



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för anatomi, fysiologi
och biokemi

Det onkolytiska parvoviruset H-1PV

Tumörsupprimerande mekanismer

Cecilia Lefverman

*Uppsala
2015*

Kandidatarbete 15 hp inom veterinärprogrammet

Kandidatarbete 2015:16

Det onkolytiska parvoviruset H-1PV

Tumörsupprimerande mekanismer

The oncolytic parvovirus H-1PV

Tumor-suppressing mechanisms

Cecilia Lefverman

Handledare: *Eva Hellmén, institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi*

Examinator: *Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Kandidatarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: grund nivå, G2E

Kurskod: EX0700

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2015

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen / Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Delnummer i serie: Kandidatarbete 2015:16

Nyckelord: *H-1PV, Rodent protoparvovirus 1, viral tumörsuppression*

Key words: *H-1PV, Rodent protoparvovirus 1, viral tumor suppression*

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt.....	3
Virusklassificering och värdjursspektrum.....	3
Virusstruktur och genom.....	4
Onkotropism.....	4
Cytotoxicitet och celledöd	5
Immunförsvarsaktivering	7
Prekliniska och kliniska försök	8
Diskussion	9
Literaturlista	10

SAMMANFATTNING

H-1 parvovirus (H-1PV) är ett autonomt onkolytiskt parvovirus. Dess naturliga värdjur är råttor, men det kan även infektera andra vertebrater. H-1PV kan tas upp av alla celler men är endast skadligt för prolifererande celler i neonatala djur och tumöromvandlade celler. Vid infektion av tumörceller kan tumörsupprimerande mekanismer genereras. Dessa kan vara direkt cytotoxiska och celldödande, eller indirekta genom att aktivera viralt eller tumörspecifikt immunsvaret. Under de senaste två decennierna har många framgångsrika prekliniska studier genomförts men de tumörsupprimerande mekanismerna för H-1PV är ännu långt ifrån klarlagda. Den här litteraturstudien syftar till att beskriva några av de egenskaper och mekanismer som är av betydelse för H-1PVs tumörsuppression.

Grundförutsättningen för H-1PVs tumörsupprimerande effekt är dess onkotropism, det vill säga att virusets livscykel gynnas av den cellulära miljön som råder i tumörceller. Vid viral replikation och produktion av virala proteiner induceras cytotoxiska mekanismer. Dessa mekanismer varierar mellan olika celltyper. Exempel på cytotoxiska mekanismer som observerats i H-1PV-infekterade tumörceller är cellcykelarrest, aktivering av kaspaser, ackumulering av reaktiva syreföreningar och ackumulering av lysosomala enzymer. Exempel på H-1PV-inducerad immunförsvarsaktivering är aktivering av dendritiska celler och NK-celler (natural killer cells).

Hitintills har H-1PV-forskningen fokuserat på behandlingsmöjligheter för humana tumörer, men då andra däggdjur i likhet med människa saknar tidigare antiviral immunitet för H-1PV och har stora fysiologiska likheter med människan är det inte orimligt att anta att H-1PV kan vara en kandidat för tumörbehandling även inom veterinärmedicinen. Exempel på humana tumörtyper som svarat väl på H-1PV-infektion är glioblastoma multiforme, hepatom, lymfom, melanom, och carcinom i pankreas, bröst, mage, colon och cervix. År 2011 inleddes den första kliniska studien för H-1PV. Den studien pågår ännu och syftar till att studera säkerheten och effektiviteten av H-1PV som behandling mot progressiv glioblastoma multiforme. Den främsta fördelen med H-1PV gentemot befintliga behandlingsalternativ är att H-1PV inte ger några biverkningar. Det finns anledning att tro på H-1PV som ett framtida behandlingsalternativ mot tumörer, men än finns mycket kvar att lära om viruset.

SUMMARY

Parvovirus H-1 (H-1PV) is an autonomous oncolytic parvovirus. Its natural host is rat, but it can also infect other vertebrates. Cellular virus uptake is possible for all cells but virus infection is only harmful for transformed cells and proliferating cells in neonatal animals. Infection of transformed cells can induce tumor suppressing mechanisms. These mechanisms consist of intracellular cytotoxic mechanisms, induced cell death, and activation of antiviral and tumor specific immunity. During the last two decades pre-clinical studies with promising results have been performed, however there is still much to be clarified about the tumor suppressing properties of H-1PV. This bachelor thesis aims to describe some of the tumor suppressing mechanisms that so far have been indicated for H-1PV.

