

Bachrati Csanád:

**Sejtciklus ellenőrzőpontok vizsgálata
malignusan transzformált rágcsálósejteken**

Ph.D. Értekezés



*A Ph.D. értekezésben bemutatott munkát a JATE TTK Molekuláris és Sejtbiológiai Program keretében, az MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetének Emlőssejt Genetikai Csoportjában, **Raskó István** témavezetése mellett végeztem*

1999.

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	i
A dolgozatban használt rövidítések jegyzéke.....	iv
1. Bevezetés.....	1
2. Köszönetnyilvánítás.....	2
3. Elméleti áttekintés.....	3
3.1. Az EUKARIÓTA SEJTCIKLUS ÉS SZABÁLYOZÁSA.....	3
3.1.1. A sejtciklus szakaszai.....	3
3.1.2. A sejtciklust szabályozó kinázok és foszfatázok.....	4
3.1.2.1. A <i>XENOPUS</i> OOCITÁK ÉRÉSÉT ÉS AZ EMLŐSSEJTEK MITÓZISBA LÉPÉSÉT KÖZÖS FAKTOR SZABÁLYOZZA.....	4
3.1.2.2. A MPF PROTEIN KINÁZ ENZIM, AMELYNEK AKTIVITÁSA TÖBB SZINTEN SZABÁLYOZOTT.....	5
3.1.2.2.1. A CDK katalitikus alegysége.....	6
3.1.2.2.2. A CDK aktivitás elsődleges regulátora a ciklin alegység.....	6
3.1.2.2.3. A CDK foszforiláció általi aktiválása.....	6
3.1.2.2.4. A CDK aktivitás gátlása foszforilációval.....	7
3.1.2.2.5. CDK gátlás inhibitor alegységek kötődése által.....	8
3.1.2.3. Az EMLŐS SEJTCIKLUS KÜLÖNBÖZŐ SZAKASZAIT MÁS ÉS MÁS CDK/CIKLIN KOMPLEXEK SZABÁLYOZZÁK.....	9
3.1.3. A sejtciklus ellenőrzőpontok.....	9
3.1.3.1. MEGFELELŐ-E A TÁPANYAGELLÁTÁS?.....	10
3.1.3.2. MEGFELELŐ-E A SEJTEK MÉRETE?.....	10
3.1.3.3. A REINICIÁCIÓS ELLENŐRZŐPONT.....	10
3.1.3.4. A DNS KÁROSODÁSOK G2 ELLENŐRZŐPONTJA.....	10
3.1.3.5. Az S FÁZISOS ELLENŐRZŐPONT.....	11
3.1.3.6. A DEKATENÁCIÓS ELLENŐRZŐPONT.....	11
3.1.3.7. A MITOTIKUS ELLENŐRZŐPONT.....	12
3.2. A KÉMIAI REVERZ TRANSZFORMÁCIÓ.....	13
3.2.1. A cAMP metabolizmus változásai <i>in vivo</i> és <i>in vitro</i>	13
3.2.2. Sejttípusok.....	13
3.2.3. A reverz transzformáció időbeli lefutása.....	14
3.2.4. A sejtek szaporodása.....	14
3.2.4.1. Ciklusidő, telítési sejtsűrűség.....	14
3.2.4.2. A SZAPORODÁS SŰRŰSÉG FÜGGÉSE.....	15
3.2.4.3. A SZAPORODÁS LETAPADÁS FÜGGÉSE, AZ ALJZATHOZ TAPADÁS ERŐSSÉGE.....	15
3.2.4.4. <i>IN VIVO</i> TUMOR KÉPZÉS.....	15
3.2.5. A sejtek morfológiája.....	15
3.2.6. A sejtfelszín.....	16
3.2.6.1. A SEJTMEMBRÁN FELSZÍNI STRUKTÚRÁI, MEMBRÁNDINAMIKA.....	16
3.2.6.2. PERMEABILITÁS VÁLTOZÁSOK, TRANSPORTFOLYAMATOK.....	16
3.2.6.3. A SEJTFELSZÍNI GLÜKOPROTEINEK, GLÜKOLIPIDEK.....	17
3.2.6.4. AGGLUTINÁLHATÓSÁG.....	17
3.2.6.5. ANTITEST + KOMPLEMENT.....	17
3.2.6.6. A SEJTEK KÖZÖTTI KOMMUNIKÁCIÓ, METABOLIKUS KOOPERÁCIÓ.....	17
3.2.7. Extracelluláris matrix.....	17
3.2.7.1. FIBRONEKTIN.....	17
3.2.7.2. FIBRONEKTIN RECEPTOR.....	18
3.2.7.3. KOLLAGÉN.....	18
3.2.8. A citoskeleton.....	18
3.2.9. Anyagcsere.....	19
3.2.10. Fehérje foszforilációs változások.....	19
3.2.11. Fehérje mintázat, enzimaktivitás és génaktivitás változások.....	20
3.2.12. Kromatinszerkezet.....	23
3.2.13. Retinsav.....	23
3.2.14. Gyógyászati perspektívák.....	24
4. Célkitűzések.....	25
5. Anyagok és módszerek.....	26
5.1. ANYAGOK.....	26
5.1.1. Mikrobiológiai táptalajok és pufferek.....	26

5.1.2. Sejtenyésztéshez használt anyagok.....	26
5.1.3. Molekuláris biológiai munkákhoz használt vegyszerek.....	26
5.2. MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK.....	27
5.2.1. Restriktációs emésztések.....	27
5.2.2. Fragmentált DNS elválasztása gélelektroforézissel.....	27
5.2.3. Ligálási reakció.....	27
5.2.4. Escherichia coli transzformálása plazmiddal.....	27
5.2.5. Plazmid kinyerése forralásos módszerrel.....	27
5.2.6. Plazmid preparálása nagy mennyiségben.....	28
5.2.7. λ fág DNS preparálás.....	28
5.2.8. Genomiális DNS preparálása sejt kultúra sejtjeiből.....	28
5.2.9. RNS preparálás sejt kultúra sejtjeiből.....	29
5.2.10. DNS Southern blott.....	29
5.2.11. RNS Northern blott.....	29
5.2.12. DNS radioaktív jelölése.....	29
5.2.13. Hibridizáció.....	29
5.2.14. Kolónia hibridizáció.....	30
5.3. SEJTBiológiai módszerek.....	30
5.3.1. Sejtenyésztés.....	30
5.3.2. Kromoszómapreparálás.....	31
5.3.3. Mitotikus ellenőrzőpont vizsgálat I.....	31
5.3.4. Mitotikus ellenőrzőpont vizsgálat II.....	32
5.3.5. Mitotikus ellenőrzőpont vizsgálat III.....	32
5.3.6. Mitotikus ellenőrzőpont vizsgálat IV.....	32
5.3.7. CHO sejtek transzfecciója elektroporálással.....	32
5.3.8. Korai kromoszómakondenzáció indukálása (PCC).....	33
5.3.9. Sejtenyésztés lágyagarban.....	33
5.3.10. Szomatikus sejt fúziós hibridek előállítása.....	34
5.4. GÉNEXRESSZIÓS MINTÁZATOK ÖSSZEHOSONLÍTÁSA.....	34
5.4.1. Differential Display.....	34
5.4.2. A cDNS fajták klónozása és szekvenciáinak meghatározása.....	34
5.4.3. Szekvencia analízis.....	34
6. Eredmények.....	35
6.1. A REVERZ TRANSZFORMÁCIÓ HATÁSAI A GÉNEXRESSZIÓRA ÉS A SEJTCIKLUS ELLENŐRZŐPONTOKRA.....	35
6.1.1. Génexpressziós mintázat -beli változások CHO sejtek reverz transzformációja során - Northern blott vizsgálatok.....	35
6.1.2. Génexpressziós mintázat -beli változások CHO sejtek reverz transzformációja során - differential display vizsgálatok.....	36
6.1.2.1. A TRANSZFORMÁCIÓS FOLYAMATBAN RÉSZT VEVŐ, DE NEM ONKOGÉNUS GÉNEK.....	42
6.1.2.2. A TRANSZFORMÁCIÓS FOLYAMATBAN RÉSZT VEVŐ, FELTEHETŐEN ONKOGÉNUS GÉNEK.....	45
6.1.3. A reverz transzformáció hatása a sejt ciklus ellenőrző pontokra.....	48
6.2. ONKOGÉN TÚLTERMETTETÉSÉNEK HATÁSAI A SEJTCIKLUS ELLENŐRZŐPONTOKRA.....	49
6.2.1. Onkogén túltermeltetésre alkalmas expressziós plazmidkonstrukciók építése, és stabil túltermelő sejt vonalak létrehozása.....	49
6.2.2. Az onkogén túltermeltetésének hatása a morfológiára és a reverz transzformálhatóságra.....	52
6.2.3. Az onkogén túltermeltetésének hatása az S fázisos ellenőrzőpont működésére.....	54
6.2.4. A src túltermeltetés S fázisos ellenőrzőpontot befolyásoló hatása további kérdéseket vet fel.....	56
6.2.5. A CHO-K20 sejt vonal és származékai nem mutatják az S fázisos blokk és koffein kezelés okozta korai kromoszómakondenzációt.....	58
6.2.6. Az onkogén túltermeltetésének hatása az M fázisos ellenőrzőpont működésére.....	61
6.3. A TRANSZFORMÁLT RÁGCSÁLÓSEJTEK SEJTCIKLUS ELLENŐRZŐPONTJAINAK HIBÁJÁT EGYES HUMÁN KROMOSZÓMÁK JELENLÉTE KOMPLEMENTÁLJA SZOMATIKUS SEJTHIBRIDÉKBEN.....	62
6.3.1. A 11-es kromoszómás monoszómikus hibridek S fázisos ellenőrzőpontja ép.....	62

