publikált közleménye taglalja.

Egyre több adat utal arra, hogy mindkét molekula hasonló intracelluláris szignálrendszereket használ. Ezt még a hipotézissel részben vitatkozó közlemények is elismerik (LAKICS, 1998).

Úgy tűnik, mindkét molekula képes TNF alfa, IL-1, UV hatás stb. mellett aktiválni olyan fontos transzkripciós faktorokat, mint az AP-1/ATF illetve az NfkappaB, melyek számos gén regulálásában játsznak szerepet, pl. az IL-1, IL-2, iNOS, TNF, ICAM-1 stb. génekében (HAIMOVITZ-FRIEDMAN 1997, FIRESTEIN 1999). Az LPS aktiválhatja a ceramid-aktivált protein-kinázt (CAPK).

Az LPS receptorokról és az LPS intracelluláris szignálrendszereiről egyik mellékelt közleményünkben olvashatók további részletek (RÉTHY ET AL, 2000).

Érdekesség, hogy a Sphingomonas baktérium genus sejtfaala LPS helyett ceramidot tartalmaz. (WRIGHT 1995) Mindezek az evolúció során konzerválódott molekuláris sajátosságok ősi, alapvető sejtfunkciókra utalnak.

Nem zárható ki, hogy a két immunmoduláns molekula “kiválthatja “ egymást hasonlósága révén, így segíthet a nem kívánt terápiás mellékhatások leküzdésében. Mindezt a jövő feladata tisztázni.

Hivatkozott irodalom:

- Firestein GS, Manning AM: Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. Arthritis Rheum 1999 ;42:609-21
- Haimovitz-Friedman A, Kolesnick RN and Zvi Fuks: Ceramide signaling in apoptosis: Br. Med. Bulletin 1997,53:539-553)
- Lakics V, Vogel SN Lipopolysaccharide and ceramide use divergent signaling pathways to induce cell death in murine macrophages. J Immunol 1998, 161:2490-50
- Réthy, L.A., Báthori, G., Sólyom, F., Kontrohr, T. Réthy L.(2000 a) Liposome entrapped viruses for oncolytic therapy in the presence of antiviral antibodies: Anticancer Res: in press (Értekezésben ld. még a “liposzomák” –rész hivatkozásánál.
- Wright SD, Kolesnick RN : Does endotoxin stimulate cells by mimicking ceramide?(Immunol Today 1995;16:297-302.

Köszönetnyilvánítás:

Köszönetemet fejezem ki **Dr. Géresi Magdolna** osztályvezető állatorvosnak (PHYLAXIA Állami Oltóanyagtermelő Intézet Anaerob Vakcinák Osztálya) őszinte segítségével és azért, hogy osztályán aktívan részt vehettem a kutató-fejlesztő munkában, **Dr. Sólyom Ferenc** víruskutatónak, a Phylaxia Állami Oltóanyagtermelő Intézet Virus-osztálya, később pedig a Bábolnai Állami Gazdaság Biológiai Osztálya igazgatójának a kollaboratív munka lehetőségének biztosításáért. Köszönöm **Prof. Mészáros János** akadémikus úrnak, aki lehetővé tette, hogy a MTA Állatorvostudományi Intézetében **Dr. Magyar Tibor** kandidátus úrral kollaborálhassak. Hálás köszönettel tartozom **Dr. Kontrohr Tivadar** kandidátus úrnak, a Pécsi Orvostudományi Egyetem tudományos kutatójának, valamint **Dr. Báthori György** Ph.D. úrnak, a Semmelweis Egyetem I. sz. Élettani Intézete

