Viral Karsinogenezis

Dr. Altan Günalp*

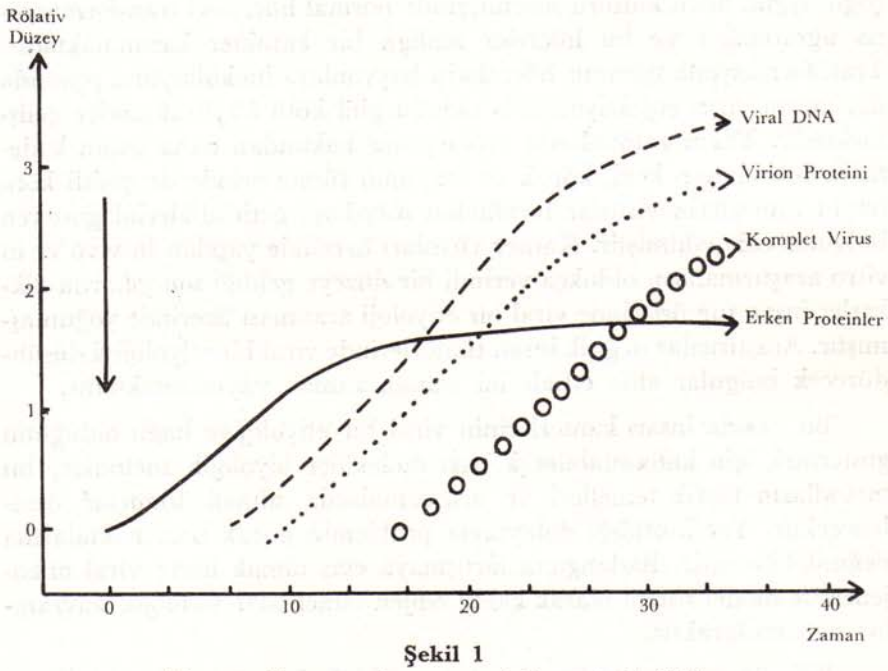
Hayvanlarda önemli sayıya ulaşan tümörlerin viruslar tarafından meydana getirildiği son 50 yıldaki araştırmalarla kesinlik kazanmıştır. Kuş lökoz grubu virusları, Rous virusu, fare ve diğer küçük kemiricilerde tesbit edilen lösemi ve solid tümör etkeni viruslar ve SV40, poliyoma, adenovirus gibi ajanlar uygun deney şartlarında duyarlı hayvanlara verildiklerinde değişen süreler sonunda çeşitli patolojik görünümlere sahip tümörlerin meydana çıkmasına sebep olmaktadır.[1] Sayılan virusların çoğu uygun doku kültürü sistemlerinde normal hücreleri transformasyona uğratmakta ve bu hücreler malign bir karakter kazanmaktadır. Transformasyona uğramış hücrelerin hayvanlara inokülasyonu sonunda da, aynen virus enjeksiyonunda olduğu gibi kötü huylu tümörler gelişmektedir. Yakın zamanlarda evolüsyoner bakımdan daha üstün kademelerde bulunan kedi, köpek ve maymun tümörlerinde de çeşitli kötü huylu tümörlerin viruslar tarafından meydana getirildiklerini gösteren bulgular elde edilmiştir. Kanser virusları üzerinde yapılan in vivo ve in vitro araştırmaların oldukça verimli bir düzeye geldiği son yıllarda dikkatler insan tümörlerinde viral bir etiyoloji aranması üzerinde yoğunlaşmıştır. Araştırıcılar değişik insan tümörlerinde viral bir etiyolojiyi düşündürecek bulgular elde ettiklerini zaman zaman yayınlamaktadır.

Bu yazıda insan kanserlerinin viral bir etiyolojiye bağlı olduğunu göstermek için kullanılabilecek bazı moleküler biyolojik metodlar, bu metodların teorik temelleri ve araştırmalarda alınan sonuçlar özetlenecektir. Yer kısıtlılığı dolayısıyla problemin ancak bazı noktalarına değinilebilecektir. Başlangıçta tartışmaya esas olmak üzere viral onkojenesizte model sistem olarak kabul edilen temel bazı virolojik kavramlar hatırlatılacaktır.

Bilindiği gibi virus-konakçı hücre ilişkileri en iyi, bakteri-bakteriyofaj sistemlerinde çalışılmıştır. Açıkça tesbit edildiği üzere bir bakteriyi enfekte eden faj değişik iki yol izleyebilir.[2] Bunlardan birincisi klasik litik enfeksiyon veya otonom replikasyon siklusudur. Bu siklusta faj, hüc-

* Hacettepe Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Viroloji Profesörü.

re içinde otonom bir üreme göstermekte ve sonunda konakçı hücreyi lizise uğratarak serbest faj şeklinde dışarı salınmaktadır. Bu olayda yer alan adımları Şekil 1 de görmektesiniz. Enfeksiyonun ilk dakikalarında erken protein diye adlandırılan bazı viral menşeli enzimler, repressör moleküller ve diğer bazı protein türleri sentezlenmektedir. Bütün bu proteinlerin görevi konakçı hücre fonksiyonlarını durdurmak ve virus nükleik asidi ve virus kılıf proteinlerinin yapımı için gerekli olan yapı taşlarının sentezidir. Enfeksiyonun daha ileri safhalarında viral nükleik asid replike olmakta ve kılıf proteinleri sentezlenmektedir. Nükleik asit ve protein miktarları belirli bir düzeye erişince komplet virus taneciklerinin montajı başlamakta ve sonunda hücre açılarak tamamlanmış viruslar dış ortama salınmaktadır. Erken proteinler virusun yapısına girmemektedir. Bunlar fonksiyonlarını bitirdikten sonra sahneden çekilmektedir. Bu proteinlere non-virion proteinler adı verilmektedir. Non-virion proteinlerin mevcudiyeti biyokomyasal ve immünolojik metodlarla gösterilebilir.