6.3.2. A 15-ös kromoszómás monoszomikus hibridek mitotikus ellenőrzőpontja helyreállt	63
6.3.3. Kísérletek a mitotikus ellenőrzőpont helyreállításáért felelős, 15-ös kromoszómás gén izolálására	65
6.3.3.1. CHO SEJTEK TRANSZFEKCIÓJA 15-ÖS KROMOSZÓMA SPECIFIKUS A GÉNKÖNYVTÁRRAL	65
6.3.3.2. A MITOTIKUS ELLENŐRZŐPONT GÉN FINOMABB TÉRKÉPEZÉSE RADIÁCIÓS HIBRIDSEJTEKKEL	67
7. Diskusszió	69
7.1. GÉNEXPRESSZIÓS KÜLÖNBSEGEK TUMORIGENIKUS ÉS REVERZ TRANSZFORMÁLT CHO SEJTEK KÖZÖTT	69
7.1.1. NADH-ubikinon-oxidoreduktáz 4-es lánc	69
7.1.2. 40S riboszómális alegység S18-as fehérje	70
7.1.3. Monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1)	70
7.1.4. p27BBP/eIF6	70
7.1.5. Krit1	71
7.2. ONKOGÉNEK TÚLTERMELTETÉSÉNEK HATÁSA A SEJTCIKLUS ELLENŐRZŐPONTOK MŰKÖDÉSÉRE	72
7.3. A CHO SEJTEK "HUMANIZÁLÁSA"	73
8. Összefoglalás	74
9. Idézett irodalom	75
10. Publikációs lista	82
10.1. KÖZLEMÉNYEK	82
10.2. POSZTEREK	83
10.3. ELŐADÁSOK	84
11. Summary	85
11.1. INTRODUCTION	85
11.2. THE AIM OF THESE STUDIES	86
11.3. RESULTS AND DISCUSSION	87
11.3.1. Identification of genes the expression of which changes parallel to reverse transformation	87
11.3.2. At least two known cell cycle checkpoint functions correlate with rodent origin and transformed status	88
11.3.3. Chromosome 11 and 15 restores the deficiency of the S phase and mitotic checkpoints in somatic hybrid cells	89
11.4. REFERENCES	89
12. Összefoglalás	90
12.1. ELMÉLETI ÁTTEKINTÉS	90
12.2. CÉLKITŰZÉSEK	91
12.3. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK	92
12.4. EREDMÉNYEK	92
12.4.1. A reverz transzformáció hatásai a génexpresszióra	92
12.4.2. A reverz transzformáció hatásai a sejtciklus ellenőrzőpontjaira	93
12.4.3. Onkogének túltermeltetésének hatásai a sejtciklus ellenőrzőpontjaira	94
12.4.3.1. ONKOGÉN TÚLTERMELTETÉSRE ALKALMAS EXPRESSZIÓS PLAZMIDKONSTRUKCIÓK ÉPÍTÉSE, ÉS STABIL TÚLTERMELŐ SEJTVONALAK LÉTREHOZÁSA	94
12.4.3.2. AZ ONKOGÉNEK TÚLTERMELTETÉSÉNEK HATÁSA A REVERZ TRANSZFORMÁLHATÓSÁGRA	94
12.4.3.3. A REVERZ TRANSZFORMÁCIÓ ÉS AZ ONKOGÉNEK TÚLTERMELTETÉSÉNEK HATÁSA AZ S ÉS M FÁZISOS ELLENŐRZŐPONT MŰKÖDÉSÉRE	94
12.4.4. A transzformált rágcsálósejtek sejtciklus ellenőrzőpontjainak hibáját egyes humán kromoszómák jelenléte komplementálja szomatikus sejthibridekben	95
12.5. IDÉZETT IRODALOM	95

A dolgozatban használt rövidítések jegyzéke

APC	<i>anaphase promoting complex</i>
ASV	<i>avian sarcoma virus</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BGH	<i>Bovine growth hormon</i>
Bt ₂ cAMP	N ⁶ ,O ^{2'} -dibutiril-adenozin-3':5'-ciklikus monofoszfát
cAMP	adenozin 3':5' ciklikus monofoszfát, ciklikus AMP
CDK	ciklin dependens kináz
CHL	<i>Chinese hamster lung</i> : kínaihörcsög tüdő FB
CHO	kínaihörcsög ovárium sejt (<i>Chinese hamster ovary</i>)
CKI	ciklin dependens kináz inhibitor
DBMA	7,12-dimetilbenz(a)antracén
DHFR	dihidrofolát reduktáz
EST	<i>expressed sequence tag</i> , cDNS klóntárból random módon kiválasztott klónok szekvenciái
FB	fibroblaszt
FCS	<i>fetal calf serum</i> : szarvasmarha embrionális vérsavó
GAPDh	gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GCG	<i>Genetics Computer Group, university of Wisconsin</i>
HTG	<i>high throughput genomic</i> , általában BAC vagy YAC klónokból származó hatalmas genomális szekvenciák; a genom <i>projectek</i> "termelik"
KonA	Konkanavalin A
LDH	laktát dehidrogenáz
MCP-1	Monocita kemoattraktáns protein 1
MF	primér egér fibroblaszt
MIX	metil-izobutil-xantin
NBCS	<i>newborn calf serum</i> : újszülött borjú vérsavó
ODC	ornitin dekarboxiláz
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> : Ca ²⁺ és Mg ²⁺ mentes foszfátpuffer
PCC	<i>premature chromosome condensation</i> : korai kromoszóma kondenzáció
PDE	ciklikus nukleotid foszfodiészteráz
PEPCK	foszfoenol-piruvát karboxikináz
PI	propidium jodid
PKA	cAMP függő protein kináz
RPE	<i>relative plating efficiency</i> : a kezelt sejtek által képzett kolóniák száma a kezeletlen sejtek kolóniaszámának százalékában
SDS	Na dodecil-szulfát

1. Bevezetés

Dolgozatom annak a munkának az összefoglalása, amelyet 1994 tavasza óta végeztem a Szegedi Biológiai Központ (SZBK) Genetikai Intézetének Emlősajt Genetikai Csoportjában, Raskó István vezetésével.

Egyetemi diplomám megszerzésétől (1991) 1994 áprilisáig az SZBK Biokémiai Intézetének Kötőszövet Munkacsoportjában dolgoztam, itt írtam diploma dolgozatomat is "A csirke porc kapcsolófehérje gén expressziójának analízise" címmel. Az ott töltött évek alatt megismerkedtem a molekuláris biológia alapvető eszköztárának jelentős részével, a sejtenyésztés alapjaival valamint a génextpressziós szabályozás vizsgálati módszereivel. Munkám eredményeit öt nemzetközi konferencián mutattuk be poszteren, ezek közül háromnak az absztraktja rangos nemzetközi folyóirat mellékleteként is megjelent {1500, 1501, 1502}; továbbá két cikkben {394, 1492} vagyok társszerző.

Érdeklődésem azonban a biológiai más területeire is elvezetett. Az SZBK Genetikai Intézetében Alföldi Lajos professzor mellett baktérium genetikai térképezések számítógépen történő modellezését végeztük, és a tényleges kísérletek során fellépő érdekes torzulásokra sikerült rámutatnunk {1494}.

Raskó professzor munkacsoportja kezdetektől fogva fontos feladatának tekinti egyes genetikai betegségek molekuláris diagnosztikájának kidolgozását, illetve a molekuláris diagnosztikai módszerek alkalmazását. A Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Gyermekek- és Neurológiai klinikáival, valamint a gyulai Pándy Kálmán Kórház I. sz. Belgyógyászati Osztályával kollaborációban a Duchenne/Becker féle muszkuláris disztrófia, a cisztikus fibrózis, a Huntington féle vitustánc és a tireoid karcinómák molekuláris diagnosztikájának kidolgozásában vettem részt. Eredményeinket nemrég publikáltuk {1505, 1237, 1512}.

Doktori disszertációm eredményeit két közleményben {681, 1436} és két nemzetközi konferencia absztraktban {846, 1503} publikáltuk. Ezen kívül, mivel a már közölt eredményekkel szorosan kapcsolódik, belevettem rengeteg még nem publikált eredményt is, amelyek egyben további kutatásaink irányát is kijelölik.