The first reason for the tumor suppression of H-1PV is that H-1PV is oncotropic, which means that the intracellular environment in transformed cells is in favor for the viral life cycle. Viral replication and production of viral proteins induces cytotoxic mechanisms. These mechanisms vary among different cell types. Examples of cytotoxic mechanism that have been observed in H-1PV-infected tumor cells are cell cycle arrest, activation of caspases, accumulation of reactive oxygen species and accumulation of lysosomal enzymes. Examples of H-1PV-induced activation of the immune system are activation of dendritic cells and natural killer cells.

So far the research of H-1PV has been focusing on treatment of human tumors, and since other mammals have much the same physiology as humans and in similarity to humans lack preexisting antiviral immunity for H-1PV, it is likely that H-1PV can become a candidate as a antitumor therapy also within the field of veterinarian medicine. Examples of human tumors in which H-1PV has proved efficiency in pre-clinical studies are glioblastoma multiforme, hepatoma, lymphoma, melanoma, and pancreatic, mammary, gastric, colon and cervical carcinoma. In 2011 the first clinical trial for H-1PV was launched. That study is still ongoing and aims to find out about the safety and efficacy of H-1PV-treatment for patients with recurrent glioblastoma multiforme. The uppermost advantage of H-1PV compared to other existing therapies is that H-1PV is non-pathogenic. With further studies it is not unlikely that H-1PV will take a role as an alternative antitumor therapy.

INLEDNING

H-1 parvovirus (H-1PV) är ett parvovirus tillhörande arten *Rodent protoparvovirus 1* (RoPV1) (Cotmore *et al.*, 2014). RoPV1 har gnagare som naturliga värdjur men kan även infektera andra vertebrater. RoPV1 är autonoma onkolytiska virus som, med undantag av celler i neonatala djur, är harmlösa för värdjurets icke-tumöromvandlade celler (Cotmore & Tattersall, 1987). Det RoPV1-virus vars virala mekanismer är mest kartlagda är minute virus of mice (MVM) (Marchini *et al.*, 2015). MVM är typviruset för RoPV1 och har stora genomlikheter med H-1PV, varför det är rimligt att anta att virala mekanismer som visas hos MVM också finns hos H-1PV, om än med vissa skillnader (Rhode & Paradiso, 1983).

En faktor som ökar chansen för H-1PVs tumörsupprimerande effekt är att värdjuret sedan tidigare inte utvecklat antiviral immunitet mot H-1PV. H-1PVs tumörsupprimerande effekt beror så väl på virusets direkta cytotoxiska och onkolytiska effekt på tumörceller, som på aktivering av viralt och tumörspecifikt immunsvär. H-1PV har, ur behandlingssynpunkt, gett lovande resultat i prekliniska studier för ett flertal olika tumörtyper, däribland glioblastoma multiforme, Burkitts lymfom och cervicalt carcinom (Marchini *et al.*, 2015).

Den här kandidatuppsatsen syftar till att beskriva några av de egenskaper och mekanismer hos H-1PV som är av tumörsupprimerande betydelse. Avslutningsvis presenteras ett par exempel av aktuella prekliniska och kliniska studier för H-1PV som tumörbehandling.

MATERIAL OCH METODER

Det här är en litteraturstudie baserad på artiklar funna i databaserna Pub Med och Web of Science. Sökordet som användes var "H-1PV". Artiklar hittades även via referenslistor i artiklar funna vid sökning på sökordet "H-1PV" i de två databaserna.

LITTERATURÖVERSIKT

Virusklassificering och värdjursspektrum

H-1 parvovirus (H-1PV) tillhör arten *Rodent protoparvovirus 1* (RoPV1), som ingår i genuset protoparvovirus. Protoparvovirus tillhör subfamiljen *Parvovirinae*, som är en av två subfamiljer till *Parvoviridae* (Cotmore *et al.*, 2014). Virus tillhörande *Parvovirinae* kan infektera vertebrater. Det naturliga värdjuret för H-1PV är råtta, men det kan även infektera och föröka sig i andra djurslag, inklusive människa (Cotmore & Tattersall, 1987).