Şekil 1
Virus replikasyonunda zamansal biyosentetik ilişkiler

Bir hücreyi enfekte eden virusun izleyebileceği ikinci yol lizogenik enfeksiyon siklusudur. Bakteri içine giren virus nükleik asidi konakçı hücre nükleik asidine entegre olmakta ve onunla fiziksel bir bütünlük kazanmaktadır. Bu durumda faj konakçı hücre içinde otonom bir şekilde çoğal-

mamaktadır. Faj kromozomu konakçı hücre kromozomunun bir bölülümü gibi hareket etmektedir. Konakçı hücre kromozomunun her bölünmesinde profaj diye adlandırılan entegre durumdaki faj kromozomu da replike olmakta birer kopya halinde yavru hücrelere intikal etmektedir. Faj kromozomu nesiller boyu, konakçı hücreye ait bir gen bölümü şeklinde taşınmakta ve ortamda serbest faj taneciklerine rastlanmamaktadır. Faj kromozomunun konakçı hücre kromozomuna entegre durumda kalmasını sağlıyan ve bizzat faj kromozomu tarafından şiflenip sentez ettirilen bazı repressör moleküller elde edilmiştir. Bu moleküller faj kromozomunun konakçı kromozomundan ayrılarak otonom yani litik enfeksiyon siklusu başlatmasına engel olmaktadır. Bu repressörlerin bütün lizogenik hayat siklusu boyunca bakteri sitoplazmasında tesbitleri mümkündür. Repressör moleküler ortadan kaldırılacak veya devamlı sentezleri durdurulacak olursa profaj konakçı kromozomundan ayrılır ve lizogenik siklusun sona ermesiyle litik siklus başlatılmış olur. Lizogenik bir bakteri kültüründe serbest fajlara rastlanmaz. Lizogenik bakteri hücresi yeni bazı antijenik özellikler ve değişik proteinler sentezleme yetenekleri kazanır.Bu şekilde bir entegrasyon ve lizogenik siklus DNA fajlarının bir özelliğidir. RNA viruslarının kromozomlarının konakçı hücre DNA sına entegrasyonu söz konusu değilir. Yapılan bütün gözlemler, DNA viruslarıyla meydana getirilen tümörlerde bakteriyel sistemlerdeki lizogenizasyona benzeyen bir durumun varlığını göstermiştir.[3] Benzerlikleri şu şekilde sıralamak mümkündür:

1. Gerek hayvanlarda ve gerekse doku kültürlerinde onkojenik bir DNA virusuyla başlatılan malign hücre transformasyonundan sonra tümör dokusunda veya transforme hücre populasyonunda serbest virusa rastlanmamaktadır.

2. Malign transformasyona uğramış hücrelerde yeni antijenik determinantlar belirmektedir.

3. Virus kromozomu, değişik metodlarla gösterilebileceği gibi, malign transformasyona uğramış konakçı hücrenin kromozomuna entegre durumda bulunmaktadır.

Bu benzerlikler üzerinde biraz durmak metodolojik yönden faydalı olacaktır.

Onkojenik DNA viruslarıyla enfekte edilen normal bir hücre popu-lasyonunda hücrelerin çoğu aynen lizogenizasyonda olduğu gibi litik bir enfeksiyon siklusu sonunda harabedilir. Ancak az sayıdaki hücre malign transformasyona uğrayarak tümör hücresi karakterlerini kazanır. Bu, bilhassa poliyoma, SV40 ve adenoviruslar gibi DNA nükleik asidine sa-

hip onkojenik viruslar için doğrudur. RNA viruslarının konakçı hücre ile ilişkileri üzerinde daha sonra durulacaktır.

Transforme olmuş hücre populasyonu yeni bazı üreme karakterleri kazanır. Pasaj yapılabilir duruma geçerler ve uygun hayvanlara şırınga edildiklerinde tümörlerin gelişmesine yol açarlar. Gerek transforme hücre populasyonunda ve gerekse inokülasyon ile meydana getirilen tümörlerde serbest virus taneciklerine genellikle rastlanmaz. Ancak bazı deneysel yollarla bu hücrelerde virusa ait bazı izler tesbit etmek mümkündür. Normal virolojik yollarla virus ihtiva etmediği saptanan hücrelerin transformasyona sebep olan virusa duyarlı bazı hücrelerle birlikte üretilmeleri sonunda (co-cultivation) transforme hücrelerin pek küçük bir kısmı tarafından sentezlenen komplet virus taneciklerinin izolasyonu mümkün olabilir.[4] Ve yine transforme hücrelerin bazı normal hücrelerle hibridizasyonu sonunda sitoplazmik repressör molekül konsantrasyonunun azaltılmasının bir sonucu olarak kanserleşmiş hücrenin kromozomuna entegre olduğu düşünülen kanser virus kromozomunun litik bir enfeksiyon siklusu başlatmasını sağlamak mümkündür.[5] Bu olay bakteri genetiğinde gayet iyi bilinen zigotik indüksiyon olayının bir analogudur.[6] Bazı mutagenler veya DNA sentezini etkileyen kimyasal maddeler kullanmak suretiyle de kanser hücresi kromozomunda yerleşmiş bulunan virus kromozomunu otonom replikasyon fazına sokmak mümkün olabilir.