(korábban a Biofizikai Intézet) docensének, aki a liposómák vizsgálatába bevezetett. Hálás vagyok a **Human Oltóanyagtermelő és Kutató Intézet Kombineált Oltóanyagtermelő Osztálya munkatársainak**, különösen **Prof. Réthy Lajosnak**, akik korábbi vizsgálati adataik matematikai feldolgozásával megbíztak, s akik ezen túlmenően is lehetőséget biztosítottak az aktív kutatómunka végzésében. Köszönet illeti a **Schuler Dezső** majd **Fekete György, professzorok** vezetése alatt álló **SOTE II. Gyermekklinika** valamennyi volt segítőkéz kollégát, külön megemlítve **Koós Rozália** Docens asszonyt és munkatársait a közös munka lehetőségéért. Köszönöm **Alföldy Lajos** akadémikus úrnak, **Raskó István** professzornak és munkatársainak, hogy a Szegedi Biológiai Központban mintegy háromnegyedéves tanulmányi lehetőséget biztosítottak számomra. **Prof. Gyurkovits Kálmánnak** a mosdói nemzetközi publikációs továbbképzés megszervezését köszönöm, melyen haszonnal vettem részt. **Várad András** professzort (MTA SzBK Enzimológiai Intézete) a PCR gyakorlati elsajátításáért és a géntérképezés alapjainak megismertetéséért, **Dr. Földi Jánost**, az Országos Hematológiai és Immunológiai Intézet tudományos vezetőjét és munkatársait, a minimális reziduális betegség, a chimaera-gének vizsgálatában való kollaborációért illeti köszönetem.

Köszönet illeti **Udo .H. Ehling** professzort és munkatársait a müncheni GSF Institut igazgatóját, **Susan Suter** professzor asszonyt a genfi Egyetemi Gyermekklinika vezetőjét, és mtsait, a tampai St. Joseph Hospital és a Univ. of South Florida **professzorait (Sinkovics József, Szentiványi Andor** és kollégáik), a St. Petersburg-i All Childrens' Hospital, Univ. of South Florida szakembereit, **Robert A. Good** professzor vezetésével, akik külföldi tanulmányutaim során támogatták munkámat.

Hálás köszönettel tartozom **Prof. Patrick Gaudray-nak** a nizzai Egyetem genetika tanszékéről továbbá a 1998-as **nemzetközi 11-es kromoszóma "workshop"** valamennyi munkatársának, akikkel megfeszített, de felejtethetlen munkanapokat töltöttünk a 11-es kromoszóma feltérképezése során. Mindez nem vált volna lehetővé a **budapesti Francia Intézet** által biztosított tudományos ösztöndíj, valamint az Intézet Tudományos Attaséja, **Dr. Dominique Pladys Úr és munkatársai** szervezőmunkája nélkül, melyet ismételtelen nagyon köszönök.

Wolf Reik és Robert Feil professzorok, a cambridge-i (U.K.)Babraham Institute munkatársai nevét az imprintinggel kapcsolatos legújabb kutatások megismertetéséért említem hálával.

Köszönet illeti jelenlegi munkahelyemen, a **Dr. Dizseri Tamás** Főorvos úr vezetése alatt álló Bethesda Gyermekkórházban valamennyi segítőkéz munkatársamat, idértve a nem közvetlen munkatársak közül **rev. Szarka Miklós** Nagytiszteletű urat, **Boda Domokos** Professzor urat, a Szakmai-Tudományos Bizottság vezetőjét valamint az azóta nyugdíjba vonult **Szombathy Gábor** Főorvos urat is, akik kórházi munkámban támogattak. Külön köszönöm a Kórház jelenlegi tudományos főmunkatársának, **Dr Cser Mária Ágnes** Ph.D Főorvos asszonynak a tudományos kutatómunkákhoz nyújtott erkölcsi támogatását, az anyagi források biztosításához nyújtott segítségét.

Végezetül, de nem utolsó sorban hálás vagyok témavezetőmnek, **Kellermayer Miklós** **professzor** úrnak, hogy a Ph.D.-vel kapcsolatos - sokszor még a türelmét is próbára tevő segítséget és támogatásomat felvállalta.

Az értekezésben ismertetett munka nagy részéhez az **OTKA F 5428 ill. az ETT 05-054/99 sz.** alatt nyújtott anyagi támogatást.