Virusstruktur och genom

Viruspartikeln, som är omkring 25 nm i diameter (Marchini *et al.*, 2015), är naken och kapsiden är en ikosaeder (Siegl *et al.*, 1985). Genomet hos H-1PV är linjärt enkelsträngat DNA med en längd av 5,176 kilobaspar (Rhode & Paradiso, 1983). Genomet består av två överlappande transkriptionenheter, en som kodar för strukturella proteiner (PV), det vill säga de proteiner som kapsiden består av, och en som kodar för icke-strukturella proteiner (NS), det vill säga de proteiner som interfererar med värdcellsphysiologin för att ställa om den till att gynna viruset (Rhode & Paradiso, 1983). Generna för PV är lokaliserade i 5'-ändan av genomet och deras uttryck drivs av promotorn P38. Generna för NS är lokaliserade i 3'-ändan av genomet och deras uttryck drivs av promotorn P4 (Pintel *et al.*, 1983). H-1PV har tre strukturella proteiner, VP1, VP2 och VP3, där VP2 är en mindre version av VP1 och VP3 är en mindre version av VP2 (Siegl *et al.*, 1985). Bland de icke-strukturella proteinerna är NS1 det största och viktigaste, därutöver finns tre splitvarianter av NS2 samt det lilla regulatoriska proteinet SAT (small alternatively translated protein) (Nüesch *et al.*, 2012).

Onkotropism

H-1PV kan tas upp av alla celltyper, så väl tumöromvandlade som icke-tumöromvandlade. Upptaget sker via klattrinmedierad endocytos, men någon specifik receptor har ännu inte identifierats. Studier har dock visat att cellytemolekylen sialinsyra är viktig för virusets cellmembranigenkännande och inträde i cellen (Marchini *et al.*, 2015). Onkotropismen beror istället på att det virala genomet endast kan replikeras när värdcellen befinner sig i S-fas (Deleu *et al.*, 1999), och att denna replikation uppregleras av specifika onkoproteiner (Cornelis *et al.*, 2006). Den främsta anledningen till att virusreplikationen är S-fas-beroende är att konverteringen av det enkelsträngade virala DNA:t till den dubbelsträngade replikativa formen är strikt beroende av cyklin A, ett cellcykelreglerande protein som börjar produceras först när cellen ska gå in i S-fas (Cornelis *et al.*, 2006).

Ett onkoprotein som uppreglerar den virala replikationen är Ras, som i aktiverat tillstånd triggar en stor mängd cellulära signalvägar, däribland signalvägen MAPK (mitos-activated protein kinase). MAPK-kaskaden aktiverar transkriptionsfaktorer tillhörande Ets-familjen och ATF/CREB-familjen, vilka är involverade i reglering av bland annat cellproliferation. De aktiverade transkriptionsfaktorerna binder till specifika ställen på P4, varvid det virala genuttrycket av NS1 och NS2 ökar (Cornelis *et al.*, 2006). NS1 uppreglerar i sin tur P4 och transaktiverar P38, varvid generna för kapsiden börjar uttryckas (Hanson & Rhode, 1991).

H-1PVs onkotropism kan även bero på att tumörceller ofta har ett defekt antiviralt svar, eller på förmåga hos viruset att undvika tumörcellers antivirala mekanismer (Nüesch *et al.*, 2012). I celler med ett normalt fungerande antiviralt svar triggar en virusinfektion produktionen av typ-I-interferoner (IFN- α och IFN- β), vilka är nödvändiga för hämningen av virusinfektionen (Grekova *et al.*, 2010). I en studie av Grekova *et al.* (2010) visade forskarna att MVM inte gav upphov till

något antiviralt interferon-typ-I-svar i tumöromvandlade musceller, vilket det däremot gjorde i normala musceller. I en senare studie av Paglino *et al.* (2014), gjord på humana celler, genererades inget IFN-svar varken hos normala och tumöromvandlade celler vid MVM-infektion. Paglino *et al.* (2014) testade även om interferonbehandling kunde påverka viruset i H-1PV-infekterade celler, men ingen påverkan kunde observeras.

Cytotoxicitet och celldöd

H-1PV-inducerad celldöd är dosberoende (Moehler *et al.*, 2003), och beroende på tumörtyp kan infekterade tumörceller dö genom nekros eller apoptos (Ohshima *et al.*, 1998; Di Piazza *et al.*, 2007). De tumörsupprimerande mekanismerna hos H-1PV är dock ännu långt ifrån klarlagda (Marchini *et al.*, 2015). Exempel på hur H-1PV kan orsaka celldöd är genom aktivering av kaspaser, inducerad cellcykelarrest, ackumulering av reaktiva syreföreningar (ROS) och ackumulering av lysosomala enzymer (Ohshima *et al.*, 1998; Di Piazza *et al.*, 2007; Hristov *et al.*, 2010).