Kanser hücresinin kazandığı yeni antijenik özelliklerin yakından incelenmesi de transformasyona yol açan virusun kanser hücresi ile ilişkisinin devamlı olduğu konusunda bazı ip uçları vermektedir. Virusla kanserleştirilmiş hücrelerde özgül tümör antijenlerinin (T antijeni) teşekkül ettiği bilinmektedir. Bu antijenin konakçı hücrede bulunan virus kromozomu tarafından şifrelendiğini düşündüren bulgular mevcuttur. Bilindiği gibi poliyoma ve SV40 gibi viruslar değişik hayvan türlerinde kötü huylu tümörlere yol açabilmektedir. Bu değişik türlerin değişik antijenik yapılara sahip olduğu da bir gerçektir. Ayrıca bu değişik türlerde ve hatta aynı türde, çeşitli kimyasal karsinojenlerin kullanılmasıyla meydana getirilen tümörlerin ortak bir antijenik özelliğe çoğunlukla sahip olmadığı bilinmektedir. Bu verilerin ışığı altında viruslar tarafından meydana getirilen tümörlerin antijenik özellikleri incelendiğinde bazı ilginç noktalar göze çarpmaktadır. Fare, sıçan ve hamster gibi değişik üç türde aynı onkojenik virus tarafından meydana getirilen tümörlerde aynı ortak T antijeni tesbit edilmektedir.[7] Değişik kondisyonel mutant viruslarla meydana getirilen tümörlerde ise tümör hücrelerinin antijenik özellikleri ve diğer tümöral karakterleri ancak virus fonksiyonlarına müsait olan şartlarda ortaya çıkmaktadır. Örneğin ısıya duyarlı bir mutas-

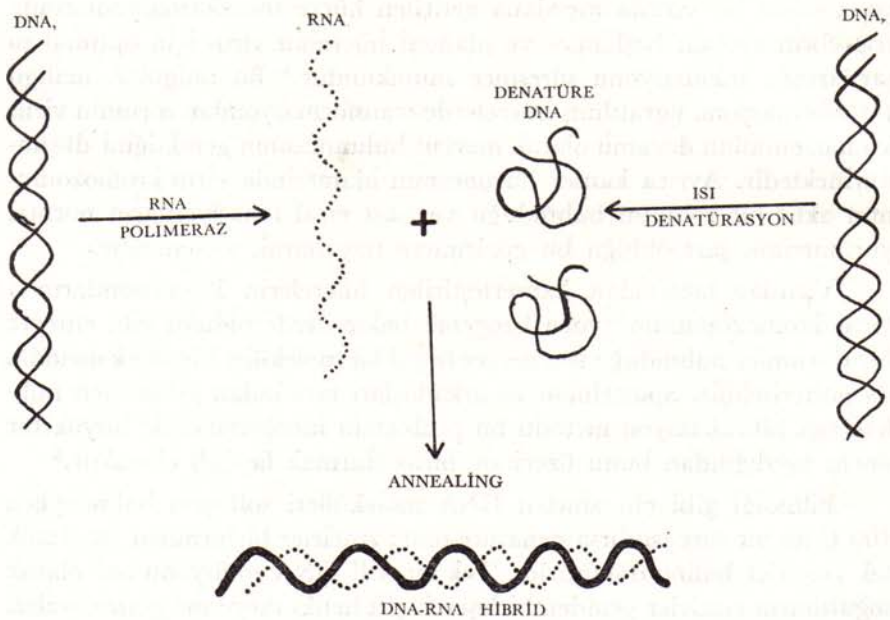
yona sahip bir virusla meydana getirilen hücre transformasyonlarında transformasyonun başlaması ve idamesi hücrenin virus için optimal ısı şartlarında inkübasyonu süresince mümkündür.[8] Bu bulgular malign transformasyona uğratılmış hücrelerde transformasyondan sorumlu virus kromozomunun devamlı olarak mevcut bulunmasının gerektiğini düşündürmektedir. Ayrıca kanser durumunun idamesinde virus kromozomunun aktif bir rolünün bulunduğu ve bazı viral fonksiyonların normal yürümesinin şart olduğu bu gözlemlere dayanarak söylenebilir.

Viruslar tarafından kanserleştirilen hücrelerin kromozomlarında virus kromozomunun aynen lizogenik bakterilerde olduğu gibi entegre bir durumda bulunduğu son derece özgül bir moleküler biyolojik metodla da gösterilebilir. Spiegelman ve arkadaşları tarafından geliştirilen nükleik asit hibridizasyon metodu bu problemin incelenmesinde büyük bir önem taşıdığından bunu üzerinde biraz durmak faydalı olacaktır.[9]

Bilindiği gibi çift zincirli DNA molekülleri solüsyon halindeyken 100°C da bir süre ısıtılırsa denatüre olur; zincirler birbirinden ayrılarak tek zincirler haline dönüşürler. Tek zincirli DNA solüsyonu ani olarak soğutulursa zincirler yeniden birleşerek çift heliks meydana getiremezler. Oysa tek zincirli DNA solüsyonu çok yavaş soğutulacak olursa baz dizilişleri yönünden birbirine komplemanter olan DNA zincirleri yine birleşerek bir çift heliks teşkil ederler; bu işleme DNA renatürasyonu veya annealing denir. Aynı işlem bir RNA molekülünün belirli bir DNA molekülü ile homogluluğunu araştırmak içinde kullanılabilir. Eğer bir RNA molekülü kendisine sentez kalıbı görevi yapan bir DNA molekülün tek zincirleri ile karıştırılır ve karışım 100°C ye kadar ısıtıldıktan sonra yavaş yavaş soğutularak annealing yapılırsa RNA molekülleri kendilerine homolog baz dizileri taşıyan DNA zincirleriyle komplemantarite prensiplerine uygun olarak birleşerek RNA-DNA hibrid yapısında bir çift heliks meydana getirebilir (Şekil 2).

