

Doktori (Ph. D.) értekezés tézisei

**NEWCASTLE BETEGSÉG VÍRUS-INDUKÁLT
SEJTPUSZTULÁS *IN VITRO* VIZSGÁLATA
DAGANATSEJTEKEN**

dr. Fábián Zsolt

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Biológiai Intézet

Pécs, 2006.

Doktori (Ph. D.) értekezés tézisei

**NEWCASTLE BETEGSÉG VÍRUS-INDUKÁLT
SEJTPUSZTULÁS *IN VITRO* VIZSGÁLATA
DAGANATSEJTEKEN**

dr. Fábián Zsolt

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Biológiai Intézet

Pécs, 2006.

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezető: dr. Sümegi Balázs egyetemi tanár

Program- és témavezető: dr. Szeberényi József egyetemi tanár

BEVEZETÉS

A vírusfertőzések daganatos megbetegedésekre gyakorolt jótékony hatásának koncepciója nem újkeletű. *Dock* és *DePace* 1904-ben, majd 1912-ben megjelent tudósítása szerint cervix carcinomában szenvedő betegek között több esetben jelentős tumor-regresszió következett be Pasteur-féle veszettség elleni oltóanyag adását követően. 1970-re már közel 40 olyan, kétharmad részben RNS, egyharmad részben DNS vírust tartottak számon, melyekkel kapcsolatban megfigyelhető volt valamilyen mértékű onkolitikus hatás. Az elmúlt évtizedekben, klinikai vizsgálatok során több száz daganatos beteg esett át a legkülönbözőbb vírusterápiás beavatkozásokon – igen eltérő eredménnyel. A megfigyelések szerint egyes vírusfertőzések valóban nagymértékben befolyásolják a daganatos megbetegedések lefolyását, a megfigyelt tumor-regressziós és egyéb pozitív hatások (járulékos tünetek csökkenése, jobb közérzet stb.) háttere azonban tisztázatlan. A hatásmechanizmusra vonatkozóan több elképzelés is napvilágot látott, melyeket döntően két csoportra oszthatunk. Az egyik elképzelés szerint az alkalmazott vírusvakcinák a daganatos szövetekben replikálódnak és a tapasztalt klinikai hatásokért az e folyamatok során fellépő direkt citopátiás hatás a felelős. A másik irányzat szerint a klinikai tapasztalatok mögött döntően immunológiai mechanizmusok állnak, az onkolitikus hatású vírusok pedig egyfajta adjuvánsként szerepelve segítik a beteg immunrendszerének a daganatszövettel szembeni fellépését. Az onkolitikus vírusok között tartják számon többek között a mumpsz, vagy a rózsahimlő kórokozóját, a szarvasmarhák enterovírusát, az attenuált humán herpesz simplex vírust, illetve a madarak Newcastle betegség vírusát is.

A NEWCASTLE BETEGSÉG VÍRUS

A Newcastle betegség vírus (NBV), a Mononegavirales rend tagjaként ismert Paramyxovírusok családjába tartozik. Habár nem humán patogén, közeli rokona a humán parainfluenza, illetve mumpsz vírusnak. A többnyire szférikus jellegű partikulumok 150-500 nm közötti átmérőjűek, felszíni molekuláik között haemagglutinin-neuraminidáz (HN) illetve fúziós (F) fehérjék találhatók. A virionokon belül további, legalább három különböző protein található. A mátrix fehérje (M) a virion lipidborítékának belső felszínén található, valószínűleg strukturális szereppel, míg az úgynevezett nukleoprotein (NP) a virion kapszidjának fő felépítője, de fontos szerepe van a virális replikáció és transzkripció irányításában is. Ugyancsak a nukleokapszidban található néhány kópia az L (large protein), illetve P (phosphoprotein) proteinekből, melyek együttesen alkotják a "virális-RNS-függő RNS polimerázt". A nukleokapszid általában 13-18 nm átmérőjű, gyakran mutat helikális szimmetriát. A paramyxovírusok közé sorolt virionok nukleinsav-tartalma általában összetételük mintegy 5%-a, amely egy darab, lineáris, nem szegmentált, jellemzően – mint pl. az NBV esetében is – negatív, ritkábban pozitív, egyszálú ribonukleinsav (RNS). A genom teljes nagysága 15-20 kb között mozog – az NBV esetében 15156-15186 nukleotid – melyben a kódoló szakaszokat rövid repetitív szekvenciák választják el egymástól. Az egyes gének végén poliadenilációs szignál található, a génexpresszió, a génsorrend és a replikáció nagy fokban konzervált és igen nagy hasonlóságot mutat az ugyancsak a Mononegavirales rendbe tartozó Rhabdo- illetve Filovírusokkal. A replikáció eseményei a gazdasejt citoplazmájában játszódnak le, a vírus fehérjék beépülnek a plazmamembránba, majd az újonnan létrejött nukleokapszid fehérjék az így módosított sejthártyához kapcsolódnak, majd az új partikulummá egyesült komponensek a módosult citoplazma membrán egy darabjából képzett burokkal körülvéve lefűződnek a gazdasejtről.

Az így létrejövő lipid burkolat a virionok összetételének 20-25%-át is elérheti, kialakítva az átlagosan mintegy 5×10^8 D molekulásúlyú részecskét. Az NBV madarakban elsősorban súlyos enterális fertőzések kórokozója. Ismereteink szerint meglehetősen stabil szerkezetű, embereket megbetegítő tulajdonsága nincs, de hatékonynak bizonyult több előrehaladott, terápiarezisztens emberi daganattípus kezelésében (pl. egyes glioblastomák, fej-nyaki és colorectalis daganatok, valamint melanomák esetén).

A „pilot-study”-kban már ugyancsak kipróbált, MTH-68/H jelzésű vakcina az NBV Hertfordshire-i, úgynevezett Herts'33 típusából származtatott, attenuált, mezogén variáns. A Herts'33 vonalat elsőként az 1930-as években írták le Angliában, amelyből számos passzázst követően izolálták a később fokozott onkolitikus aktivitást mutató és általunk is felhasznált MTH-68/H formát. Egy a közelmúltban megjelent közlemény szerint végstádiumú, a konvencionális terápiákra nem reagáló glioblastomákban szenvedő betegek esetében igen impresszív eredményeket sikerült elérni, az e betegségcsoportban tapasztalt néhány hónapost messze meghaladó, több éves túlélést biztosítva.