A dolgozat írásakor igyekeztem kerülni a laborszlangban alkalmazott kifejezéseket, azonban ez nem mindig sikerült. Nem vállalkozhattam ugyanis arra, hogy pontos magyar kifejezéseket alkossak azok helyett, amelyeket angol megfelelőjük tükörfordításával alkottunk és használunk a laboratóriumban, mint például a sejtek "felkerekedése" (*round up*); "kilemezése" (*plating, seeding*); "blokkolása" (*arrest, block*); (fel)tripszinezése, a felszín "bütykei" (*blebs, knobs*) és "fodrosodása" (*ruffling*), vagy az angoltól átvett "blott" szó, amelyet nem is tudunk helyettesíteni, angolul egy t-vel írunk és magyarul tt-vel mondunk (és ezért tt-vel írva használom a dolgozatban).

Hasonlóképpen magyarázatra szorul a hivatkozások számozása is. A csoportban a feldolgozott cikkeket irodalmi adatbázisban tartjuk nyilván, ami mind a cikkek fellelésében, mind kéziratunk írásakor igen nagy segítséget nyújt. A dolgozatban a hivatkozásokhoz a cikkek azonosító számait használtam, ami nagyban megkönnyíti, hogy a későbbiek során a megfelelő különlenyomatot sziszifuszi keresgélés nélkül azonnal megtalálhassuk.

2. Köszönetnyilvánítás

Eddigi pályafutásom és a dolgozat megírása során nyújtott segítségükért hálás köszönettel tartozom:

Édesapámnak, aki állatorvosként a biológia és az élővilág szeretetét belém oltotta, és a pálya felé elindított,

Raskó Istvánnak, aki csoportvezetőként megteremtette a csoportban folyó munkák anyagi hátterét, tudományosan összefogta a sokszor roppant szerteágazó munkát; akinek széles látókörére és tájékozottságára bármely tudományos problémában számíthattunk, és a legjobb barátként segített, ha szükségünk volt rá. Nem utolsósorban pedig azért, mert kitüntetett bizalmával akkor, amikor pályafutásom megtorpant. Remélem azóta sikerült e bizalmat megszolgálnom.

Professor C. Stephen Downes-nak akivel közös pályázatunk munkám elméleti és anyagi bázisát biztosította, és hogy laboratóriumában Cambridge-ben és Coleraine-ben vendégként dolgozhattam,

Zákány Józsefnek és Deák Ferencnek, akik kezdeti botladozásaimat irányították, és végül megtanítottak az önálló kutatómunkára,

Fekete Endréné, Fekete Ildikó, Lehőcz Istvánné, Radóné Dudás Mária, Simon Ferencné és Vörös Andrea asszisztenseknek, akik nem csak azoknak a laboroknak a működőképességét tartották fenn, ahol dolgoztam, hanem rengeteg kísérletes munkát is végeztek velem, nekem, helyettem; és akiktől az alapvető technikákat megtanultam,

Borda Stefánia, Csiszár Ágnes, Czibula Ágnes, Endreffy Emőke, Gerencsér Ákos, Jakab Katalin, Kalmár Tibor, Mórocz Mónika, Sántha Miklós, Somodi Zsolt, S. Jayne Devlin és Zvara Ágnes, jelenlegi és egykori kollégáimnak, hogy munkatársaim voltak és hogy mind fizikai, mind szellemi segítségükre bármikor számítani lehetett,

Pálmai-Pallag Tímeának és Mariana Toma-nak a mitotikus ellenőrzőpont vizsgálatokban nyújtott segítségükért,

Duda Ernőnek és Kiss Istvánnak, hogy dolgozatomat átnézve segítettek azt végző formába önteni,

Professzor Dr Kiss Ibolyának, aki emberségből és kollegialitásból egy életre szóló példát nyújtott,

Alföldi Lajos professzornak, hogy a genetikai modell megalkotásával kapcsolatos munkába bevont, amely első közleményem anyagát is képezte; valamint, hogy a nehéz időkben mellém állt,

Hadlaczky Gyulának, hogy a monoszómikus sejtvonalakat rendelkezésünkre bocsátotta,

Cserpán Imrének az ALU *repeat* és Kpn *repeat* konstrukciókért,

Páy Anikónak és Kószó Zsuzsának a cDNS klónok szekvenálásáért,

Páy Anikónak, Szabó Gábornénak és Kotogány Editnek az áramlási citometriás mérésekért,

Tóth Sándornénak, Mitrov Etelkának, Borka Andrásnak és B Nagy Balázsnak ábráim kidolgozásáért,

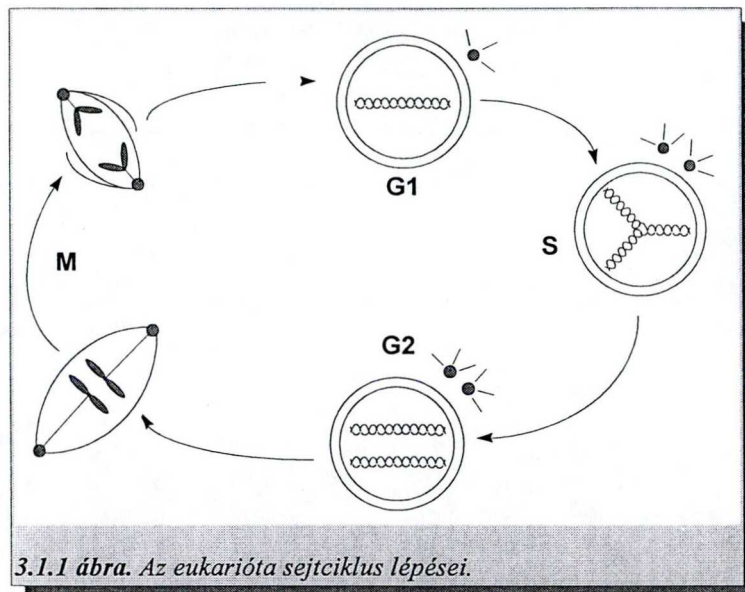
Végül, de nem utolsósorban a családomnak, hogy mindezt türelemmel viselte.

3. Elméleti áttekintés

3.1. AZ EUKARIÓTA SEJTCIKLUS ÉS SZABÁLYOZÁSA

3.1.1. A sejtciklus szakaszai

Az eukarióta sejtciklust a fénymikroszkópos vizsgálatok alapján két szakaszra, az interfázisra és a mitózisra osztották. A vizsgálati módszerek tökéletesedésével az interfázist további három szakaszra, a preduplikációs G₁, a szintetikus S és posztduplikációs G₂ szakaszra választották szét (3.1.1 ábra). Ezen kívül a sejtek lehetnek a nyugalmi G₀ fázisban. Ebben a fázisban szoktak megmaradni azok a sejtek amelyek gya-



3.1.1 ábra. Az eukarióta sejtciklus lépései.

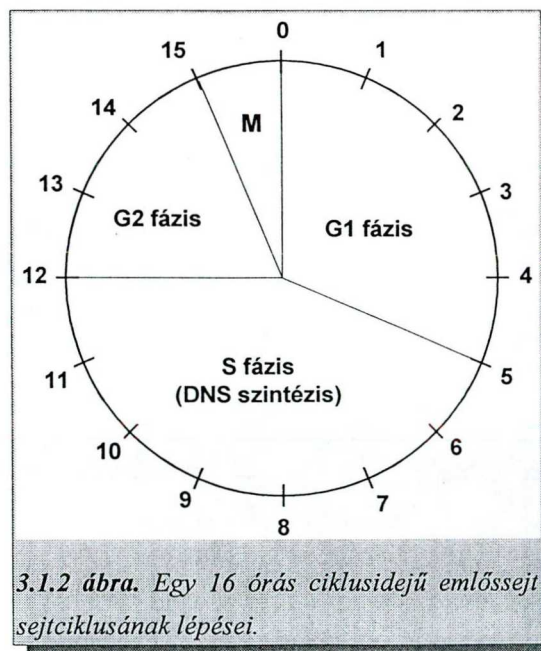
korlatilag egyáltalán nem, vagy csak nagyon ritkán osztódnak, de elvileg osztódásra készíthetők. Így G₀ fázisban van az idegsejt *in vivo*, de sejtenyészetben részben dedifferenciálódva osztódhat, vagy a limfocita, amely bizonyos anyagok (antigének, lektinek) hatására osztódásnak indul.

Egy átlagos emlős sejt generációs ideje 16 óra, ebből az interfázis mintegy 15 órát vesz igénybe, míg a fennmaradó egy órában játszódik le a mitózis és a citokinesis, a tulajdonképpeni sejtosztódás (3.1.2 ábra).

A szintetikus fázis leglényegesebb pontja a DNS replikációja, azonban számos egyéb komponensnek, nukleotidoknak, és a DNS-hez csatlakozó egyéb molekuláknak (hisztonok, poliaminok...) is ekkor kell megszintetizálnia. A centriólumok duplikációja közvetlenül az S fázist megelőzően játszódik le.

Az osztódási fázis a kromoszómák megjelenésével kezdődik. A profázis elején a centriólumok a sejt két pólusára vándorolnak, és a mikrotubulusok minden irányba kisugarazva a centriólumokból asztereket formálnak. A kinyúló mikrotubulusok összessége, a hozzájuk asszociált fehérjékkel együtt a mitotikus orsó.