Bu metod hücre kromozomlarında entegre durumda virus DNA sı bulunup bulunmadığını araştırmak üzere araştırıcılar tarafından kullanılmıştır. Şüphelenilen virus DNA sı kalıp olarak kullanılmak üzere E. coli RNA polimerazının katalizlediği reaksiyonla bu DNA ya komplemanter viral RNA sentezlenir. Daha sonra bahis konusu hücrenin DNA sı izole edilerek denatüre edilir ve uygun deneysel şartlarda viral RNA ile karıştırılarak hibridizasyona çalışılır. Bu metodu uygulayan değişik araştırıcılar virusla meydana getirilen tümör hücrelerinin DNA larında etken virus DNA sının entegre durumda bulunduğunu göstermişlerdir.

Bu noktada RNA tümör viruslarının biyolojisine ve konakçı hücre ile ilişkilerine değinmek uygun olacaktır. Bilindiği gibi RNA tümör vi-

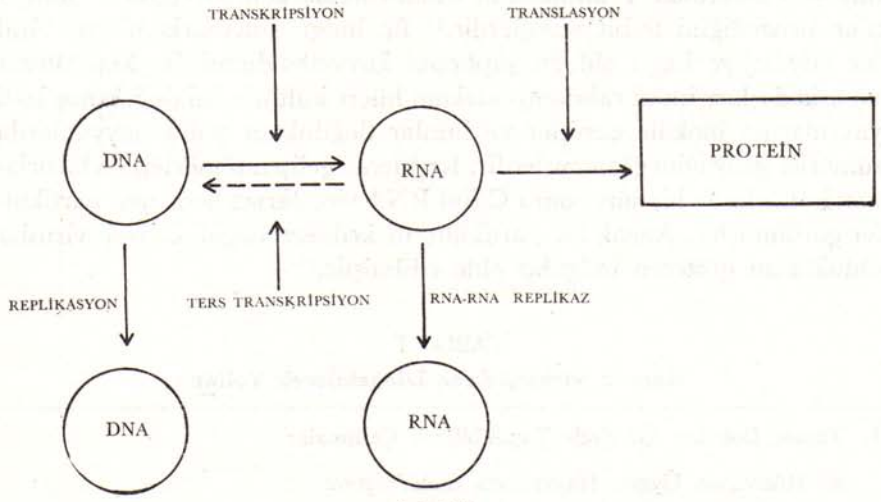


Şekil 2
Nükleik asit hibridizasyon tekniğinin şematik görünümü

rusları hayvanların çoğunda görülen bazı kötü huylu tümörlerin doğal sebebidir. Tabiatta yaygın olarak bulunurlar. Hücre ölümüne sebebiyet vermedikleri gibi kanserleştirdikleri hücreler tarafından çoğunlukla bol miktarlarda sentez edilirler. Yukarda sıralanan bazı deliller DNA viruslarının onkojenik etkisinde konakçı hücre kromozomuna entegrasyonun şart olduğunu belli etmektedir. RNA viruslarının onkojenik etkisinin de aynı yolla olabileceğinden şüphelenilmekle beraber bir RNA molekülünün kovalent bağlarla ve krossover yoluyla konakçı hücre DNA sına entegre olabileceğini düşünmek bu iki molekülün birbirleriyle ilişkileri hakkındaki bilgilerimizle bağdaşmamaktaydı. DNA ve RNA molekülleri arasında herhangi bir krossoverin yer alması ve bu iki molekülün lizogenezasyon modelinde olduğu gibi fiziksel bir bütünlük kazanmaları mümkün görülmüyordu ve buna ait bir örneğe de rastlanmış değildir. Probleme çözüm 1970-1971 yıllarında getirildi.

RNA tümör viruslarının replikasyon ve onkojenik etkilerinin aktinomisin-D ye duyarlı bir faz gerektirdiğinin tesbiti DNA-provirus hipotezinin ortaya atılmasına yol açmıştır. Bu hipoteze göre RNA tümör virusları konakçı hücreye girdikten sonra komplemanter bir DNA çift heliksinin teşkiline yol açmakta ve RNA tümör virusunun bu DNA kopyası konakçı hücre DNA sına entegre olarak onkojenik etkisini meydana

getirmektedir. Ancak bu hipotez 1970 yılına kadar bilinen şekli ile moleküler biyolojik bir temel kavramla çelişki halindeydi. Moleküler biyolojinin 1958 yılında Crick tarafından formüle edilen santral dogmasına göre[10] (Şekil 3) genetik sistemlerde enformasyon akımı DNA dan RNA ya (transkripsiyon) ve RNA dan da protein doğru (translasyon) olmaktadır. Bunun tersi olan yönde bir enformasyon akımı mümkün değildir. Oysa DNA-provirus hipotezi viral RNA molekülü üzerinden DNA sentezini öngörmekle bu dogmaya aykırı düşmüş oluyordu. 1963 yılında Howard Temin[11] Rous sarkomu hücre DNA sında Rous virusu RNA sına