Annak ellenére, hogy az onkolitikus NBV-variánsok klinikai megfigyeléseken alapuló irodalma meglehetősen gazdag, az NBV kiváltotta kedvező onkológiai hatás mechanizmusáról nem rendelkezünk pontos információkkal, mint ahogy az NBV onkolitikus hatása hátterében álló molekuláris mechanizmus(ok) sem ismertek.

KÉRDÉSFELVETÉS, CÉLKITŰZÉSEINK

1. *Befolyásolja-e az NBV fertőzés a sejtek proliferációját szövettényészeti körülmények között? Igazolható-e az NBV fertőzés proliferáció-gátló hatása?*
2. *Kimutatható-e eltérő hatás daganatosan transzformált illetve daganatos jellegűnek kevéssé tekinthető sejt kultúrák fertőzésekor?*
3. *Az egyes daganattípusok között felfedezhetőek-e érzékenységbeli eltérések?*
4. *Mely típusok fogékonyabbak és melyek rezisztensebbek?*
5. *Milyen folyamatok lehetnek felelősek a citotoxicitásért?*

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Felhasznált anyagok. A különböző kezelésekhez felhasznált anyagokat a következő gyártóktól szereztük be: i anizomicin, Sigma-Aldrich (Steinheim, Németország); MTH-68/H: UCRI Hungary (Budapest, Magyarország).

Az infektív MTH-68/H partikulumok kvantitatív vizsgálata. A meghatározás a *Lomniczi* által leírt eljárás szerint (*Lomniczi, B., Studies on interferon production and interferon sensitivity of different strains of Newcastle disease virus. J Gen Virol, 1973. 21(2): p. 305-13.*) a Budapesti Állatorvostudományi Egyetem virológiai laborjában, dr. *Lomniczi Béla* irányításával történt. A 6×10^8 primér embryonális csirkesejtet a szövettényészeti körülmények között 72 órán át fertőzött daganatsejtek tápfolyadékba 0,5 ml-ének felhasználásával 3 napig inkubáltuk. A fertőzött csirkesejtek UH feltárását követően az intracelluláris virionok meghatározása ún. plakk esszével történt.

DNS fragmentáció vizsgálata. $3-5 \times 10^6$ sejtől 0,5% Triton X-100, 5 mM TRIS pH 7.4, 5 mM EDTA-t tartalmazó pufferrel történt lizálást követően fenol/kloroformos DNS extrakciót majd alkoholos kicsapást végeztünk éjszakán át - 20 °C-on. Az így extrahált DNS-t TE pufferben feloldva (2mg/ml) RNáz A-val 37 °C-on, 60 perces inkubációval tisztítottuk, majd 1,8%-os agaróz gélen elektroforetizáltuk. A nukleinsav fragmentumokat a gélben fluoreszcens festékkel tettük láthatóvá (SYBR Gold nucleic acid stain Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA).

Immuncitokémia. A poly-L-lizinnel fedett fedőlemezen tenyésztett sejteket, a kezelést követően, 4%-os friss paraformaldehiddel fixáltuk 4°C-on. A fixált sejteken az immuncitokémiai vizsgálatot a felhasznált antitestek gyártóinak előírásai szerint hajtottuk végre, a készítményeket ProLong Antifade fedőanyaggal fedtük és 24 órán át 4°C-on szárítottuk, majd Olympus FV-1000 pásztázó lézer konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

Sejtkultúrák. A kísérleteinkhez felhasznált sejtvonalak és a tenyésztésükhöz szükséges médiumok összetevői az alábbi táblázatban találhatóak.

Sejttípus	Tenyésztési jellemző	Médium	Végső koncentráció	Gyártó	Katalógus szám
Panc-1 (pancreas adenocarcinoma)	Letapadó	RPMI 1640-Medium (L-Glutamin 2mM) <u>fenolvörös nélkül</u> FCS (Fetal Calf Serum) MEM Na-piruvát MEM non-essential amino acid solution	- 10 % 1 mM 1x	GIBCO GIBCO Sigma Sigma	11835-030 26010-074 S8636 M7145
HCT 116 (colon carcinoma) HT-25 (colon carcinoma) HT-169-M1/9 (melanoma) HT-199 (melanoma) WM983B (melanoma)	Letapadó Letapadó Letapadó Letapadó Letapadó	RPMI 1640-Medium (L-Glutamin 2mM) <u>fenolvörössel</u> FCS (Fetal Calf Serum)	- 5 %	GIBCO GIBCO	21875-034 26010-074
DU-145 (prostata adenoc. agyi met.) NCI-H460 (pulm. cc. pleur. met.) PC-3 (prostata adenoc. csont met.) HT-29 (colon adenocarcinoma)	Letapadó Letapadó Letapadó Letapadó	DMEM, Ham's F12 (1:1) (L-Glutamin 2mM) FCS (Fetal Calf Serum)	- 10 %	GIBCO GIBCO	31330-038 26010-074
A431 (epidermoid carcinoma)	Letapadó	DMEM, Ham's F12 (1:1) (L-Glutamin 2mM) FCS (Fetal Calf Serum)	- 5 %	GIBCO GIBCO	31330-038 26010-074
U373 (glioblastoma) HeLa (cervix adenocarcinoma) MCF-7 (ductalis adenoc. mammae)	Letapadó Letapadó Letapadó	DMEM FBS (Fetal Bovine Serum)	- 10%	GIBCO GIBCO	41966-029 10106-169
LNZTA3WT4 (glioblastoma)	Letapadó	DMEM FBS (Fetal Bovine Serum) L-Glutamin Tetracklin	- 10% 2 mM 1µg/ml	GIBCO GIBCO GIBCO Sigma	41966-029 10106-169 25030-024 T7660
PC12 (patkány phaeochromocytoma)	Letapadó	DMEM FBS (Fetal Bovine Serum) Horse serum	- 5% 10%	GIBCO GIBCO GIBCO	41966-029 10106-169 16050-122
Rat-1 (patkány fibroblaszt) NIH3T3 (egér fibroblaszt)	Letapadó	DMEM Calf Serum	- 10%	GIBCO GIBCO	41966-029 26170-043
Humán primér fibroblaszt	Letapadó	DMEM FBS (Fetal Bovine Serum)	- 20%	GIBCO GIBCO	41966-029 10106-169