I en studie av Mousset *et al.* (1994) studerades de cytotoxiska effekterna av NS-proteiner från MVM genom att föra in vektorburna-NS-gener i cellinjer av normala fibroblaster respektive tumöromvandlade fibroblaster från råttor. Studien visade att NS1 är det virala proteinet som är viktigast för virusets cytopatogenicitet, och att proteinets cytotoxicitet stimuleras i tumöromvandlade celler. Det visades att NS1-mängder korrelerar med celldöd och att koncentrationer av NS1 som är dödliga för tumöromvandlade celler inte är dödliga för normala celler (Mousset *et al.*, 1994).

Genom sin studie baserad på H-1PV-infekterade glioblastomceller från råttor kunde Ohshima *et al.* (1998) visa att H-1PV kan inducera apoptos. Två dagar efter inducerad infektion började cellantalet minska i proverna och efter sex dagar var de flesta cellerna döda. De morfologiska förändringarna, kromatinkondensation och apoptoskroppar, som sågs i cellerna visade på apoptos. För att undersöka om någon av de två apoptosassocierade kaspaserna kaspas 1 eller 3 hade del i apoptosen behandlades cellproverna med kaspas-1-specifik respektive kaspas-3-specifik hämmare. Cellerna som behandlats med kaspas-3-specifik hämmare uppvisade dosberoende minskning av virusinducerad celldöd, vilket talar för att H-1PV inducerade kaspas-3-beroende apoptos (Ohshima *et al.*, 1998).

I en studie av Rayet *et al.* (1998) indikerades ett samband mellan TNF- α -känslighet och H-1PV-känslighet. I studiens första del användes celler av den humana myeloida leukemicellinjen U937, som överuttrycker den tumörassocierade transkriptionsfaktorn c-MYC (myelocytomatos oncogene) och som går i apoptos vid TNF- α -behandling. När U937-cellerna infekterades med H-1PV nedreglerades c-MYC, kaspas-3-produkter erhöles och morfologiska förändringar liknande dem som ses vid TNF- α -inducerad apoptos sågs. I studiens andra del användes H-1PV-resistenta kloner av U937-cellinjen. När de H-1PV-resistenta klonerna behandlades med TNF- α

inducerades ingen apoptos, inte heller kunde i dessa kloner någon nedreglering av c-MYC induceras. Att H-1PV skulle inducera apoptos indirekt via TNF- α kunde uteslutas genom att TNF- α inte kunde detekteras varken i de H-1PV-infekterade U937-cellerna eller i klonerna (Rayet *et al.*, 1998).

I en studie av Hristov *et al.* (2010) visades att H-1PV kan arrestera celler i G₂-fas och därigenom orsaka apoptos, och att NS1 kan inducera apoptos genom att aktivera kaspas 9 och 3. Vidare visade studien att NS1-uttryck och H-1PV-infektion leder till intracellulär ackumulering av ROS, som associeras med DNA-skador och igångsättande av det DNA-reparerande systemet DDR (DNA damage response). Vid tillräckligt allvarliga DNA-skador klarar inte DDR att reparera skadorna varvid cellen dör. Antioxidanter visades i studien minska ROS-nivåerna varvid graden av NS1-inducerade DNA-skador, cellcykelarrest och apoptos minskade. Hristov *et al.* (2010) gjorde utifrån sina studieresultat antagandet att NS1-inducerad ROS-ackumulering är en viktig bidragande orsak till cytotoxiciteten hos H-1PV.