A mikrotubulusok egy része alkotja azt a hálózatot amely összeköti a két centriólumot miközben azok vándorolnak a pólusok felé, más mikrotubulusok a kinetochorokon keresztül a kromoszómák centromerjeihez kapcsolódnak. Ezek a régiók katalizálják a kromoszómák vándorlását a mikrotubulusok mentén. A profázis végére a maghártya lebomlik, a kromoszómák megrövidülnek, kondenzáltabbá válnak. A metafázis során a mikrotubulusokhoz kapcsolódott kromoszómák a sejtek egyenlítői síkjába rendeződnek. Az



3.1.2 ábra. Egy 16 órás ciklusidejű emlőssejt sejtciklusának lépései.

anafázis alatt a leánykromatidák elválnak egymástól, és a mikrotubulusok irányításával az ellenkező pólusok felé vándorolnak. A telofázis a szakasza a kromatidák dekondenzálódásának. A profázis alatt lebomlott magmembránból keletkezett vezikulák egyesülve felépítik a két leánysejt magját. Mindezzel párhuzamosan végbemegy a citoplazma és a membrán osztódása, a citokinézis.

Néhány különbség mutatkozik a növényi és állati sejtek mitózisa között. A legtöbb magasabbrendű növényi sejt nem tartalmaz centriólumokat, egy ezzel analóg régió szolgál mikrotubulus szervező központként. Ennek oka, hogy a növényi sejtet körülvevő sejtfa megakadályozza annak alakváltozását. A telofázis alatt a Golgi apparátusból származó fragmoplaszt vezikulákból új sejtfa formálódik.

Hasonlóképpen, különbségek tapasztalhatók a *Saccharomyces cerevisiae* és az állati sejtek mitotikus osztódása között, a sarjadzó élesztő sokkal egyszerűbb osztódási apparátussal rendelkezik. Az S fázist követően a sejtfa egy elvékonyodott régiójában a majdani leánysejt bimbózik elő, és fokozatosan növekszik. Az élesztősejtekben a centriólum helyett a magorsó pólustest (*spindle pole body*, SPB) található, amely úgy osztódik, mint az állati sejtek centrióluma, ezzel jelezvén a magosztódás kezdetét. A megkettőződött pólustestből az egyik a bimbóba vándorol, és a belőlük eredő magorsófonalak irányítják a kromoszómák vándorlását. Végül a bimbó elválik a szülői sejtől. Az élesztő anyasejt és leánysejt mind méreteit tekintve, mind pedig biokémiaailag eltérnek egymástól.

3.1.2. A sejtciklust szabályozó kinázok és foszfatázok

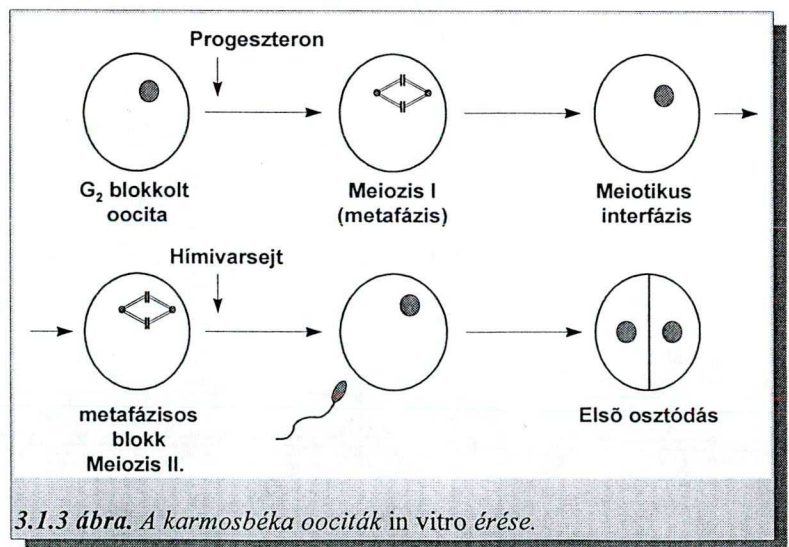
3.1.2.1. A XENOPUS OOCITÁK ÉRÉSÉT ÉS AZ EMLŐSSEJTEK MITÓZISBA LÉPÉSÉT KÖZÖS FAKTOR SZABÁLYOZZA

A sejtciklust szabályozó transz ható faktorok jelenlétére az első bizonyítékot emlős sejtekkel végrehajtott fúziós kísérletek szolgáltatták.

Ha G_1 , S vagy G_2 fázisos sejteket fuzionáltattak mitotikus sejtekkel, az interfázisos sejtek kromoszómái korai mitotikus kondenzációba (*premature chromosome condensation*, PCC; 6.2.21 ábra) kezdtek {680}. Ha G_1 sejteket fuzionáltattak S fázisos sejtekkel, a radioaktív timidin beépülése DNS szintézist jelzett a G_1 sejtmagban is {679}.

A mitózis aktiválásáért felelős

transz ható faktor azonosítását a *Xenopus laevis* fejlődő oocitáin végzett tanulmányok hozták meg. A béka ováriumában fejlődő oociták sejtciklusa a DNS replikációt követő G_2 fázisban leáll, és az oociták így is maradnak kb. 8 hónapig, mialatt 1 mm átmérőjűre növekednek. A hím karmosbéka stimulációjára a petefészek sejtjei progeszteront termelnek, melynek hatására a G_2 fázisban blokkolt sejtek belépnek a meiosis első szakaszába, majd azon végighaladva sejtciklusuk ismét leáll a meiosis második szakaszának metafázisában. A metafázisos blokkból a megtermékenyítés hatására lépnek ki, és fejezik be a meiozist. Az oocitaérés folyamata *in vitro* is előidézhető és tanulmányozható (3.1.3 ábra).

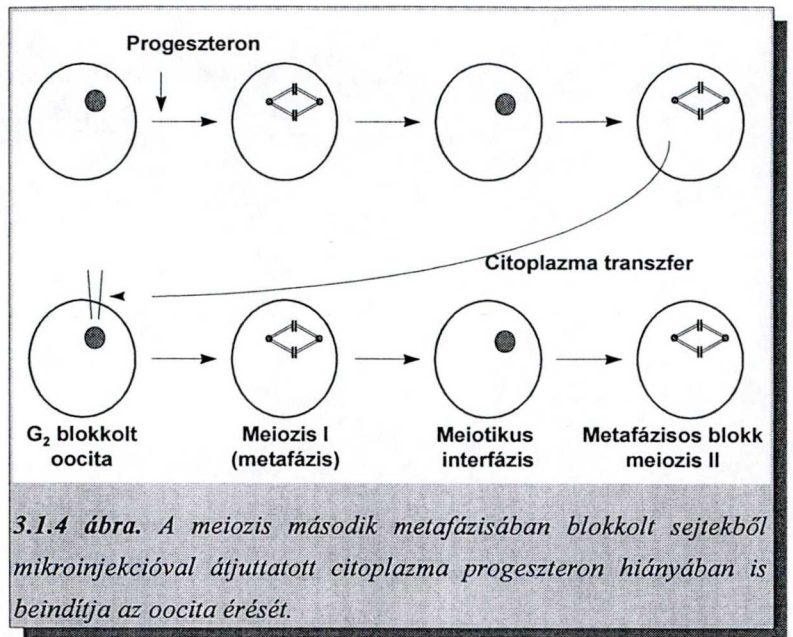


3.1.3 ábra. A karmosbéka oociták *in vitro* érése.

Ha a meiozis második szakaszának metafázisában blokkolt oocitákból mikroinjekcióval citoplazmát vittek át a G₂ blokkolt sejtekbe, az oociták progeszteron hiányában is megkezdték az érés folyamatát {678} (3.1.4 ábra). A meiozis második metafázisában blokkolt sejtekben jelenlévő anyagot érést serkentő faktornak, MPF-nek (*maturation promoting factor*) nevezték el.

A későbbi vizsgálatok során kiderült, hogy az MPF a mitózis beindításának is kulcstényezője. Ha egy

metafázisban blokkolt szomatikus emlőssejtből mikroinjekcióval citoplazmát juttattak át a G₂ fázisban blokkolt *Xenopus* oocitákba az oocita érését az is beindította. Amikor hasonlóképpen blokkolt emlőssejtből interfázisban emlőssejtekbe vittek át citoplazmát azok mitózisba léptek, jelezve, hogy a sejtfúziós kísérletekben szereplő transz ható faktor valóban az MPF.



3.1.4 ábra. A meiozis második metafázisában blokkolt sejtekből mikroinjekcióval átjuttatott citoplazma progeszteron hiányában is beindítja az oocita érését.