TUNEL-esszé. 10^5 poly-L-lizinnel bevont fedőlemezre kiültetett sejtet 4%-paraformaldehid tartalmú 1X PBS ben 4°C -on 20 percig fixáltunk, majd 0,1% Triton X-100 tartalmú 1xPBS oldattal permeabilizáltunk szobahőmérsékleten 15 percig. Az egyes lépések között 3x5 percig 1X PBS oldattal mostuk a mintákat. A permeabilizálást követően FITC-konjugált dUTP és terminális deoxynukleotid transzferáz felhasználásával nukleinsav-végjelölést hajtottunk végre a gyártó utasításainak megfelelően. A reakció befejeztével propidium-iodid háttérfestést végeztünk. A preparátumokat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

Western-blot. A fehérjekoncentrációk meghatározásához Bio Rad RC_{DC} protein assay kolorimetriás módszert alkalmaztuk. A sejt lizátumokat 12%-os SDS tartalmú poliakrilamid gélben elektroforetizáltuk, majd éjszakán át BioRad Sequiblot PVDF membránra (Bio-Rad Hungary, Budapest) elektro-transzferáltuk. Az immunkomplexek vizualizálása erősített kemilumineszcens eljárással történt (ECL Plus Western blot detection system, Amersham Pharmacia Biotech AB., Uppsala, Sweden). Az immunoblot analíziseket a gyártók előírásai szerint, a következő antitestekkel hajtottuk végre:

Antitest	Antitest típusa	Katalógus szám	Gyártó
foszfo-specifikus Mdm2 p53 foszfo-specifikus PTEN PTEN hasított kaszpáz-3 hasított kaszpáz-9 kaspáz-8 eIF2 α foszfo-specifikus eIF2 α	Poliklonális, nyúl (ser166) Poliklonális, nyúl Poliklonális, nyúl (Ser388) Poliklonális, nyúl Poliklonális, nyúl Poliklonális, nyúl Poliklonális, nyúl Poliklonális, nyúl Poliklonális, nyúl (Ser51)	#3521 #9282 #9551 #9552 #9661 #9507 #9746 #9722 #9721	Cell signaling (Beverly, MA, USA)
PERK foszfo-specifikus PERK	Poliklonális, nyúl Poliklonális, nyúl	#sc-13073 #sc-32577-R	SantaCruz Biotechnology (SantaCruz, CA, USA)
Aktin (mAb, AB-1)	Monoklonális, egér IgM	#CP01	Oncogene (Merck Ltd., Budapest, Hungary)
Kaspáz-12	Poliklonális, nyúl	#BV-3182-3	MBL laboratories (Nagoya, Japan)

Citotoxicitás mérése WST-1 kolorimetriás módszerrel. A WST-1 sejtproliferációs reagens egy steril, vízdékony sejtpermeabilis tetrazólium só [4-(3-(4-jodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzén diszulfonát (**WST-1**)], mely a mitokondriális szukcinát-tetrazólium-reduktáz enzimrendszerek segítségével 440-450 nm hullámhosszon spektrofotometriás úton mérhető formázán termékeké konvertálódik. E módszer során a tenyészetben jelenlévő metabolikusan aktív mitokondriumok segítségével következtetünk az élő sejtek számára. A módszer beállítása során szerzett tapasztalataink szerint a mért adatok 5×10^3 és 5×10^4 induló sejtszám esetén lineáris összefüggést mutatnak a sejtszámmal. Méréseink során a sejttípusoktól függően 10^4 - 4×10^4 sejtet ültettünk ki 1 ml médiumban 24-lyukú lemezekre. 24 órával a kiültetést követően a letapadt és egészséges tenyészeteket MTH-68/H-val fertőztük, majd 72 órán át inkubáltuk. Pozitív kontrollként nagydózisú (1µg/ml), fehérjeszintézist gátló anizomicin kezelést alkalmaztunk. Az inkubációt követően a médiumot 100 µl 10% WST-1 tartalmú médiumra cseréltük és az egyes sejtféleségek metabolikus jellemzőitől függően 90-240 percig inkubáltuk. A médiumokból 100 µl-es mintákat 96-lyukú ELISA lemezekre vittünk fel, majd az egyes minták formázán tartalmát spektrofotométerrel 440 nm-en határoztuk meg.

Gél-retardációs (mobility shift) esszé. A sejteket átmostuk jég hideg 1x-es foszfát pufferelt sóoldattal (1x PBS), majd 10x-es volumenű pufferben (10mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,5 mM DTT, Protease inhibitor Mini EDTA free tablets- Boehringer Mannheim) feloldottuk, jégen állni hagyjuk 10 percig, erőteljes vortexezés után 10 mp-ig centrifugáltuk (13500rpm). A szedimentumként kapott magfrakciót újraszuszpendáltuk 2x-es volumenű pufferben (20mM HEPES, pH 7.9, 25% glicerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, „Protease inhibitor Mini EDTA free tablets” Boehringer Mannheim), jégen állni hagyjuk 20 percig, vortexezés után 10 mp-ig újra centrifugáltuk (13500rpm). A felülúszóként kapott magfehérje oldatot -70°C-n tároltuk felhasználásig. A fehérje koncentrációt Bio-Rad RC_{DC} Protein Assay segítségével fotometriás úton határoztuk meg. **Oligonukleotid-jelölés:** A vizsgálni kívánt transzkripció faktorok konszenzus szekvenciáit tartalmazó oligonukleotidokat Ready-To-Go T4 polynucleotide Kinase kit segítségével [³²P]ATP-vel jelöltünk a gyártó leírásnak megfelelően (Amersham Pharmacia Biotech). **DNS-fehérje kötődési reakció:** A -70°C-on tárolt fehérjemintákat jégen felolvastottuk, 10 µg/minta fehérjét szobahőmérsékleten inkubáltunk 4µl 5x-ös módosított Ziff puffer (10mM HEPES, pH 7.5, 10% glicerol, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA), 2µl 100 ng/µl poli d(I)d(C), illetve 1 µg kompetitor oligonukleotid jelenlétében (a reakcióelegyet 20µl-re kiegészítettük desztillált vízzel). A kompetitorokat tartalmazó kontroll mintákat 15 percig előinkubáltuk. Az egyes mintákat 100 000 cpm jelölt kötőhelyspecifikus oligonukleotiddal egészítettük ki, majd szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk. **Elektroforézis:** 5% TBE (Tris Base, Bórsav, EDTA) tartalmú nem denaturáló poliakrilamid gélben 1x TBE puffert használva elektroforetizáltunk (300mA, 200V, 2,5 óra). A gélt megszáritottuk, az értékelés Cyclone PhosphorImager-rel (Cyclone phosphor imager system Packard Instrument Co. Inc., Meriden, CT, USA) történt. A kísérleteinkhez felhasznált p53 konszenzus szekvenciát (5'-TACAGAACATGTCTAAGCATGCTGGGGACT-3') tartalmazó kettősláncú oligonukleotidokat a Santa Cruz Biotechnology Inc.-től (Santa Cruz, CA, USA), míg a c-Myc (5'-TGTGCGGCCACGTGTCGCGAGGCCCGG-3') és az NFκB (5'-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3') konszenzus szekvenciát tartalmazó kettősláncú oligonukleotidokat az Amitof-tól (Amitof, Boston, MA, USA) szereztük be.