Efter att ha observerat morfologiska förändringar i MVM-infekterade musfibroblaster tillhörande cellinjen A9 undersökte Nüesch *et al.* (2005) hur cytoskelettet och cellkärnan påverkas av en MVM-infektion. Forskarna fann att mikro- och intermediärfilamenten destabiliserades kraftigt, medan mikrotubuli stabiliserades marginellt, och kärnan förblev intakt. Det mikrofilamentprotein som var föremål för destabiliseringen var F-aktin. Nedbryningen av F-aktinet kunde kopplas samman med ökade mängder av det F-aktin-klippande proteinet gelsolin. Vidare sågs även en minskning av aktinpolymerisering, vilket kunde kopplas samman med en minskning av WASP, som är det protein som aktiverar det aktinpolymeriserande komplexet Arp2/3. Intermediärfilamentdestabiliseringen utgjordes av att det cytosoliska intermediärfilamentet vimentin försvann från cellperiferin samtidigt som det ackumulerades runt cellkärnan. Genom att behandla MVM-infekterade respektive oinfekterade fibroblaster med det mikrotubulidestabiliserande preparatet nocodazole såg forskarna att mikrotubuli i MVM-infekterade celler var mer motståndskraftiga mot nocodazole, vilket indikerade att MVM-infektionen genererade en stabilisering av mikrotubuli. Studien utfördes även på humana njurceller från cellinjen NB324K, och gav då samma resultat, vilket visade att de MVM-inducerade cytoskelettala skillnaderna inte är specifika för A9-celler (Nüesch *et al.*, 2005).

I en studie av Di Piazza *et al.* (2007) visades H-1PV inducera lysosomal celldöd i humana gliomceller. De gliomceller som användes i studien överuttryckte antiapoptotiska Bcl-2-molekyler, som är kända för att interferera med apoptosinducerande läkemedel, och var resistent mot de apoptosinducerande läkemedlen TRAIL och cistaplatin. H-1PV triggade celldöden dels genom ackumulering av lysosomalt cathepsin B och L i cytosolen och dels genom minskning av de två cathepsinhämmarna cystatin B och C (Di Piazza *et al.*, 2007).

Immunförsvarsaktivering

I en studie utförd på humana melanomceller tillhörande cellinjen SK29-MEL-1 inducerade H-1PV frisättning av värmechockproteinet HSP72 (Moehler *et al.*, 2003). Däremot sågs ingen uppreglering av humant leukocytantigen (HLA) klass I i melanomcellerna. I studien undersökte forskarna även om H-1PV kunde infektera och inducera celldöd i humana lymfocyter, monocyter, omogna och mogna dendritiska celler. H-1PV togs upp av immuncellerna men replikerades inte och gav inga cytopatologiska effekter. Sammantaget indikerade studieresultatet att H-1PV, genom att inducera frisättning av HSP72, skulle kunna ge upphov till tumörimmunogenicitet *in vivo* (Moehler *et al.*, 2003).

I en senare studie utförd av Moehler *et al.* (2005) på cellinjen SK29-MEL-1 undersöktes om H-1PV-lyserade SK29-MEL-1-celler kunde generera fagocytos, mognad och krosspresentation hos dendritiska celler (DC). I studien användes två kloner av SK29-MEL-1, en som var HLA-A2-positiv och en som var HLA-A2-negativ. HLA-A2 är en serotyp av HLA-A, som är en grupp inom HLA klass I. De HLA-A2-positiva melanomcellerna uppvisade de två tumörantigenen Melan-A och tyrosinas. De HLA-A2-negativa melanomcellerna saknade HLA-A-molekyler och uppvisade därför inget endogent antigen. Studien visade att omogna DC kunde fagocytera fragment av de H-1PV-lyserade SK29-MEL-1-klonerna. När omogna DC exponerades för fragment av oinfekterade melanomceller eller melanomceller infekterade med UV-inaktiverat H-1PV skedde dock ingen fagocytos. Efter fagocytos uttryckte DC mognadsmarkörer och frisatte de proinflammatoriska cytokinerna tumörnekrosfaktor alfa (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) och interleukin 8 (IL-8). För att undersöka krosspresentation användes A2-positiva cytotoxiska T-celler förprogrammerade att frisätta interferon gamma (INF- γ) vid presentation av tumörantigen från SK29-MEL-1-celler. När HLA-A2-positiva DC som fagocyterat fragment av HLA-A2-negativa SK29-MEL-1, sammanfördes med de A2-positiva cytotoxiska T-cellerna kunde krosspresentation påvisas genom frisatt INF- γ . Denna studie gav stöd för att H-1PV genom inducerad tumör celldöd har potential att stimulera humana antigenpresenterande celler och cytotoxiska T-celler (Moehler *et al.*, 2005).

I *ex vivo* studien av Sieben *et al.* (2013) upptäcktes att fragment av H-1PV-lyserade SK29-MEL-1-celler bands till de Toll-lika receptorerna TLR3 och TLR9, som är membranbundna patogenigenkännande receptorer i DC. Aktiveringen av TLR3 och TLR9 genererade aktivering av det transkriptionsreglerande proteinkomplexet NF κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) och hämning av den NF κ B-hämmande proteinfamiljen I κ B. Utifrån sitt studieresultat hävdade forskarna att stimuleringen av DC av fragment av H-1PV-lyserade tumörceller, åtminstone delvis, sker via TLR-beroende signalvägar (Sieben *et al.*, 2013).