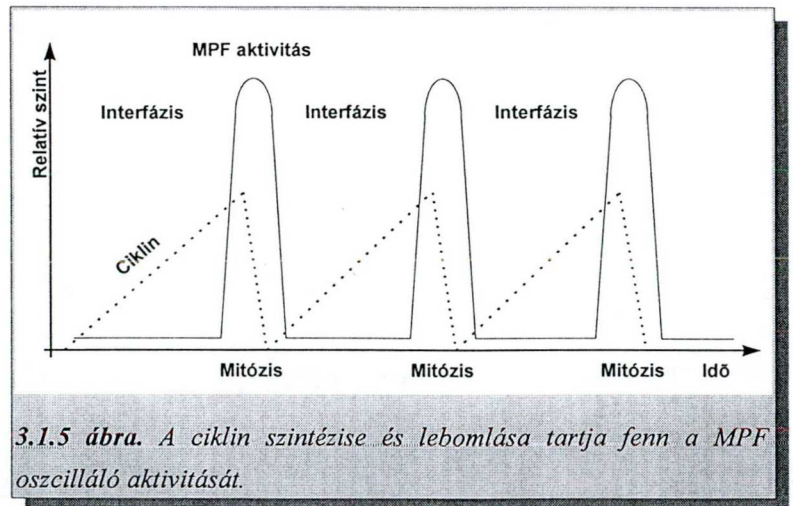
3.1.2.2. A MPF PROTEIN KINÁZ ENZIM, AMELYNEK AKTIVITÁSA TÖBB SZINTEN SZABÁLYOZOTT

Az MPF biokémiaiilag ciklin dependens protein kináz (CDK) enzim. Egyszerűbb rendszerben, mint amilyen a korai békaembrió, a CDK aktivitást egy biológiai oszcillátor szabályozza, amely teljesen független azoktól az eseményektől, amelyeket indukál, *in vitro* citoplazma extraktumban is működik (3.1.5 ábra).

Emlős- és élesztősejtekben további szabályozási lépcsők alakultak

ki, amelyek biztosítják, hogy a CDK aktivitás változásai (eképpen a sejtciklus eseményeinek beindítása) eltolódjanak mindaddig, amíg a növekedés feltételei szuboptimálisak, illetve a következő sejtciklus eseményt megelőző lépések még nem fejeződtek be. Eképpen, a legtöbb sejtben a CDK oszcillátort, habár megtartja valamelyes autonómiáját, intra- és extracelluláris jelek sokasága befolyásolja.

A sejtekben az inaktív CDK mennyiségileg többé-kevésbé állandó feleslegben van a normál sejtciklus során, és a katalitikus aktivitás szabályozása elsődlegesen poszttranszkripcionális. A CDK aktiválásához egy szabályozó alegység - ciklin - kötődése, valamint egy konzervált treoninjának CDK aktivátor kináz (CAK) általi foszforilációja szükséges. Az aktív CDK/ciklin komplex inaktíválható egy ugyancsak konzervált Thr/Tyr pár foszforilálásával, vagy CDK inhibitor alegységek (CKI) kötődésével {682}.



3.1.5 ábra. A ciklin szintézise és lebomlása tartja fenn a MPF oszcilláló aktivitását.

3.1.2.2.1. A CDK katalitikus alegysége

A CDK-k közeli rokonok mind méretüket (35-40 kDa), mind szekvenciájukat tekintve. Közös jellemzőjük, hogy ciklint kötnek, amely aktiváló, szabályozó alegységük. A CDK definíció nem jelent kizárólagos biológiai funkciót, és habár a legtöbb ismert CDK a sejtciklus szabályozásában játszik szerepet, a más egyéb folyamatokban részt vevő CDK-k listája folyamatosan bővül.

Sok protein kináz közeli rokonságban áll a CDK-kal, de csak viszonylag kevésről mutatták ki, hogy ciklin függő aktivitással bír. A *Schizosaccharomyces pombe* sejtekben egyetlen fő CDK-t azonosítottak (Cdc2); *S. cerevisiae*-ben a fő CDK (Cdc28) mellett nemrégiben egy második (PHO85) és egy harmadik (Kin28) kinázt is. Emberben a CDK-k növekvő listája az alapítótaggal (Cdc2, másképpen Cdk1) kezdődik és Cdk7-ig tart. Jelenlegi ismereteink a CDK-k szerkezetéről és funkciójáról nagyrészt a *S. pombe* prototípus Cdc2, a *S. cerevisiae* Cdc28, valamint a gerincesek Cdk2 jelű fehérjéin alapulnak.

A tipikus CDK katalitikus alegység 300 aminosavból álló *core* és foszforilálatlan monomerként inaktív. A humán Cdk2 három dimenziós kristályszerkezete mutatja, hogy inaktív állapotáért két fontos szerkezeti tényező felelős: 1) a szubsztrát kötő helyet a kinyúló T hurok lefedve tartja, 2) az ATP kötő hely alkotásában részt vevő aminosav oldalláncok úgy helyezkednek el, hogy az ATP foszfátcsoportjai a hatékony foszfát-transzferhez nehezen pozícionálhatóak. Mindezzel kapcsolatban nem sok ismeret gyűlt össze azokról a konformációs változásokról, amelyek a ciklin kötődésével illetve a foszforilációval járnak.

3.1.2.2.2. A CDK aktivitás elsődleges regulátora a ciklin alegység

A ciklineket eredetileg olyan fehérjékként definiálták, amelyek mennyisége oszcillál a sejtciklus során. Ma már sokkal pontosabban definiálva, azok a fehérjék tagjai e családnak, amelyek kötődnek, és aktiválják a CDK katalitikus alegységet. A ciklinek közti homológia gyakran csak egy viszonylag konzervált 100 aminosavas doménre, a ciklin box-ra korlátozódik, amely a CDK kötéséért és aktiválásáért felelős. Az itt bekövetkező mutációk mind a kötődést, mind az aktiválást gátolják, jelezve, hogy a két funkció nehezen választható szét. Mindegyik CDK a ciklinek egy speciális alcsoportjával lép csak kapcsolatba, bár ezen alcsoportok tagszáma változó lehet. Egyetlen ciklin többféle CDK-hoz is kötődhet.

A ciklin funkciója elsősorban annak mennyiségi változásaival szabályozott, karakterisztikusan megnő egy-egy specifikus sejtciklus esemény előtt. A ciklineket ennek alapján gyakran azon sejtciklus szakasz alapján kategorizálják, amelyben megjelennek. A korai *Xenopus* embrióban a mitotikus ciklin - Ciklin B - oszcillációját a ciklin degradációjának arányváltozásai tartják fenn (3.1.5 ábra). A sejtciklus során állandó ciklin szintézis lineárisan növekedő ciklin szintet eredményez a mitózis bekövetkeztéig, amikor is a degradáció intenzitása rohamosan megnő, és ez a ciklin szint esését eredményezi. A ciklin degradációját az ubiquitin függő proteolitikus rendszer végzi. Ehhez egy rövid szekvenciamotívum (a destruktív box; PSTAIRE) szükséges a ciklin aminoterminális végéhez közel. A lebontás beindító szignálja lehet a mitózis során megnövekedő Cdc2 aktivitás is, bizonyítékok vannak rá, hogy az ubiquitin rendszer egyes komponenseit a Cdc2 aktiválja. A ciklinek ubiquitinnel történő "megjelölését" az ubiquitin ligáz aktivitással rendelkező APC (*anaphase promoting complex*) enzimkomplex végzi.

3.1.2.2.3. A CDK foszforiláció általi aktiválása

A ciklin kötődés mellett a teljes CDK aktiváláshoz szükség van egy konzervált treonin aminosav

(Thr₁₆₁ a humán Cdk1-en; Thr₁₆₀ a humán Cdk2-n) foszforilációjára is. A Cdk2-ben a Thr₁₆₀ a katalitikus alegység szubsztrátkötő helyét lefedő T hurkon belül helyezkedik el, foszforilálása a T hurok eltávolodásával felfedi a szubsztrát kötő helyet. A foszforiláció a ciklin kötőhelyet is befolyásolja, növeli némely CDK/ciklin pár kötődését; ugyanakkor a ciklin kötés erősítheti a foszforilációt is. A Thr_{160/161} foszforilációjáért felelős enzim (CDK aktiváló kináz; CAK) nemrégiben jellemezték. A CAK egy többalegységes enzim, katalitikus alegysége az erőteljesen konzervált, a CDK-k családjába tartozó MO15. A humán CAK másik fő alegysége szintén egy ciklin, a Ciklin H. A CAK tehát maga is egy ciklin/CDK komplex, ennek alapján a MO15-öt Cdk7-nek nevezték át.

A normál gerinces sejtciklus során a Thr_{160/161} foszforilációja a ciklin kötéssel párhuzamosan emelkedik és csökken. A foszforiláció ezen változásai valószínűleg nem kötődnek a CAK aktivitás változásaihoz, amely látszólag nem változik a sejtciklus során, hanem valószínűleg a ciklin kötődés foszforilációt elősegítő funkciójához kapcsolhatóak. A CAK aktivitás eképpen nem korlátozó tényező a normális sejtosztódás során, bár regulációja fontos lehet bizonyos növekedési körülmények között.

3.1.2.2.4. A CDK aktivitás gátlása foszforilációval

A CDK/ciklin komplex inaktiválásának számos módja van. A fentiek alapján a ciklin eltávolítása, illetve a Thr_{160/161} defoszforilálása nyilvánvaló lenne, ez utóbbi jelentősége azonban még bizonytalan. A ciklin csökkent szintézise illetve megnövekedett degradációja viszont nyilvánvalóan fontos *in vivo*.