Şekil 3
Santral Dogma'nın şematik açıklanması

komplemanter bölgeler bulunduğunu nükleik asit hibridizasyon metodu ile gösterince dikkatler tümör hücrelerinde RNA kalıpları üzerinden DNA sentezliyecek bir enzimatik aktivite aranması üzerinde yoğunlaştı. 1970 yılında Temin ve Baltimore değişik laboratuvarlarda çalışarak RNA tümör viruslarında ve bu virusla kanserleştirilmiş hücrelerde RNA kalıpları üzerinden komplemanter çift heliksli DNA sentezliyen bir enzim aktivitesi tesbit ettiler.[12, 13] Bu enzim DNA dan RNA yönüne olan transkripsiyon işleminin tersini katalizlediğinden revers transkriptaz veya RNA'ya bağlı DNA polimeraz olarak adlandırıldı. Bu iki araştırıcının bulguları kısa zamanda diğer birçokları tarafından doğrulandı ve genişletildi. Böylelikle bir enzimatik aktivite ilk defa olarak onkojenik virusların mevcudiyeti için sağlam bir kriter olarak ortaya konmuş oldu.

Bu genel mülahazalardan sonra insan tümörlerinde viral bir etiyoloji aranması için izlenecek metodları ve alınan sonuçları incelemeye başlayabiliriz.

Tablo I de görüldüğü gibi insan tümörleriyle yapılabilecek çalışmalarda birkaç yol izlenebilir. Hastalardan elde edilen tümör dokuları değişik amaçlar için kullanılabilir. Bu tümörlerden elde edilecek hücreler veya hücrelerin filtratları uygun deney hayvanlarına inoküle edilebilir. Bu metod ufak kemiricilerde kuşlarda ve diğer bazı hayvanlarda olumlu sonuçlar alınmasına yardım etmiştir. Ancak insan tümörlerinin kullanılmasıyla yapılan deneylerde alınan sonuçlar pek mahduttur. Son zamanlarda Pritchard ve arkadaşları osteosarkom dokularının filtratlarının hamsterlere inokülasyonu ile bazı tümörler meydana getirebil miş ve bunlardaki T antijeninin insan osteosarkomlarındaki T antijenine benzediğini tesbit etmişlerdir.[14] Bu bulgu osteosarkomların viral bir etiyolojiye bağlı olduğu şüphesini kuvvetlendinmiştir. MacAllister ve arkadaşları insan rabdomyosarkom hücre kültürlerini doğmamış kedi yavrularına inoküle etmişler ve bunlar doğduktan sonra hayvanlarda tümörler geliştiğini gözlemişlerdir. Kedilerde gelişen tümörlerden hazırlanan kültürlerde bir süre sonra C tipi RNA viruslarına benzeyen partiküller görülmüştür. Ancak bu partiküllerin kedilere özgül C tipi viruslar olduklarını gösteren bulgular elde edilmiştir.[15]

TABLO I

Kanser Virolojisinde İzlenebilecek Yollar

1. Tümör Dokuları Üzerinde Yapılabilecek Çalışmalar
   - A) Hücrelerin Uygun Hayvanlara İnokülasyonu
   - B) Hücre Süspansiyonlarının Uygun Hayvanlara İnokülasyonu
   - C) Uygun Doku Kültürlerine İnokülasyonlar
   - D) Tümör Hücre Kültürleri Hazırlanması
   - E) Tümör Dokularında İmmünofluoressans Çalışmaları
   - F) Tümör Dokularında Elektron Mikrokopi Çalışmaları
   - G) Tümör Dokuları Üzerinde Enzim Çalışmaları
2. Hasta Serumları İle Yapılabilecek Çalışmalar
   - A) İmmünofluoressans ve Diğer İmmünolojik Çalışmalar
   - B) Uygun Canlı Sistemlere İnokülasyon

İnsan tümör dokularında yapılacak doku kültürlerinde çalışma imkânları daha fazladır. Bu tümörlerden hazırlanacak uzun süreli kültürler immünolojik ve biyokimyasal çalışmalar için kullanılabilir. Bu konuda aşağıda daha geniş biligi verilecektir.

İnsanlardan elde olunan serumlarla yapılacak çalışmalar nisbeten kısıtlıdır. Gerçi bazı hayvanlarda serumda bol miktarlarda onkojen viruslar gösterilmiş ve serum inokülasyonu ile tümörlerin nakli mümkün olmuştur. Ancak bu metodun insan tümör viruslarının tesbitinde faydalı olabileceği şüphelidir. Buna mukabil insan serumları immünolojik çalışmalarda çok faydalı olabilir.