Bhat *et al.* (2011) visade med sin studie att H-1PV kan stimulera NK-celler (natural killer cells) till NK-medierad celldöd av duktualt adenocarcinom i pankreas. Den cellinje som användes var den H-1PV- och NK-känsliga cellinjen Panc-1. H-1PV-infektion av Panc-1-celler genererade ökad aktivering av NK-celler, vilket sågs genom en ökad frisättning av cytokinerna INF- γ och

TNF- α och kemokinerna MIP-1 α och MIP-1 β (makrofag-inflammatoriskt protein 1). Vidare sågs att det var flera NK-receptorer involverade i aktiveringen av NK-cellerna. Hämmning av de naturliga cytotoxreceptorerna NKp30, NKp44 och NKp46, och receptorerna NKG2D och DNAM1 genererade hämmning av NK-aktiviteten. Den ökade känsligheten hos H-1PV-infekterade Panc-1-celler för NK-medierad celldöd kunde sättas i samband med uppreglering av de två DNAM-1-liganderna DNAM-1-ligand och CD155, och nedreglerat uttryck av MHC klass I (Bhat *et al.*, 2011).

Prekliniska och kliniska försök

Under de senaste två decennierna har flertalet informativa prekliniska försök genomförts för att bredda kunskapen om H-1PV som presumtiv tumörbehandling. Exempel på tumörtyper som hämmats av H-1PV-infektion är glioblastoma multiforme, en mycket aggressiv hjärntumör hos människor, pediatrika neuroektodermala tumörer, vilka är maligna tumörer härstammande från centrala nervsystemet hos barn, hepatom, lymfom, melanom, och carcinom i pankreas, bröst, mage, colon och cervix (Marchini *et al.*, 2015). Prekliniska studier *in vitro* och *in vivo* kan ge värdefull kunskap om effektiviteten av H-1PV-inducerad tumörsuppression, men tar inte fullt ut hänsyn till fysiologin och immunförsvaret i den presumtiva patienten, och ger därför inte tillräcklig information för att säkerställa effektiviteten och säkerheten vid klinisk H-1PV-baserad antitumörbehandling. Av denna anledning är kliniska försök nödvändiga (Marchini *et al.*, 2015).

Det första och ännu pågående kliniska försöket för H-1PV-behandling är fas I/IIa studien av glioblastoma multiforme (GBM) som genomförs av Geletneky *et al.* (2012). Studien syftar primärt till att undersöka säkerheten vid lokal och systemisk administrering av H-1PV och fastställa maximal tolererbar dos. Sekundärt syftar studien till att undersöka H-1PV-behandlingens effektivitet och överlevnaden utan tumörprogression upp till sex månader. Studien utförs på två patientgrupper med progressiv GBM. Den första gruppen, som ingår i studiens första del, kommer injiceras i tumören med H-1PV tio dagar före tumören opereras bort. Den andra gruppen, som ingår i studiens andra del, kommer injiceras intravenöst med H-1PV under fem dagar med start tio dagar före tumören opereras bort. Båda grupperna kommer vid operationen att injiceras med H-1PV i hjärnvävnaden omkring tumören. För att fastställa maximal tolererbar dos är båda grupperna indelade i respektive tre delgrupper vilka kommer injiceras med olika stora mängder virus. Under behandlingen kommer patienterna hållas isolerade och deras virusutsöndring kommer studeras. På grund av sjukdomens mycket dåliga prognos och avsaknaden av effektiva behandlingsmöjligheter genomförs studien utan kontrollgrupp (Geletneky *et al.*, 2012).