A CDK/ciklin komplex inaktiválásának másik módja két, az amino terminushoz közeli hely (Thr₁₄ és Tyr₁₅) foszforilációja. A Cdk2 esetében e két aminosav oldalláncai az ATP kötő hely belsejébe nyúlnak, foszforilációjuk ezáltal nyilvánvalóan befolyásolja a kináz aktivitását. A gátlás mechanizmusa ismeretlen, a Tyr₁₅ foszforilációja nem interferál az ATP kötődésével. Mindkét aminosav a T hurok alatt helyezkedik el, további hangsúlyt adva annak a konformációs változásnak, amely a T hurok eltávolodását, ezáltal a szubsztrátkötő hely felszabadulását okozza.

A Thr₁₄ és Tyr₁₅ foszforilációja különösen fontos a Cdc2 mitotikus aktiválásában. Csakúgy mint a Thr₁₆₁ foszforilációja, a Thr₁₄ és Tyr₁₅ foszforilációja is emelkedik a ciklin B szint emelkedésével közel párhuzamosan, ahogy a sejt a mitózis felé közelít. A Cdc2/Ciklin B komplex eképpen inaktív állapotban van mindaddig, amíg a két aminosav defoszforilálása a G₂ fázis végén aktiválja azt. Ez a hirtelen defoszforiláció az e helyen ható kinázok és foszfatázok aktivitásának összehangolt változtatásával jön létre.

A Tyr₁₅ kináz a Wee1, amelyet eredetileg *S. pombe* sejtekben azonosítottak. Thr₁₄ kináz aktivitást nemrégiben detektáltak *Xenopus* embrióban és humán sejtekben is. A Wee1 kináz aktivitása leesik mitózis alatt, hozzájárulva a gátló foszforilációs aktivitás ebben a fázisban történő leeséséhez. A mitózis alatti lecsökkent Wee1 aktivitás foszforiláció következménye, de az ezért felelős kinázok még részben ismeretlenek, és fajoként változóak lehetnek. Hasadóélesztőben a Wee1 gátlását a Nim1 protein kináz végzi foszforilálva annak C terminális katalitikus doménjét. Magasabbrendű eukarióta Nim1 homológokat még nem találtak.

A Thr₁₄ és Tyr₁₅ defoszforilálását egy kettős specifitású enzim végzi, a Cdc25. A Cdc25 aktivitása a mitózis során emelkedik nagyrészt N terminális részének foszforilációja miatt. A mitózis során e foszforilációért felelős kináz aktiválódik, a defoszforilációt végző foszfatáz pedig inaktiválódik. A Cdc25 aktiváló kináz lehet maga a Cdc2, ezzel elegáns pozitív feedback szabályozó kört valósítva meg. Pozitív

feedback a másik komponenseken is megvalósítható: a Cdc2 aktiválhatja azt a kinázt, amely a Wee1-et inaktíválja, illetve gátolhatja azt a foszfatázt, amely a Wee1-et aktiválja és a Cdc25-öt inaktíválja (3.1.6 ábra).

3.1.2.2.5. CDK gátlás inhibitor alegységek kötődése által

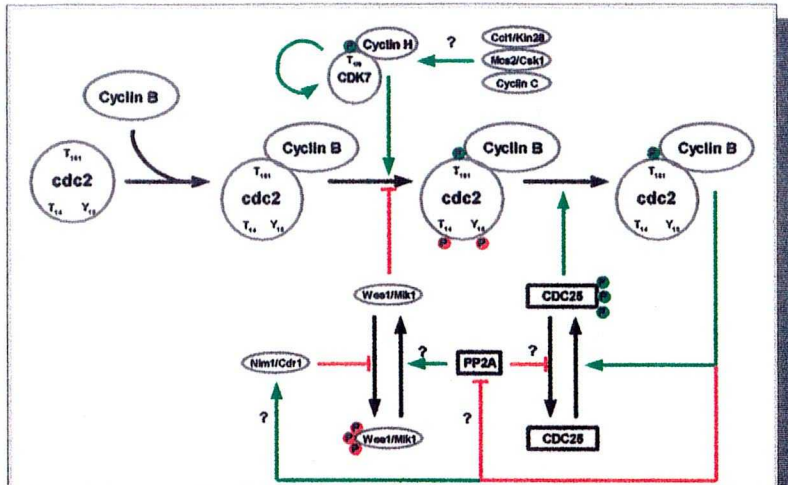
A CDK szabályozás negyedik fontos - gátló - mechanizmusa egy meglehetősen heterogén fehérjecsalád (CKI) tagjainak kötődése által

játszódik le. Jelenleg a család hét tagját azonosították: *S. cerevisiae*-ből a Far1-t, amely a Cdc28/Cln komplexet; a p40^{Sic1/Sdb25}-t, amely a Cdc28/Cln komplexet; és egy harmadikat, amely a Pho85/Pho80 komplexet gátolja. A többieket emlősökből izolálták: a p21^{Cip1/Waf1} és a p27^{Kip1}, amelyek preferenciálisan a Cdk2/ciklin és a Cdk4/ciklin komplexeket gátolják; valamint a p16^{Ink4} és p15^{Ink4B}, amelyek a Cdk4/ciklin és Cdk6/ciklin komplexekre specifikusak.

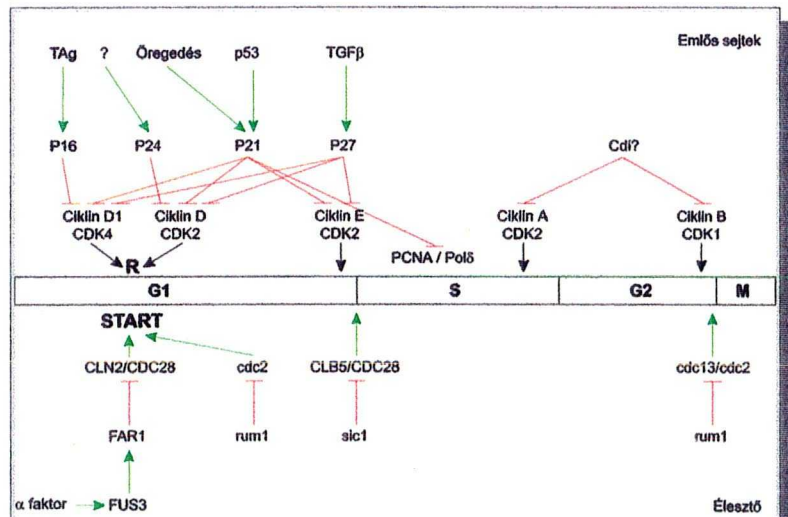
A gátlás mechanizmusára vonatkozó ismereteink jelenleg meglehetősen vázlatosak. A legtöbb CKI a Thr_{160/161} foszforilált CDK/ciklin komplexhez kötődik és közvetlenül gátolja a kináz aktivitást. Sok esetben (Far1, p40, p21) a CKI-kat saját célmolekulájuk foszforilálja, ami a fehérjeszubsztrát kötőhellyel való interakcióra utal.

A p21 CKI esetében a szabályozás legfőbb módja transzkripcionális. A p21 transzkripcióját a p53 indítja be, amely transzkripciós regulátor-

ként leállítja a sejtciklust DNS károsodás illetve sejttöregedés esetén. Jelentős mennyiségű p21 van aktívan osztódó humán és egér fibroblasztokban; ez a p21 alapszint biztosítja azt a limitet, amelyet a CDK komplexek aktiválódásához meg kell haladni. A transzkripciós kontroll szintén fontos lehet a p15^{Ink4B} esetében is. A p21 fehérjecsalád másik tagját, a p27-t, egyes sejtekben sajátos poszttranszlációs modifikációk regulálják. Összetett mechanizmusok vezérlik a Far1 hatását is, amely a Cdc28/Cln komplexeket gátolja G₁ fázisban, ha az élesztősejteket α-faktorial kezelik. Csakúgy mint a ciklinek, a CKI-k szabályozásában is fontos az állapotspecifikus degradáció (3.1.7 ábra).



3.1.6 ábra. A ciklin dependens kinázok aktivitásának szabályozása kinázok és foszfatázok által.



3.1.7 ábra. A CDK inhibitorok, és a különböző CDK/ciklin komplexek közötti interakció.

3.1.2.3. AZ EMLŐS SEJTCIKLUS KÜLÖNBÖZŐ SZAKASZAIT MÁS ÉS MÁS CDK/CIKLIN KOMPLEXEK SZABÁLYOZZÁK

A hasadóélesztőben a sejtciklus szabályozása elsődlegesen a G₂/M átmenetnél, a mitózisba való belépésnél valósul meg. A *S. pombe* sejtekben egy fő CDK katalitikus alegység, a Cdc2, található, amely a cdc13 gén által kódolt ciklinhez, a Ciklin B-hez kötődik. A sarjadzó élesztő és az emlős sejtek sejtciklusa ezzel szemben a G₁/S átmenetnél szabályozódik. E sejtek késői G₁ fázisában van egy olyan pont, amelyet meghaladva a sejtciklus már nem áll le, hanem egy teljes kör (S-G₂-M) megtétele után tér vissza ismét G₁ fázisba. Az e ponton való átmenetet kívülről jövő szignálok, növekedési faktorok, illetve párosodási feromonok befolyásolják.