EREDMÉNYEK

Az MTH-68/H daganatsejtekre gyakorolt citotoxikus hatása. Az alkalmazott MTH-68/H kísérleti vakcina erősen citotoxikus hatású wtPC12 sejt kultúrákban. A fertőzés 72 óra alatt a teljes sejtenyészet pusztulását idézi elő. A citotoxikus hatás dóziszfüggőnek bizonyult; 72 órás fertőzés során az 50%-os sejtpusztulás 1:5-1:10 (sejt:partikulum) titernél következik be. 1:800-as titer esetében a totális fehérjeszintézis gátlást előidéző nagy dózisú anizomicin kezeléssel azonos mértékű sejtpusztulás mérhető. Az NBV fertőzés hasonló hatásúnak bizonyult HeLa sejtek esetén. A legkisebb általunk vizsgált sejt:virion arány alkalmazásakor is közel maximális mértékű sejtpusztulást tapasztaltunk a fertőzést követő 72 óra alatt. Az MTH-68/H riasztó mértékű citopátiás hatását tapasztalva citotoxicitási méréseinket kiterjesztettük néhány további tumorosan transzformált humán eredetű sejtvonalra is. A vizsgált tumorsejt vonalak mindegyike fogékonyak bizonyultak a fertőzéssel szemben, jóllehet az egyes típusok esetében eltérések is felfedezhetők.

A melanoma sejtvonalak esetében a tenyészetek teljes pusztulását tapasztaltuk 72 órával a fertőzést követően akkor, ha az alkalmazott vírus titer elérte, vagy meghaladta az 1:1-1:5 sejt:virion arányt, míg az átlagosan 50%-os sejtpusztulás a 10:1-5:1 titer tartományban volt megfigyelhető. Colorectalis eredetű sejtvonalakkal végzett kísérleteinkben a maximális hatás elérése 1:5 vagy e feletti titer esetén jelentkezett, mellyel összhangban az 50%-os pusztulás eléréséhez is magasabb, jellemzően 5:1-1:1 sejt:virion arány volt szükséges. Ugyanakkor az egér, patkány és primér humán fibroblasztokkal végzett kísérleteink során a bármely korábbi sejtvonalban maximális sejtpusztulást előidéző titerek esetén sem tapasztaltunk szignifikáns sejtpusztulást, sőt, egészséges, konfluens tenyészetet létrehozó folyamatos proliferációs aktivitás volt mérhető. A fokozott érzékenységet mutató glioblastoma és melanoma vonalak mellett különösen érzékenyek bizonyultak a pancreas és a cervix carcinoma eredetű sejtvonalak, míg a legkevésbé érzékenyek az emlődaganatból származó MCF-7 sejtvonal tűnik. A felhasznált sejttípusok fontosabb jellemzői a 3. táblázatban találhatóak.

Sejt típus	Szöveti eredet	p53 státusz ²	Genotípus ²	Relatív MTH-68/H érzékenység
Primér fibroblaszt	Humán	NA ¹	Diploid	Nincs
NIH3T3	Egér embrionális fibroblaszt	NA ¹	Diploid	Nincs
Rat-1	Patkány embrionális fibroblaszt	NA ¹	Diploid	Nincs
HT-25	Humán colon carcinoma	NA ¹	Diploid	+++
HT-29	Humán colorectalis adenocarcinoma	CGT/CAT mutáció a p53 gén 273 kodonjában. Fokozottan termelt p53 antigén.	Hypertriploid c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, Myb, sis, fos +; N-myc, abl, ros, src -; CEA+ TGFβBP +	++++
HCT-116	Humán colon carcinoma	wtp53+/+	Diploid „közeli”; mutáció a ras gén 13. kodonjában; Keratin + TGFβ 1/2 +	+++
DU-145	Humán prostata adenocarcinoma agyi metasztázisa	Mindkét allél mutált: Pro ²²³ Leu és Val ²⁷⁴ Phe	Hypotriploid	+++
PC-3	Humán prostata adenocarcinoma csont-metasztázisa	Az egyik p53 allél deletált; Frame shift-et okozó pont mutáció a 138-as kodonban, amely korai terminációhoz vezet.	Hypotriploid	++++
PANC-1	Humán ductális epithelioid pancreas carcinoma	CGT/CAT mutáció a p53 gén 273 kodonjában.	GGT/GAT mutáció a K-ras gén 12. kodonjában p16 gén metilált Hypertriploid	+++++
MCF-7	Humán emlő adenocarcinoma	wtp53+/+	N-ras amplifikáció Tx-4 onkogénre + Ösztrogén receptor + Ösztrogén dependens Kaspáz 3 -	++
HeLa	Humán cervix adenocarcinoma	HPV16 E6+; alacsony p53 expresszió	Keratin+	+++++
NCI-H460	Humán nagysejtes tüdőcarcinoma pleurális metasztázisa	Emelkedett p53 mRNS expresszió. ²	Hypotriploid Keratin + Vimentin +	+++
U373	Humán astrocytoma	CGT/CAT mutáció a p53 gén 273 kodonjában.	Diploid/hypotriploid; TNFα +; Substance P rec. +; HSP28 +	+++
LNZTA3WT4	Humán glioblastoma	Az endogén p53, kromoszóma-átrendezés következtében, inaktivált. A sejtvonal stabil transzfektánsa egy CMV promóter és tetracyclin represszor vezérelt wtp53 cDNS-nek. ²		++++
A431	Humán epidermoid carcinoma	CGT/CAT mutáció a 273 kodonban.	Hypertriploid	++++
HT-168-M1/9	Humán melanoma	NA ¹	NA ¹	++++
WM983B	Humán melanoma	NA ¹	NA ¹	++++
HT199	Humán melanoma	NA ¹	NA ¹	++++

3. táblázat. Az alkalmazott sejtvonalak fontosabb tulajdonságai és relatív MTH-68/H érzékenységük. ¹NA: Nincs adat; ²Az American Tissue Culture Collection adatai, valamint publikációk alapján.