DISKUSSION

Den grundläggande förutsättningen för H-1PVs tumörsupprimerande effekt är dess onkotropism. Onkotropismen gör att tumöromvandlade celler påverkas av en H-1PV infektion medan icke-tumöromvandlade celler inte gör det (Cotmore & Tattersall, 1987). Onkotropismen genererar även ett tumörspecifikt immunsvaret genom att generera blottning av tumörassocierade antigen. Tillsammans med de direkta cytotoxiska effekterna genererar H-1PV således tumörsuppression både genom mekanismer inuti tumörcellerna och genom immunförsvarsmedierade mekanismer extracellulärt (Moehler *et al.*, 2005). De tumörsupprimerande mekanismerna som beskrivits i uppsatsen är ett urval av de tumörsupprimerande mekanismer som hittills indikerats för H-1PV. Med fortsatta studier är det mycket troligt att fler tumörsupprimerande mekanismer kommer att upptäckas. Ökad kunskap om H-1PVs tumörsupprimerande mekanismer skulle generera ökade möjligheter att bättre förutse H-1PVs potential för behandling av tumörer (Marchini *et al.*, 2015). Identifiering av biomarkörer för H-1PV-effekt skulle generera möjlighet att förutse vilka tumörer som är behandlingsbara och vilka som inte är det (Nüesch *et al.*, 2012). I sökandet av potentiella biomarkörer är exempelvis onkoproteinet c-MYC värt att studera mer ingående (Rayet *et al.*, 1998). Med ökad kunskap om H-1PVs tumörsupprimerande mekanismer föreställer jag mig att chanserna att modifiera viruset, tumörerna eller immunförsvaret för effektiv tumörsuppression ökar.

Hittills har H-1PV-forskningen varit inriktad mot humana tumörer, men på grund av avsaknaden av tidigare erhållen antiviral immunitet för H-1PV och stora likheter i fysiologin hos andra icke-murina däggdjur menar jag att de forskningsupptäckter som gjorts inom den humana H-1PV-forskningen borde kunna göras även för andra däggdjur och appliceras inom veterinärmedicinen. På grund av omfattningen av de kunskapsluckor som finns och lovande prekliniska studier som hitintills genomförts för H-1PV och andra *Rodent protoparvovirus 1* finns anledning att genomföra fler studier, både prekliniska och kliniska, och på fler djurslag. Det finns exempelvis ett behov att undersöka om, och i så fall hur, viruset kan smitta mellan individer. Fördelar som H-1PV har jämfört med andra befintliga tumörbehandlingar är många, däribland avsaknad av biverkningar hos postneonatala individer, okomplicerad administrering, förmåga att korsa blod-hjärnbarriären och förmåga att inducera alternativa signalvägarvägar för celledöd (Cotmore & Tattersall, 1987; Cornelis *et al.* 2006; Geletneky *et al.*, 2012). Sammanfattningsvis menar jag att H-1PV är ett virus värt att uppmärksammas och utvärderas som potentiell tumörbehandling.