Belli bir onkojenik virusun kimyasal karsinojenlerin aksine hangi tür veya fertte olursa olsun özel tümör antijenleri belirmesine yol açması bu alandaki araştırmalar için oldukça güvenilir bir metodolojik kolaylık yaratmıştır. Değişik şahıslarda görülen belirli bir kanser tipinde ortak tümör antijenlerinin bulunması o tümör tipi için viral bir etiyolojiden şüphelenmede yeterli bir delil gibi görünmektedir. Bu amaçla değişik hastalardan tümörler toplanarak doku kültürleri kurulabilir veya doğrudan doğruya kanser dokusunun kriyostat kesitleri alınarak immünofluoressans incelemesine tabi tutulabilir. Hasta serumlarında diğer hastalardan elde edilen tümör hücrelerine karşı antikorlar bulunup bulunmadığı değişik metodlarla araştırılabilir. Böylece farklı şahıslardan alınan muhtelif tip tümör hücrelerinde ortak antijenler tesbit edildiği son yıllarda yayınlanmıştır. Örneğin Henle ve arkadaşları Burkitt tipi lenfomalarda ortak bir antijen varlığını immünofluoressans metodu ile göstermişlerdir.[16] Wood ve Morton.[17] değişik insan sarkomlarında sitotoksisite testi vasıtasıyla ortak bir antijen varlığını gösteren bulgular elde etmişlerdir. Eilber ve Morton kompleman fiksasyon testi[18], Reilly ve arkadaşları[19] ve Priori ve arkadaşları[20], immünofluoressans metodu ile osteosarkom ve diğer bazı sarkom tiplerinde ortak bir antijenik determinant bulunduğunu ortaya koymulardır. Bu araştırıcılar % 50 ve % 100 arasında değişen sıklıklarda osteosarkom hücrelerinin hasta serumlarıyla reaksiyon verdiklerini tesbit etmişlerdir. Bir şahıstan alınan osteosarkom dokularının diğer osteosarkomlu hastaların serumları ile de reaksiyon verdiği gözlenmiştir. Ayrıca hastaların yakınlarında da yanı tümör hücrelerine karşı dikkati çeken bir sıklıkta antikorlar bulunmuştur. Priori ve arkadaşları meme kanserlerinde de ortak antijenler bulunduğunu immünofluoressans ile göstermişlerdir.[21] Giraldo ve arkadaşları immünofluoressans ile bu bulguları doğrulamışlar ve ayrıca tümör kültürlerinden elde edilen filtratların normal insan doku kültürü hücreleri üzerinde onkojenik viruslarınkine benzeyen fakat geçici olan bir transformasyon etkisi gösterdiklerini saptamışlardır.[22]

Tablo II de değişik moleküler biyolojik metodların uygulanabileceği durumlar gösterilmektedir.

Nükleik asit hibridizasyon metodu ehil ellerde yukarıda kısaca değinildiği gibi tatminkâr ve ilginç sonuçlar vermektedir. Elde olunan bazı bil-

TABLO II

Moleküler Biyolojik Metodların Kullanılabileceği Viral Onkoloji Çalışmaları

1. Nükleik Asid Hibridizasyon Metodları
2. Hücre Hibridleri Teşkili Yoluyla Endüksiyon Çalışmaları
3. Hücre ve Dokularda Revers Transkriptaz Aktivitesi Aranması
4. Tümör Hücrelerinde Değişik viruslar Tarafından Sentezlenmesi Muhtemel "Erken Proteinler" Aranması
5. Yardımcı (Helper) Viruslar Kullanarak Yapılacak Endüksiyon Çalışmaları
6. Değişik Mutagen ve Endüktörler Kullanarak Yapılacak Virus Endüksiyon Çalışmaları
7. Diğer Metodlar

gileri kısaca özetlemek faydalı olacaktır. 1963 yılında Temin, Rous sarkomu hücrelerinin DNA sında Rous virusu RNA sına homolog DNA bölümlerinin mevcut olduğunu bu yolla göstermiştir.[11] 1972 de Spiegelman ve arkadaşları revers transkriptaz aktivitesi tesbit ettikleri insan meme kanseri dokularında fare meme kanseri virusu RNA sına homolog RNA molekülleri bulunduğunu göstermişlerdir. Normal meme dokularında bu RNA molekülleri bulunmamıştır.[23] Spiegelman, insan meme kanserinin Bittner virusuna benzeyen bir ajan tarafından meydana getirildiğini ileri sürmektedir. Zur Hausen 1972 de bazı insan lenfoblastoid hücrelerinde Epstein-Barr virusu DNA sına homolog DNA bölümleri bulunduğunu göstermiştir.[24] Onkojenik viruslardan poliyoma ve SV 40 ile indüklenen tümör dokularında veya transformasyona uğratılan hücre DNA sında virus DNA sına komplemanterite gösteren bölgeler saptanmıştır.[3] Tümör hücrelerinde viruslar için özgül mRNA lar aranmasıda hibridizasyon metodu ile mümkün olmuştur.

Onkojenik viruslar aranmasında diğer bir metod kanser hücresi DNA sında entegre durumda bulunduğu varsayılan bir virusun otonom replikasyon siklusu başlatmak üzere indüksiyonudur. Bu indüksiyon işlemi çeşitli yollarla gerçekleştirilebilir. Yukarıda bahsedildiği gibi virusun litik etkisine duyarlı hücrelerle kanser hücrelerinin birlikte kültürleri kanser dokusunda pek az miktarlarda bulunması muhtemel serbest virus taneciklerinin teşhisini kolaylaştırılabilir. Sabin ve Koch 1963 yılında SV40 ile transformasyona uğratılmış hamster hücrelerini maymun böbreği hücre kültürleri ile birlikte üreterek hamster hücrelerinde çok düşük bir sıklıkla sentezlenen SV40 viruslarının mevcudiyetini göstermişlerdir.[4] Keza, Gerber ve Koprowski ve arkadaşları karışık kültür metodunu kullanarak SV40 ile transforme edilmiş değişik hücre kültürlerinde virus üremesini indüklemeğe muvaffak olmuşlardır.[25, 26] Buna benzer diğer bir metod inaktive edilmiş Sendai virusu yardımı ile kanser

hücrelerini normal hücrelerlerle füzyona götürmek ve böylece entegre durumdaki viral genomun hücre kromozomundan ayrılarak otonom replikasyona başlamasını sağlamakdır. Cassingena ve Tournier SV40 ile transforme edilmiş suriye hamsteri hücre klonlarını BS-CI maymun böbreği hücre suşu ile füzyona sokmuşlar, böylelikle hamster hücrelerinin DNA sında entegre durumdaki virusun aktif hale geçmesini sağlamışlardır.[5]

Karışık kültür veya hücre hibridleri metodu insan kanser hücrelerini incelemek için de kullanılabilir. Ancak bu metodun uygulanması ile elde olunmuş anlamlı bir sonuç henüz literatürde görünmüş değildir.