Az MTH-68/H kiváltotta citotoxicitást vírusreplikáció kíséri. Kísérleteinkhez a legnagyobb és a legkisebb MTH-68/H érzékenységet mutató HeLa és MCF-7 sejtvonalakat fertőztük 100:1 és 10:1 titerekkel, 24 órán át a korábbiakkal azonos körülmények között. A fertőzést követően a sejttenyészetek médiumait összegyűjtöttük, majd friss HeLa illetve MCF-7 tenyészetekre vittük át és újabb 24 órán át inkubáltuk. A második 24-órás inkubációt követően mindkét sejtvonal esetében súlyos sejtpusztulást tapasztaltunk, ami jelzi, hogy az első tenyészet fertőzését követően szolubilis, sejtpusztulást kiváltó „anyag” van jelen a tenyésztőfolyadékban, amely a friss vírúsfertőzéshez hasonló sejtpusztulást képes kiváltani.

A citotoxicitási kísérletek során 72 órán át fertőzött wtPC12, HeLa, NIH3T3 és Rat-1 sejtek tenyésztőfolyadékainak fertőzőképes vírus-tartalmának vizsgálata során NIH3T3 és Rat-1 sejtek 3 napos fertőzését követően nem volt kimutatható mennyiségű infektív partikulum a sejtek tenyésztőfolyadékában. Az 1:5, illetve magasabb alkalmazott titereknél mérhető virionok a fertőzéshez használt populáció „maradványainak” tekinthetők. A fibroblaszt sejtekkel végzett kísérleteink tehát egyértelműen arra utalnak, hogy a vírusreplikáció e sejtekben nem megengedett. A megegyező körülmények között, transzformált sejteken (Hela illetve wtPC12) végrehajtott méréseink szerint a fertőzést követően az induló titerekkel összevethető, vagy annál jelentősen nagyobb mennyiségű fertőzőképes részecske mutatható ki a sejt kultúrák médiumaiban. Kísérleteinkben sikerült bemutatnunk, hogy aktív immunkompetens sejtek hiányában is hatékony onkolitikus aktivitás mérhető, melyet a sejt típusoktól függően eltérő mértékű vírusreplikáció kísér.

Az MTH-68/H okozta sejtpusztulás háttérében apoptotikus folyamatok állnak. Az MTH-68/H fertőzött tenyészetek többségénél nagyfokú vakuolizáció figyelhető meg, melyet zsugorodó sejtek megjelenése követ, környezetükben az apoptotikus testekre jellemző objektumok sokaságával. A biokémiai vizsgálatok szerint a fertőzést követően a humán daganatsejtekben apoptotikus folyamatok (DNS fragmentáció, kaszpáz aktiváció) indukálódnak. Az apoptózisra jellemző „DNS-létra” megjelenéséhez minimálisan szükséges MTH-68/H titer jól korrelál a HeLa sejtek relatív érzékenységeivel. Az apoptózis indukációs képesség alapvetően a kísérleti vakcina élő vírustartalmától függ, annak hiányában a DNS-fragmentáció elmarad. PC12 sejtek esetében a sejtek 30-60 perces, alacsony titerű (50:1) MTH-68/H expozíciója is elegendő ahhoz, hogy a folyamatos 24 órás fertőzésre jellemző mértékű DNS-fragmentációt tapasztaljunk. HeLa sejtek MTH-68/H fertőzésekor a TUNEL pozitív sejtek aránya a fertőzés 12. óráját követően csak 25-30% között mozog, míg 24 órával a fertőzést követően eléri a teljes populáció közel 90%-át.

Az MTH-68/H fertőzés kaszpáz-8 és -9 független úton kaszpáz-3 és -12 aktivációhoz vezet. Az MTH-68/H fertőzést követően 10 órával a sejtekben igen jelentős mértékben emelkedik a hasított kaszpáz-3 mennyisége. Hasonlóan kiugró változást a kaszpáz-9 citoplazmatikus elhelyezkedésű hasított formájának megjelenésében csak a fertőzés nagyon késői stádiumaiban figyelhetünk meg, melyet messze megelőz az effektor típusú kaszpáz-3 hasítási termékeinek akkumulációja. A fertőzést >18 órával követő kaszpáz-9 aktiváció tehát inkább csak következménye lehet az apoptotikus folyamatoknak. Hasonló eredményre vezettek a receptor aktivált kaszpáz-8 kimutatására irányuló, kaszpáz-3 deficiens MCF-7, valamint kaszpáz-3 pozitív DU-145 sejtekkel végzett kísérleteink is. Sikerült ugyanakkor kimutatni az endoplazmatikus retikulumban található kaszpáz-12 aktivációját. A hasított kaszpáz-12 megjelenése 8 órával a fertőzés kezdetét követően már egyértelműen kimutatható, amelyet időben a kaszpáz-3 aktivációja követ. Immuncitokémiai vizsgálataink szerint a kaszpáz-12 nukleáris transzlokációja a PC12 sejtek MTH-68/H fertőzését követő 10. órától már ugyancsak megfigyelhető.

MTH-68/H kiváltott apoptotikus folyamatok p53 függetlenek. Az MTH-68/H-val fertőzött sejtekben intenzív apoptotikus folyamatok zajlanak. A fogékonyak bizonyult sejt vonalak genotípusait összehasonlítva kitűnik, hogy számos sejt típus – HT-29, DU145, PC3, Panc-1, HeLa, U373, LNZA3WT4, A431 – mutáns p53 allélok jellemezznek.