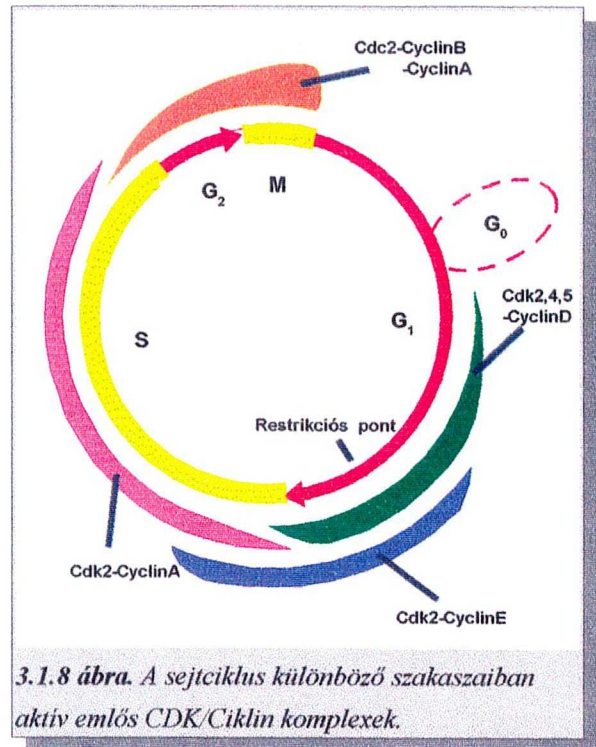
A *S. cerevisiae* esetében a külső szignál - a párosodási feromon - a ciklus leállását okozza, hiányában, és amennyiben megfelelő mennyiségű és minőségű tápanyag jelen van, a sejtciklus zavartalanul "jár". A pontot, ahonnan már nincs megállás, sarjadzó élesztőben ezért START pontnak nevezik.

Emlős sejtekben a helyzet fordított. A kívülről jövő szignálok itt növekedési faktorok, amelyek átlendítik a sejtciklust e ponton. Növekedési faktorok hiányában a sejtciklus leáll. Emlős sejtek esetében e pontot ezért restriktív, R pontnak nevezik.

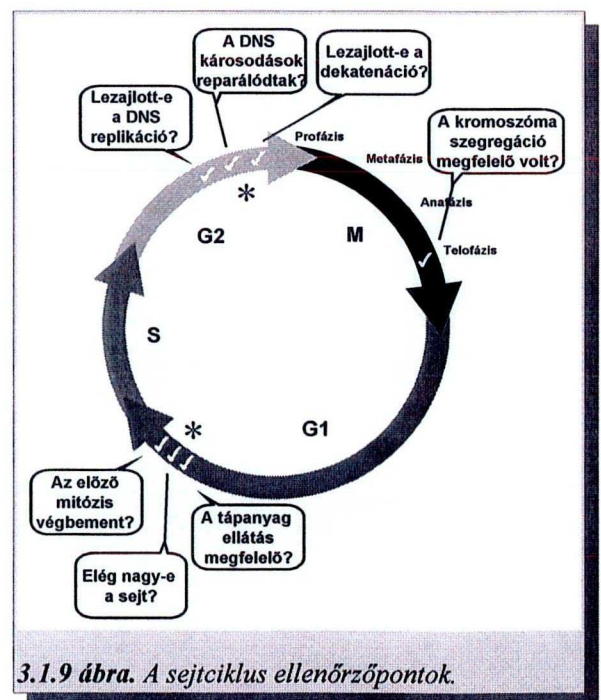
A sarjadzó élesztőben a fő CDK-hoz (Cdc28) sejtciklus specifikusan többféle ciklin kapcsolódhat. Emlős sejtekben a sejtciklus szabályozása még tovább bonyolódik, a különböző ciklinek legalább hétféle különböző CDK katalitikus alegységgel kapcsolódhatnak (3.1.8 ábra).

3.1.3. A sejtciklus ellenőrzőpontok

A sejtciklus egymás utáni folyamatainak szigorú sorrendjét a sejtciklus ellenőrzőpontok biztosítják azáltal, hogy "figyelik" a sejtciklus egyes lépéseit, a ciklus előrehaladásáról szignálokat közvetítenek a szabályozó ciklin dependens kinázok felé, és befolyásolják azok aktivitását. Katasztrofális genetikai következményekkel járna ugyanis, ha a sejt továbblépne a ciklusban egy megelőző lépés teljes, és tökéletes végrehajtása nélkül. Erre szolgáltatt példát a 3.1.2 fejezet elején leírt kísérlet; ha S fázisban sejteket arra kényszerítettek, hogy mitózisba lépjenek egy mitotikus sejttel történő fúzió során, a mitotikus sejtekben jelenlévő MPF az S fázisban kromoszómák



3.1.8 ábra. A sejtciklus különböző szakaszaiban aktív emlős CDK/Ciklin komplexek.



3.1.9 ábra. A sejtciklus ellenőrzőpontok.

kondenzációját idézi elő. Mivel azonban a DNS replikáció még nem teljes, az éretlen kromoszóma-kondenzáció letális következményekkel jár.

A metafázis során a mitotikus orsó ellentétes pólusairól eredő mikrotubulusai a testvérkromatidák kinetochorjához kapcsolódnak. Ha az anafázis előbb indul be, mint hogy ez megtörténne, olyan leánysejtek alakulnak ki, amelyek hiányzó vagy extra kromoszómákat tartalmaznak (nondiszjunkció).

A sejtciklus szabályozásában ezért olyan pontok vannak, amelyek figyelik az előzőleg "kötelezően" végrehajtandó lépések tényleges bekövetkeztét. Ezeket a figyelő mechanizmusokat hívják összefoglalóan sejtciklus ellenőrző pontoknak (3.1.9 ábra).

3.1.3.1. MEGFELELŐ-E A TÁPANYAGELLÁTÁS?

Elsősorban élesztősejteknel működik az az ellenőrzőpont, amely a környezet tápanyagellátottságát figyeli. Optimális körülmények között a sejtek szaporodása előtt nincs akadály, ha azonban bármilyen tápanyagból nem áll elegendő rendelkezésre, a sejtek nem haladnak át a START ponton, osztódásuk G₁-ben megáll.

3.1.3.2. MEGFELELŐ-E A SEJTEK MÉRETE?

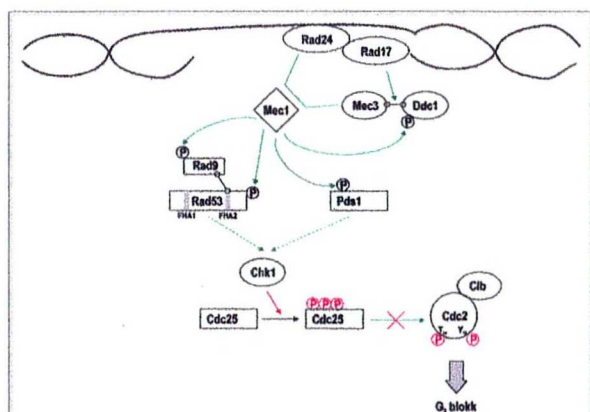
Ezzel részben összefügg, hogy a START ponton a sejtek csak akkor haladnak át, ha elérték egy megfelelő méretet. Erre legnyilvánvalóbb bizonyítékot a *wee1* mutáns *S. pombe* sejtek szolgáltatják. A *wee* skót *gaelic* nyelven törpét jelent, ami arra utal, hogy a *wee1* sejtek a megfelelő méret elérése előtt lépnek be mitózisba, mivel a Cdc2 gátló kinázának funkciója kiesett. Ezzel ellentétes hatást okoznak egyes *cdc2* mutációk. Itt a sejt növekedését nem követi osztódás, ezért a sejtek meglepően hosszúak is lehetnek.

3.1.3.3. A REINICIÁCIÓS ELLENŐRZŐPONT

Politéniaival és poliploidiaival járó fejlődési állapotokban a sejtek anélkül lépnek be újra az S fázisba, hogy az azt megelőző M és G₁ fázisokon keresztülmentek volna. A normális sejteken ez az ellenőrzőpontok működése következtében lehetetlen, a sejtciklus nem mehet tovább az előző M és G₁ fázisok lejátszódása nélkül. Kísérletes körülmények között ezen ellenőrzőpont működése kikapcsolható pl. topoizomeráz II inhibitorokkal. Malignusan transzformált rágsáloséjtek ezen ellenőrzőpont hibáját mutatják, amely kémiai reverz transzformáció során helyreáll.

3.1.3.4. A DNS KÁROSODÁSOK G₂ ELLENŐRZŐPONTJA

Az S fázist követően bekövetkezett DNS károsodásokat egy hatékony szenzorrendszer észleli, és a sejtciklust mindaddig nem engedi továbbhaladni, amíg a reparációs rendszer a hibákat ki nem javította. A DNS károsodások reparációjának következtében kialakult egyesszálú DNS szakaszokhoz kapcsolódnak a Rad17, Rad24, Mec3, Ddc1 és Rad9 fehérjék. A Mec3 hozzákötődik a Ddc1-hez, ezt a kötődést segíti elő a Rad17, amely feltehetőleg egy endonukleáz kódol. Mind a Rad9, mind a Rad24



3.1.10 ábra. A DNS károsodások G₂ ellenőrzőpontjának működésében részt vevő fehérjék.

fehérjekomplex aktiválja a Mec1 kinázt, amelynek foszforilációs targetje legalább a négy megjelölt fehérje. A foszforilált Rad9 kötődik a Rad53-hoz annak FHA2 (*fork head associated*) doménjén keresztül. A Pds1 aktiválása szintén szükséges a sejtciklus leállításához. A feltüntetett foszforilációs és direkt kapcsolatok azonban még részleteiben nem feltártak (3.1.10 ábra) {1068}.