Kanser virusu indüksiyon için kullanılabilecek diğer bazı metodları da bu arada saymak doğru olur. Bazı mutagenler veya UV irradiyasyonunun, ısı değişikliklerinin lizogenik indüksiyonda etkili oldukları bilinmektedir. Son yıllara kadar bu ajanların kullanılması ile kanser virusu çalışmalarında müsbet bir sonuç alınamamış idi. Ancak son zamanlarda Klement ve arkadaşları[27] virustan arı sıçan hücre kültürü suşlarını 5- bromodeoksiüridin ile muamele ederek bir virus indüksiyonunu sağlamışlardır. Ancak bu virusun onkojenik potansiyeli üzerinde bir şey söylemek için vakit henüz erkendir.

Kanser virusu indüksiyonunda diğer bir metod da yardımcı virusların kullanılmasına dayanmaktadır. Bu metodun teorik temeli şu şekilde özetlenebilir. Bazı virusların onkojenik etkisinin bunların defektif oluşları ile yakından ilgisi bulunduğu şüpheleri mevcuttur. Buna en iyi örnek Rous virusudur. Bir bakıma, defektif oluşun, otonom replikasyonun başarılamaması dolayısı ile hücre kromozomuna entegrasyonu kolaylaştırdığı düşünülebilir. Bu durumda kromozoma entegre olan virus herhangi bir indüktörün etkisi ile tek başına hiçbir zaman otonom replikasyonu başlatamayacak ve yürütemiyecektir. Ancak hücre içine defektif virusun yapamadığı bazı viral fonksiyonları yerine getirecek diğer bir virus, yardımcı virus sokulacak olursa defektif virusun otonom üremesi sağlanabilir. Buna en iyi örnek Rous virusudur. Hanafusa ve arkadaşları Rous virusunun defektif bir virus olduğunu ve ancak kuş lökoz grubuna dahil RAV ve RIF gibi virusların yardımı ile replike olabileceğini tesbit etmişlerdir.[28] Bu nedenle viral bir onkolojik etken arandığında bazı durumlarda yardımcı viruslar denenmesinin faydalı olması mümkündür. Son zamanlarda ortaya atılan Onkojen Teorisi de normal hücrelerin çoğunda latent veya defektif virus genomlarının bulunduğunu ve bunların değişik yollarla indüklenebileceğini ileri sürmektedir.[30]

Onkojenik virusların aranmasında en güvenilir yollardan birisi de kanser dokularında veya bu dokulardan hazırlanan hücre kültürlerinde revers transkriptaz aktivitesi aranmasıdır. Buna ait örneklere hayvan

tümörleri üzerinde yapılan çalışmalarda bol miktarda rastlanmaktadır. Kanserojen olduğu bilinen fare, kuş kedi ve diğer hayvanlara ait C tipi RNA viruslarının hemen hepsinde revers transkriptaz aktivitesi tesbit edilmiştir. Onkojenik olmadıkları sanılan Visna ve progressiv pneumonia gibi bazı viruslarda ise bir tarama çalışması sonunda revers transkriptaz aktivitesine rastlandıktan sonra bu virusların doku kültürü sistemlerinin de transformasyon meydana getirme yetenekleri olup olmadığı araştırılmıştır. Gerçekten de bu virusların transformasyon yeteneğine sahip bulundukları ve muhtemel onkojen ajan adayı oldukları anlaşılmıştır.[29] Bazı insan lösemi hücrelerinde de revers transkriptaz aktivitesi gösterilmiştir. Spiegelman ve arkadaşları gerek insan meme kanseri dokularında ve gerekse bu dokuların ifrazlarından elde edilen ve Bittner fare meme kanseri virusuna benzeyen partiküllerde revers transkriptaz aktivitesinin bulunduğunu tesbit etmişlerdir. Bu bulgular lösemilerde ve meme kanserlerinde viral bir etiyolojik ajanın rol oynamasının büyük bir ihtimal dahilinde olduğunu düşündürmektedir.

Daha yakın zamanlarda Sabin ve arkadaşları değişik bir metod uygulayarak herpesvirus hominis tiplerinin değişik insan kanserleri ile ilişkisine ışık tutmuşlardır.[31] Sabin ve arkadaşları lizogenizasyon modeline uygun olarak kanser hücrelerinde entegre bir durumda bulunduğu varsayılan herpesvirus kromozomunun otonom replikasyona geçmesini engelliyen ve bizzat virus tarafından şifrelenen bazı non-virion repressör moleküllerin bulunacağı düşüncesinden hareket etmişlerdir. Bu moleküller herpesvirus hominis tarafından çeşitli hücrelerde meydana getirilen litik enfeksiyonun ilk birkaç saatinde de sentezlenmektedir. Bu bilgilerin ışığı altında Sabin ve arkadaşları herpesvirus ile enfekte edilen normal doku kültürü hücrelerini henüz virus nükleik asiti ve kılıf proteinlerinin sentezi başlamadan ekstraksiyona tabi tutmuşlar ve böylece non-virion erken protein moleküllerinin bulunduğu bir preparat hazırlamışlardır. Bilindiği gibi erken proteinler yani non-virion proteinler antijenik özelliklere sahiptir ve bu özellikler kılıf proteinlerinin antijenik özelliklerinden farklıdır. Non-virion proteinler ihtiva eden hücre ekstrelerinin kobaylara inokülasyonu ile erken proteinlere karşı bir antiserum hazırlanmış ve bu antiserum uygun absorbsiyon işlemlerine tabi tutularak hücresel proteinlere ve virus kılıf proteinlerine özgül antikorlardan arıtılmıştır. Bu antiserumun herpesvirus hominis erken proteinlerine özgül olduğu kompleman fiksasyon testleriyle tesbit edildikten sonra değişik kanserlere musab hastaların serumlarında, basit herpesvirus enfeksiyonu olan kişilerin ve normal şahısların kanlarında bu non-virion herpesvirus proteinlere karşı antikorlar bulunup bulunmadığı araştırılmıştır. Alınan sonuç son derece ilginç olmuştur. Normal şahısların ve herpes virus