Néhány sejtvonalról – wtPC12, MCF-7, HCT-116 – ugyanakkor biztosan tudjuk, hogy vad típusú p53-at (wtp53) expresszál (3. táblázat). Mindez arra utal, hogy a klinikai szempontból oly fontos p53 működés nem szükséges az MTH-68/H indukálta apoptózishoz. Az American Tissue Culture Collection (ATCC) készletéből származó, humán, deletált p53 lókuszokat tartalmazó glioblastoma sejtvonalat – LNZA3WT4 – alkalmaztunk. Az elvégzett citotoxicitási vizsgálataink a sejtvonal MTH-68/H iránti nagyfokú érzékenységét mutatták. A relatív érzékenység a már korábban vizsgált, mutáns p53 allélokat hordozó HT-29 colorectális, PC-3 prostata vagy A431 bőr eredetű sejtekéhez hasonlítható. A különféle MTH-68/H fertőzött sejtvonalakon végrehajtott DNS kötődési vizsgálataink eredményei sem mutattak változást a p53 DNS-kötésének mértékében. Közvetlen és közvetett eredményeink alapján, a vizsgált *in vitro* rendszerekben, az MTH-68/H fertőzésre adott apoptotikus sejtválasz mediálásában az endogén p53 funkciók feltehetően nem játszanak központi szerepet.

Az MTH-68/H fertőzés PERK aktivációt követő eIF2 α inaktivációhoz vezet.

Kísérleteink szerint az eIF2 α gátlása PC12 sejtekben a fertőzés 10-11. órájában válik kifejezetté, így az eIF2 α inaktiváció néhány órával a kaszpáz-12 aktivációt követően történik és időben inkább a kaszpáz-3 aktivációval esik egybe. A legkevésbé MTH-68/H érzékeny MCF-7 sejtek esetében az eIF2 α foszforiláció kezdete néhány órával későbbre, a fertőzést követő 12., míg maximuma a 18. órára tehető. Az eIF2 α szabályozásában számos fehérje kináz vesz részt. Ezek közül az ER-stressz regulációban a protein kináz R-szerű ER-lokalizált kináz (PERK) tűnik különösen fontosnak. A PERK immunoblot vizsgálata PC12 sejtekben érdekes, de korántsem váratlan eredményre vezetett; MTH-68/H fertőzés alatt a PERK egy relatíve gyengébb nyugalmi foszforilációs állapotból a fertőzés első 8-10 órája alatt erősebben foszforilált állapotba kerül, amely drámaian lecsökken a kezelés 10. óráját követően. A PERK foszforiláció tehát időben megelőzi mind az eIF2 α foszforilációt, mind a kaszpáz-3 és -12 aktivációt.

A c-Myc és NF κ B transzkripciós faktorok aktivációja MTH-68/H fertőzés során. wtPC12 sejtekben a c-Myc DNS kötődésének mértéke jelentős emelkedést mutat már az MTH-68/H fertőzés 4. órájától kezdődően. Hasonló, bár talán kissé árnyaltabb c-Myc aktivitás figyelhető meg HCT-116 sejtekben is. Mind wtPC12, mind a funkcionálisan p53 defektívnek tartott HeLa sejtekben, a c-Myc aktiváció kinetikájához hasonlóan nukleáris faktor kappa B (NF κ B) aktiváció is azonosítható. Az NF κ B aktiváció a fertőzést követően a c-Myc aktivációhoz képest gyorsabban kialakul. A kapott eredmények mintázata az MTH-68/H fertőzött HeLa sejtekben nagyon hasonló a teljes fehérjeszintézis blokádnál történő változáshoz. A különböző sejttípusokban eltérő molekulásúlyú DNS-fehérje komplexek jönnek létre, melyek mindegyike specifikusnak bizonyult.

ÖSSZEFOGLALÁS

A humán és nem humán vírusok emberi daganatokra gyakorolt előnyös hatásai régóta a tudományos közösség érdeklődésének tárgyát képezik. Az 1900-as évek elejére visszanyúló kutatásoknak köszönhetően mára sikerült definiálni azokat a vírus fajokat, amelyek rendelkeznek egy teoretikus onkolitikus ágens potenciáljával. A viroterápia gyakorlati bevezetését segíteni hivatott erőfeszítések mindeddig két fő irányban haladtak.

Egyrészt néhány hatékonynak ítélt vírus molekuláris biológiai módszerekkel történő átalakítása segítségével, másrészt egyes saját, belső onkolitikus tulajdonsággal rendelkező ágensek attenuált formáinak felhasználásával próbálták meg biztonságos onkológiai eszközt létrehozni.

Kutatási programunk során ez utóbbi törekvéshez kívántunk hozzájárulni, amennyiben a Newcastle betegség vírus egy onkolitikus célra már alkalmazott attenuált variánsának – az MTH-68/H – hatékonyságát illetve onkolitikus hatásának mechanizmusát kíséreltük meg a korábbiaktól eltérően megközelíteni. Kísérletsorozatunk célja az onkoterápiás ágens *in vitro* körülmények közötti vizsgálata, a különböző szöveti eredetű daganatsejtek fogékonyságának meghatározása, illetve a fertőzés intracelluláris elemekre gyakorolt hatásának jobb megismerése volt. Vizsgálatsorozatunkban sikerült bizonyítanunk, hogy a Newcastle betegség vírus MTH-68/H jelzésű izolátuma gátolja a különböző eredetű humán transzformált sejtvonalak proliferációját, de nem gyakorolt hatást patkány, egér és primér humán fibroblasztok szaporodására. Az MTH-68/H fertőzés során az *in vitro* tumor eredetű tenyészetek teljes pusztulását tapasztaltuk, bár a maximális citotoxikus hatás eléréséhez az egyes sejttípusok kapcsán eltérő sejt:vírus arány alkalmazása bizonyult szükségesnek. A citotoxicitási adatok elemzésével sikerült meghatároznunk az egyes tumoros sejtvonalak relatív érzékenységét. Az MTH-68/H fertőzés során tapasztalt sejtpusztulás során az *apoptózis* morfológiai – sejtsugorodás, apoptotikus testek megjelenése – és biokémiai – DNS-fragmentáció és TUNEL pozitivitás, kaszpáz-3 aktiváció – jegeit mutattuk ki; a tapasztalt masszív sejtpusztulás hátterében tehát – legalább részben – az MTH-68/H kiváltotta apoptotikus folyamatok húzódnak meg. Az MTH-68/H fertőzés hatására megjelenő apoptózis kiváltásához a fogékony sejtek rövid idejű – 60 perces – expozíciója is elegendőnek tűnik, melyet az apoptózisban kiteljesedő biológiai válasz 72 órán belül az egész tenyészetre kiterjedő mértékben követ. A folyamat során a paramyxovírusokra jellemző szöveti elváltozások – nagymértékű vakuolizáció, sejtfúziók során kialakuló syntitiumok – szintén megfigyelhetők.