LITERATURFÖRTECKNING

- Bhat, R., Dempe, S., Dinsart, C. & Rommelaere, J. (2011). Enhancement of NK cell antitumor responses using an oncolytic parvovirus. *International Journal of Molecular Medicine* 28, S7-S7.
- Cornelis, J.J., Deleu, L., Koch, U. & Rommelaere, J. (2006). Parvovirus oncosuppression. In: Kerr, J.R. (Ed.) *The Parvoviruses*. pp. 365-78. London: Hodder Arnold.
- Cotmore, S.F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J.A., Mukha, D.V., Pintel, D.J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D. & Davison, A.J. (2014). The family Parvoviridae. *Archives of Virology* 159(5), 1239-1247.
- Cotmore, S.F. & Tattersall, P. (1987). The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Advances in Virus Research* 33, 91-174.
- Deleu, L., Pujol, A., Faisst, S. & Rommelaere, J. (1999). Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection. *Journal of Virology* 73(5), 3877-3885.
- Di Piazza, M., Mader, C., Geletneky, K., Calle, M.H.Y., Weber, E., Schlehofer, J., Deleu, L. & Rommelaere, J. (2007). Cytosolic activation of cathepsins mediates parvovirus H-1-induced killing of cisplatin and TRAIL-resistant glioma cells. *Journal of Virology* 81(8), 4186-4198.
- Geletneky, K., Huesing, J., Rommelaere, J., Schlehofer, J.R., Leuchs, B., Dahm, M., Krebs, O., Doeberitz, M.v.K., Huber, B. & Hajda, J. (2012). Phase I/IIa study of intratumoral/intracerebral or intravenous/intracerebral administration of Parvovirus H-1 (ParvOryx) in patients with progressive primary or recurrent glioblastoma multiforme: ParvOryx01 protocol. *Bmc Cancer* 12.
- Grekova, S., Aprahamian, M., Giese, N., Schmitt, S., Giese, T., Falk, C.S., Daeffler, L., Cziepluch, C., Rommelaere, J. & Raykov, Z. (2010). Immune cells participate in the oncosuppressive activity of parvovirus H-1PV and are activated as a result of their abortive infection with this agent. *Cancer Biology & Therapy* 10(12), 1280-1289.
- Hanson, N.D. & Rhode, S.L. (1991). Parvovirus ns1 stimulates p4 expression by interaction with the terminal repeats and through dna amplification. *Journal of Virology* 65(8), 4325-4333.
- Hristov, G., Kraemer, M., Li, J., El-Andaloussi, N., Mora, R., Daeffler, L., Zentgraf, H., Rommelaere, J. & Marchini, A. (2010). Through Its Nonstructural Protein NS1, Parvovirus H-1 Induces Apoptosis via Accumulation of Reactive Oxygen Species. *Journal of Virology* 84(12), 5909-5922.
- Marchini, A., Bonifati, S., Scott, E.M., Angelova, A.L. & Rommelaere, J. (2015). Oncolytic parvoviruses: from basic virology to clinical applications. *Virology* 12(1), 6.
- Moehler, M., Zeidler, M., Schede, J., Rommelaere, J., Galle, P.R., Cornelis, J.J. & Heike, M. (2003). Oncolytic parvovirus H1 induces release of heat-shock protein HSP72 in susceptible human tumor cells but may not affect primary immune cells. *Cancer Gene Therapy* 10(6), 477-480.
- Moehler, M.H., Zeidler, M., Wilsberg, V., Cornelis, J.J., Woelfel, T., Rommelaere, J., Galle, P.R. & Heike, M. (2005). Parvovirus H-1-induced tumor cell death enhances human immune response in vitro via increased phagocytosis, maturation, and cross-presentation by dendritic cells. *Human Gene Therapy* 16(8), 996-1005.
- Mousset, S., Ouadrhiri, Y., Cailletfauquet, P. & Rommelaere, J. (1994). The cytotoxicity of the autonomous parvovirus minute virus of mice nonstructural proteins in FR3T3 rat-cells depends on oncogene expression. *Journal of Virology* 68(10), 6446-6453.
- Nüesch, J.P.F., Lacroix, J., Marchini, A. & Rommelaere, J. (2012). Molecular Pathways: Rodent Parvoviruses-Mechanisms of Oncolysis and Prospects for Clinical Cancer Treatment. *Clinical Cancer Research* 18(13), 3516-3523.

- Nüesch, E.R., Lachmann, S. & Rommelaere, J. (2005). Selective alterations of the host cell architecture upon infection with parvovirus minute virus of mice. *Virology* 331(1), 159-174.
- Ohshima, T., Iwama, M., Ueno, Y., Sugiyama, F., Nakajima, T., Fukamizu, A. & Yagami, K. (1998). Induction of apoptosis in vitro and in vivo by H-1 parvovirus infection. *Journal of General Virology* 79, 3067-3071.
- Paglino, J.C., Andres, W. & van den Pol, A.N. (2014). Autonomous parvoviruses neither stimulate nor are inhibited by the type I interferon response in human normal or cancer cells. In: *J Virol.* pp. 4932-42; 88). ISBN 0022-538X (Print) 1098-5514 (Electronic).
- Pintel, D., Dadachanji, D. & Astell, C.R. (1983). The genome of minute virus of mice, an autonomous parvovirus, encodes two overlapping transcription units. *Nucleic Acids Research* 11(4), 1019-1038.
- Rayet, B., Lopez-Guerrero, J.A., Rommelaere, J. & Dinsart, C. (1998). Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: Connection with the tumor necrosis factor alpha signaling pathway. *Journal of Virology* 72(11), 8893-8903.
- Rhode, S.L. & Paradiso, P.R. (1983). Parvovirus genome – nucleotide-sequence of H-1 and mapping of its genes by hybrid-arrested translation. *Journal of Virology* 45(1), 173-184.
- Sieben, M., Schaefer, P., Dinsart, C., Galle, P.R. & Moehler, M. (2013). Activation of the human immune system via toll-like receptors by the oncolytic parvovirus H-1. *International Journal of Cancer* 132(11), 2548-2556.
- Siegl, G., Bates, R.C., Berns, K.I., Carter, B.J., Kelly, D.C., Kurstak, E. & Tattersall, P. (1985). Characteristics and taxonomy of parvoviridae. *Intervirology* 23(2), 61-73.