enfeksiyonlarına yakalanmış şahısların serumlarında non-virion antijene karşı antikor bulunmadığı halde ürogenital sistemin değişik kanserlerine musab hastaların hemen hepsinin serumlarında non-virion herpesvirus antijeni için özgül antikorlar tesbit edilmiştir.

Sabin ve grubunun metodu değişik viruslar için ve değişik şekilleri ile uygulandığı takdirde daha ilginç sonuçların alınması mümkündür. Kanserli hastaların serumlarından farklı virus için hazırlanmış non-virion antijenlere karşı antikorlar aranabilir veya değişik kanser dokularında şüphelenilen virusların erken non-virion proteinlerine karşı hazırlanmış antiserumlar kullanılmak suretiyle o viruslara ait erken proteinler bulunup bulunmadığı incelenebilir.

Sonuç olarak, insan kanserlerinin etiyolojisi ve bilhassa viruslarla ilgisi hakkındaki bilgilerimiz gözden geçirildiğinde araştırma ve metodların henüz emekleme çağında bulundukları söylenebilir. Ancak son yıllardaki hızlı metodolojik ve teknik ilerlemeler kanser probleminin çözümünde önemli adımlar atılmasının yakın olduğu izlenimini bırakmaktadır. Problemin epidemiyolojik immünolojik ve biyolojik yönlerinin sentezci bir görüşle birlikte ele alınmaları şimdiden ilginç sonuçlara varılmasını sağlamıştır. Ümid edilebilir ki önümüzdeki yıllarda ve belki de yüzyılımızın sona ermesinden önce değişik ülkelerde aynı amaçla çalışan binlerce bilim adamının çabalarının olumlu yönde gelişmesi ve insanlığı tehdit eden en büyük tehlikelerden birisi olarak beliren kanser ve benzeri hastalıkların kontrol altına alınması mümkün olacaktır.

Teşekkür

Metindeki Şekilleri Çizen Sayın Teknik Ressam İnci Kalyon'a Çok Teşekkürler

KAYNAKLAR

1. L. Gross (1970) .Oncogenic Viruses. Pergamon Press, New York.
2. S. L. Luria ve J Darnell (1967). General Virology. John Wiley and Sons Inc. New York.
3. M. Green (1970) Oncogenic Viruses. Ann. Rev. Biochem.
4. A. Sabin ve M. A. Koch (1963). Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **49:** 304.
5. R. Cassingena ve P. Tournier (1968). C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Paris Se . D, **267:** 2251.
6. W. Hayes (1968) .Genetics of Bacteria and their Viruses. John Wiley and Sons Inc. New York.
7. K. Habel (1969). Advances in Immunology, **10:** 229.
8. R. Dulbecco (1969) Science, **166:** 962.
9. D. Gillespie ve S. Spiegelman (1965). J. Mol. Biol. **12:** 829.

10. F. H. C. Crick (1958) Symp. Soc. Exptl. Biol. 138.
11. H. Temin (1964). Nat. Cancer Inst. Monogr. **17:** 557.
12. H. Temin ve S. Mizutani (1970). Nature (London) **226:** 1211.
13. D. Baltimore (1970). Nature (London) **226:** 1209.
14. D. Pritchard (1971). Nature (Lodndon) **234:** 126.
15. R. M. McAllister et al. (1972). Nature New Biology (London) **235:** 3.
16. G. Henle ve W. Henle (1966). J. Bacteriology, **91:** 1248.
17. W. C. Wood ve D. L. Morton (1971). New Eng. J. Med., **284:** 569.
18. F. R. Eilber ve D. L. Morton (1970)., Cancer, **26:** 588.
19. C. A. Reilly et al. (1972). Cancer, **30:** 603.
20. E. S. Priori et al. (1971). J. Nat. Inst. Cancer, **46:** 1299.
21. E. S. Priori et al. (1971). Cancer, **28:** 1462.
22. G. Giraldo et al. (1971). J. Exp. Med., **133:** 454.
23. S. Spiegelman (1973). Molecular Probes for the Etiology of Human Cancer. 9. International Congress for Biochemistry, Stockholm, İsveç.
24. H. zur Hausen et al. (1972). Nature (London), **237:** 189.
25. P. Gerber (1966). Virology **28:** 501.
26. H. Koprowsky et al. (1967). Proc. Nat. Acad. Sci. USA., **58:** 127.
27. V. Klement et al. (1971). Nature (London) **234:** 12.
28. H. Hanafusa et al. (1963). Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **49:** 572.
29. S. Takemoto et al. (1971). J. Virology, **7:** 770.
30. R. S. Huebner at al. (1970). Proc. Nat. Acad. Sci. USA., **67:** 366.
31. A. Sabin (1973). Viruslar ve Kanser. Çocuk Felci ve Diğer Virus Hastalıkları Kongresi, Ankara.