A transzformált sejtek fertőzését követően vírusreplikáció zajlik, melynek mértéke az egyes sejttípusok kapcsán meghatározott relatív érzékenységgel mutatott szoros összefüggést, míg az MTH-68/H rezisztens fibroblaszt kultúrákban a vírusszaporodás teljes mértékben gátolt. Úgy tűnik tehát, hogy az MTH-68/H replikációjának lehetősége és mértéke, valamint az MTH-68/H fertőzést követő sejtpusztulás között szoros kapcsolat lehet, bár az ok-okozati összefüggés egyelőre nem teljesen világos. Kísérleteink ugyanakkor egyértelműen rávilágítottak az MTH-68/H fertőzés direkt citotoxikus hatására. Bár a szakirodalom egyes *in vivo* vizsgálatok alapján a virális onkolízisért felelős folyamatokban nagy jelentőséget tulajdonít a fertőző ágensek hatására kibontakozó különféle immunológiai folyamatoknak, saját kísérleti rendszereink mentesnek tekinthetők azoktól az aktív sejtes immunológiai elemektől, amelyek az MTH-68/H fertőzés során tapasztalt sejtpusztulást mediálhatnak. Természetesen nem zárva ki a fertőzött sejtek citokin termelésének a vírusfertőzés hatására megjelenő apoptotikus válaszban betöltött lehetséges szerepét, adataink alapján egy, az onkoterápiás ágens és a célsejt közvetlen interakcióján alapuló onkolitikus hatás látszik körvonalazódni. Adataink alapján úgy tűnik, hogy az MTH-68/H fertőzést követő apoptotikus válasz iniciációjában sem a kaszpáz-8/extrinsic, sem a kaszpáz-9/intrinsic kaszpáz kaszkád nem tekinthető elsődleges molekuláris mechanizmusnak.

Ugyancsak e feltevést tűnnek alátámasztani a citotoxicitási vizsgálataink során tapasztaltak is, hiszen amíg az apoptózis közvetlen morfológiai és biokémiai markereinek vizsgálata a fertőzött sejtek részéről egy relatíve gyors „apoptotikus döntés”-re engednek következtetni, addig a mitokondriális enzimek működésén alapuló méréseink időben jóval később jelzik a sejttényészetek pusztulását. Mindez arra utal, hogy az apoptotikus válaszreakcióra vonatkozó celluláris döntési és végrehajtási folyamatok időben megelőzik a mitokondriális oxido-reduktív enzimszerek károsodását. Bár az MTH-68/H fertőzés során kaszpáz-3 pozitív sejtek esetében e molekula aktivációját sikerült azonosítanunk, hasonlóan kétséges az MTH-68/H kiváltotta sejtpusztulásban az effektor kaszpáz-3 abszolút szerepe is, hiszen az MTH-68/H fertőzés a kaszpáz-3 deficiens MCF-7 sejt vonal számára is citotoxikus hatásúnak bizonyult. Az extrinsic és intrinsic kaszpáz utak MTH-68/H kiváltotta apoptózisban betöltött szerepét megkérdőjelező eredményeinkre az endoplazmatikus retikulum (ER) apoptotikus folyamatai szolgálhatnak magyarázatul. A kaszpáz-3 indukcióval jól korreláló kaszpáz-12 aktivációt sikerült kimutatnunk PC12 modellünkben, így az ER stresszhatásokra indukálódó apoptotikus folyamatok kaszpázainak kettős funkciója – a kaszpáz-12 iniciátor és effektor kaszpáz szerepét egyaránt leírták – értelmezhetővé tenné mind a kaszpáz-3 pozitív sejt vonalokban tapasztalt kaszpáz-8 és -9 független apoptotikus folyamatokat, mind a kaszpáz-3 deficiens MCF-7 sejtek pusztulását.

Az egyes alkalmazott sejt vonalak genotípusára vonatkozó adatok, valamint saját kísérleteink eredményeinek elemzése alapján az MTH-68/H kiváltotta apoptózist, mint p53-független mechanizmust azonosítottuk, mely eredményt klinikai szempontból különösen fontosnak tartunk. A p53 tumorszuppresszor daganatok progressziójában játszott szerepe ma már vitathatatlan. Egyre több adat áll rendelkezésünkre arra vonatkozólag is, hogy a p53 funkcióvesztő mutációi jelentősen fokozzák a daganatok hagyományos terápiákkal szembeni rezisztenciáját. Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy szabályozható p53 expresszióval rendelkező glioblastoma sejtekben az MTH-68/H-ra adott válaszban valódi eltérés nem mutatható ki sem p53-at expresszáló, sem p53 fehérjét nem tartalmazó sejtekben. Sőt, wtp53 allélok kifejező sejtekben sem kíséri az MTH-68/H fertőzést emelkedett p53 transzkripció aktivitás.

A p53-mal ellentétben, MTH-68/H fertőzött wtPC12 sejtekben mind a c-Myc, mind az NF κ B DNS kötődésének mértékében felfedeztünk változásokat. A *c-myc* onkogén terméke, a p53-hoz hasonlóan, több humán daganatban – ovarium, emlő és colorectalis tumorok, kissejtes tüdőrák, lymphomák – megtalálható, sejtbiológiai hatásai pedig a p53-éval csaknem megegyezően széles skálán mozognak. Klinikai szempontból lényeges, hogy a c-Myc dereguláció mértéke – mely jellemzően amplifikáció vagy fokozott transzkripció eredménye –, illetve az egyes tumorok malignitása szoros összefüggésben van. A c-Myc jelentős emelkedést mutat már az MTH-68/H fertőzés 4. órájától kezdődően és hasonló, bár talán kissé árnyaltabb c-Myc aktivitás figyelhető meg MTH-68/H kezelt HCT-116 tenyészetek EMSA vizsgálata során is. A szakirodalom jelenleg a c-Myc pro-apoptotikus irányú működését az apoptózis intrinsic jelpályáiban megtalálható elemekhez, elsősorban a mitokondriális citokróm-c kiáramláshoz és az azt követő kaszpáz-9 aktivációhoz köti. Így azonban, a gél-retardációs vizsgálataink során látott, MTH-68/H fertőzés alatt zajló c-Myc aktivitás relevanciája egyelőre nem világos.

Egyrészt, az általunk eddig e szempontból tanulmányozott, MTH-68/H fertőzött tumorsejtekben fellépő c-Myc aktivitás – a bemutatottakhoz hasonlóan, egységes képet mutatva – minden esetben kimutatható volt, másrészt viszont ezt nem kíséri az aktivált kaszpáz-3 akkumulációt megelőző kaszpáz-9 aktiváció.

Az NF κ B, mely a kísérleti szituáció függvényében egyaránt lehet pro- és anti-apoptotikus hatású is, ugyancsak az antivirális folyamatok egyik fontos mediátora. Kísérleteinkben e transzkripció faktor aktivációját ugyancsak megfigyeltük, mind MTH-68/H fertőzött PC12, mind Hela sejtekben, bár mind az aktiváció kinetikája, mind a képződő DNS-kötő komplexek összetétele eltérő. Érdekes, hogy amíg az MTH-68/H iránt nagyobb érzékenységet mutató HeLa sejtekben az NF κ B aktiváció csak a fertőzés 8. óráját követően mutatható ki, addig az NF κ B DNS-kötődésének mértéke az MTH-68/H iránt kisebb fogékonyságot mutató PC12 sejtekben már a fertőzés 2. óráját követően megfigyelhető. Megfigyeléseinkre több elméleti magyarázat is adódik. Elképzelhető, hogy az irodalmi adatokkal összhangban, az NF κ B, a fertőzött sejtípustól függően, az MTH-68/H fertőzés során is lehet pro- illetve anti-apoptotikus hatású. Ugyanakkor az sem kizárható, hogy az NF κ B alapvetően anti-apoptotikus hatása HeLa sejtekben késleltetett vagy gátolt, így téve a HeLa sejteket az MTH-68/H fertőzés iránt fogékonyabbá, míg PC12 sejtekben a relatíve prompt megjelenő NF κ B aktiváció valamelyest késlelteti az MTH-68/H infekcióra kibontakozó apoptotikus választ, melyet különböző kísérleti összeállításainkban csökkent MTH-68/H iránti érzékenységgént észlelünk. Minthogy a célsejtek NF κ B státusza akár döntően is befolyásolhatja az MTH-68/H fertőzésre adott válaszreakciókat, az NF κ B lehetséges szerepének tisztázása mindenképp fontosnak tűnik.

Megfigyeléseink mindenképp felhívják a figyelmet az MTH-68/H fertőzést követő sejtpusztulás hátterében kibontakozó apoptotikus folyamatokra. Úgy tűnik, hogy ezek középpontjában a sejtek transzlációs gépezetéhez, illetve az endoplazmatikus retikulum rendszerhez szorosan kötődő szabályozó mechanizmusok helyezkednek el. Az MTH-68/H fertőzést követő gyors PERK aktivációt – az adott sejt relatív MTH-68/H érzékenységgel korreláló módon, a megfigyelt eIF2 α foszforilációs események alapján – néhány órával később feltehetően a fehérjeszintézis egyensúlyának felborulása és az aktív kaszpáz-12 endoplazmatikus retikulumból történő felszabadulása, majd a kaszpáz-3 aktivációja követheti. Elképzelhetőnek tűnik, hogy a transzformált sejtek fokozott fehérjeszintézise miatti ER-túlterheltség jelenti azt a közös tulajdonságot, amely a vizsgált sejtvonalakat fogékonyá teszi az onkolitikus vírusfertőzések iránt. A túlterhelt ER sebezhetőbb egyensúlyának megbomlását könnyen előidézhetheték az eIF2 α foszforiláció hatására a fehérjeszintézis mintázatában bekövetkező változások, melyek végül a kibontakozó ER-stressz válasz eseményein keresztül a sejtek pusztulásához vezethetnek.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Munkám során a legnagyobb segítséget **Dr. Fehér Virág** nyújtotta. Köszönöm!

Ehelyütt is illik köszönetet mondanom témavezetőmnek, *Dr. Szeberényi József* egyetemi tanárnak, akinek szakmai támogatása nélkül nem ölthetett volna formát dolgozatom. Köszöneti illeti *Dr. Csatóry Lászlót* és a United Cancer Research Institute valamennyi munkatársát a rendelkezésemre bocsájtott kísérleti vakcináért és sokrétű támogatásukért, valamint *Vecsernyés Mónikát, Kiss Györgynét, Schäffer Rudolfnét, Dr. Lomniczi Bélát* és *Dr. Sáfrány Gézá*t a kísérleti munkám során nyújtott segítségükért.

KÖZLEMÉNYEK

Fábián Zs., Törőcsik B., Kiss K., Csatóry L., Bodey B., Tigyi J., Csatóry, C., Szeberényi, J., Induction of apoptosis by a Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Anticancer Research*. 2001. Jan-Feb;21(1A):125-35. IF: 1,347 Citáció (idegen/összes): 5/6

Szeberényi J., **Fábián Zs.**, Törőcsik B., Kiss K., Csatóry L., Newcastle Disease Virus-induced Apoptosis in PC12 Pheochromocytoma Cells. *American Journal of Therapeutics*. 2003. Jul-Aug;10(4):282-8.

Csatóry L. K., Gosztanyi G., Liszka V., **Fábián Zs.**, Szeberényi J., Csatóry C. M., MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *Journal of Neuro-oncology* 2004. Mar-Apr;67(1-2):83-93 IF: 1,568 Citáció (idegen/összes): 10/12

Fábián Zs., Vecsernyés M., Pap M., Szeberényi J., The effects of a mutant p53 protein on the proliferation and differentiation of PC12 rat pheochromocytoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2006. DOI: 10.1002/jcb.21019 Megjelenés alatt IF.: 2,946

Fábián Zs., Csatóry C. M., Csatóry L. K., Szeberényi J., p53 Independent Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Cytotoxicity of a Newcastle Disease Virus Strain in Tumor Cell Lines. *A kézirat bírálat alatt.*

SZABADALMI BEADVÁNYOK

CSATARY, Laszlo, K.; SZEBERENYI, Joseph; **FABIAN, Zsolt**, Method for treating human tumor cells with a Newcastle disease virus strain and a chemotherapeutic agent. World Intellectual Property Organization, June 9, 2005, International publication number: WO 2005/051433 A1

CSATARY, Laszlo, K.; SZEBERENYI, Joseph; **FABIAN, Zsolt**, Method for treating human tumor cells with a Newcastle disease virus strain having a p53-independent oncolytic effect. World Intellectual Property Organization, June 9, 2005, International publication number: WO 2005/051330 A2