A Rad53 illetve Pds1 fehérjéről a szignál részleteiben nem feltárt lépéseken keresztül a Chk1 kinázhoz kerül, amely foszforilálja a Cdc25 foszfatázt. Ez a foszforiláció azonban nem azonos a 3.1.6-os ábrán láthatóval, amely a Cdc2 hatására, pozitív visszacsatolásként a Cdc25 foszfatázt aktiválja. Itt a Cdc25 gátló foszforilációja történik, amelynek következtében a Cdc2/Ciklin komplex a T₁₄/Y₁₅ pozíciókon foszforilálva inaktív marad. Ez pedig a ciklus blokkjához vezet {1506}.

3.1.3.5. AZ S FÁZISOS ELLENŐRZŐPONT

Ha a sejtek valamely hatás következtében anélkül lépnek mitózisba, hogy a DNS teljes replikációja befejeződött volna, annak éretlen mitotikus kromoszóma kondenzáció a következménye. Ezen ellenőrzőpont hibátlan működése jellemző a normál és transzformált humán sejtekre, valamint a normál rágszálósejtekre, bár az újabb adatok alapján okadain savval a HeLa sejtek is PCC-be kényszeríthetők {1507}. Transzformált rágszálósejtekben ez a pont hibás: a DNS replikációjának hosszan tartó gátlása pl. hidroxü-ureával a sejtciklust a G₂-nek megfelelő állapotra állítja be. A sejteket ezután koffeinnel kezelve éretlen kromoszóma kondenzáció idézhető elő {367}. Kémiai reverz transzformáció hatására az ellenőrzőpont működése helyreáll {681}.

A replikációs ellenőrző pont működése szorosan kapcsolódik a G₂ DNS károsodás ellenőrzőpontban szereplő fehérjékhez. A ribonukleotid reduktáz hidroxü-ureával történő gátlása kimeríti a szabad dNTP pool-t, ezzel a DNS szintézis gátlását eredményezi. Ez a Cds1 kináz aktiválásához vezet. Az aktivált Cds1 foszforilálja a Wee1 kinázt, miközben kötődik is hozzá, valamint a Mik1 kináz mennyiségének emelkedését idézi elő. A Wee1 foszforilációjának hatása ismeretlen. Végül a Wee1 és Mik1 kinázok mennyiségének és aktivitásának megemelkedése a Ciklin / Cdc2 komplex T₁₄/Y₁₅ pozíciókon történő foszforilációját idézi elő, amely a mitotikus kináz komplex inaktiválásához, végső soron a sejtciklus blokkjához vezet {1506}.

3.1.3.6. A DEKATENÁCIÓS ELLENŐRZŐPONT

A kromoszómák megket-tözödésének természetéből adódik, hogy a két leánykromatida replikonjai mint egymásba fonódó gyűrűk katenálódnak. A mitózis során a testvérkromatidák csak akkor tudnak

Sejtvonal	Leírás	Generációs idő	% 4C<
CHO-AA8	Kínai hörcsög ovárium	13	98
CHO-K1	Kínai hörcsög ovárium	18	95
SV-T2	SV40 transzformált 3T3, tumoros	14	82
BALB/3T3	Egér immortalizált	17	59
3T6	Egér immortalizált	14	58
293	Humán Ad5 transzformált vese	21	42
Vero	Vervet vese	27	11
-	Primer egér embrió	21	10
MES-SA	Humán méh szarkóma	ND	8
Tera2	Humán ivarsejt tumor	ND	8
SV-IMR	SV40- transzformált IMR-90	20	6
IMR-90	Humán korlátozott életidejű	20	5
DHL-4	Humán hisztocitikus leukémia	ND	2
TAB	Humán Burkitt limfóma	ND	2
HeLa S3	Humán adenokarcinóma	23	2

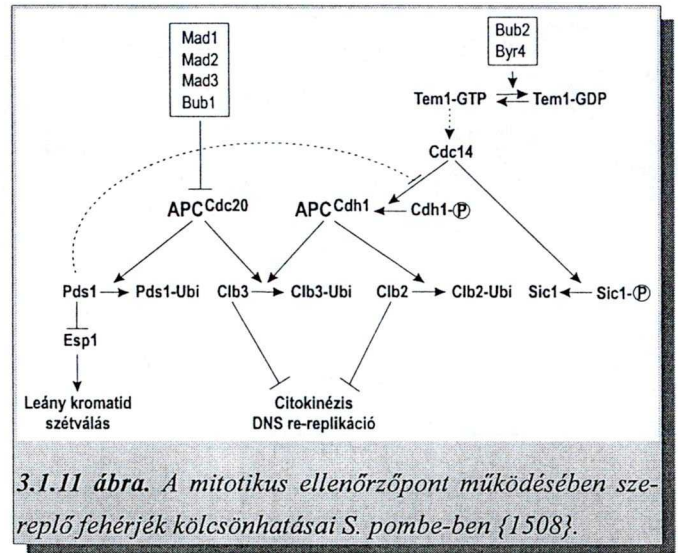
3.1.1 táblázat. 72 órás kolcemid kezelést követően kialakuló 4C< DNS tartalmú sejtek nagy aránya a mitotikus ellenőrzőpont hibájára utal {505}.

elválni egymástól, ha a gyűrűk egybefonódását a topoizomeráz II megszünteti. Az egybefonódás megszüntetését külön ellenőrző pont figyeli, ami koffein kezeléssel kiiktatható. Ennek következtében normálisan kondenzált metafázisos kromoszómák helyett egy "molekuláris spagetti" szerű formáció alakul ki, ami a sejtekre nézve letális {263}.

3.1.3.7. A MITOTIKUS ELLENŐRZŐPONT

Az osztódó sejtek a mikrotubulusok szerveződését befolyásoló drogokkal (kolhicin, kolcemid, noko-dazol, taxol, dinitrogén-oxid) metafázisban blokkolhatók. A leánykromatidák tökéletes szegregációját ugyanis egy sejtciklus ellenőrzőpont figyeli, ami nem engedi a sejteket kilépni a mitózisból, ha a szegregáció elmaradt. Hasonlóan a DNS replikáció lejátszódását figyelő S fázisos ellenőrzőponthoz, az M fázisos ellenőrzőpont is hibás malignusan transzformált rágsálosejtekben, valamint néhány transzformált humán sejtben (3.1.1 táblázat)

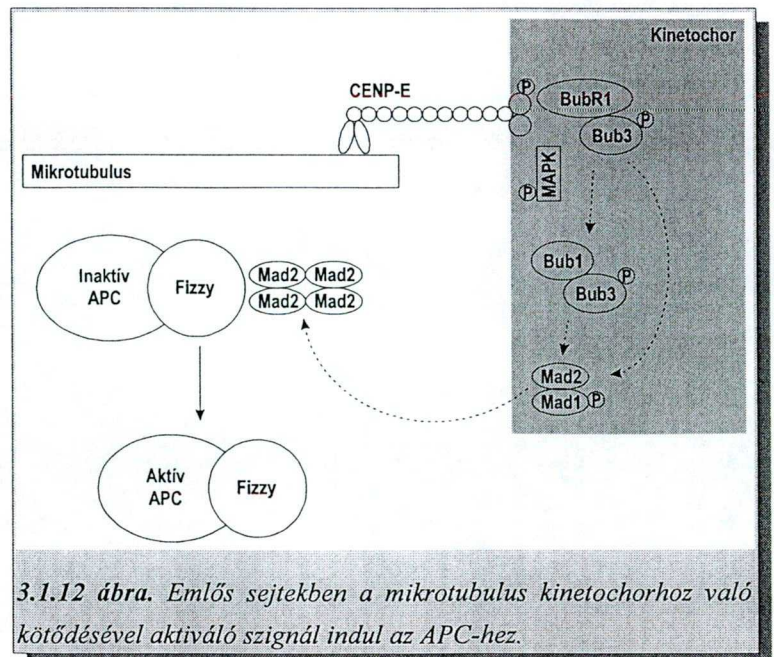
Az elmúlt néhány évben a mitotikus ellenőrzőpont működéséért felelős fehérjék részleges azonosítását követően az ellenőrzőpont működésére többféle modellt dolgoztak ki élesztőben, illetve emlősben. Az élesztő modell (3.1.11 ábra) a szignál továbbadását, míg az emlős modell a szignál keletkezését tekintve részletesebb. Élesztőben még nem ismert olyan molekula, amely a szabad mikrotubulus végek jelentlétét érzékelve indítaná be a szignál kaszkádot. Emlősben ez a kinezin szerű



3.1.11 ábra. A mitotikus ellenőrzőpont működésében szereplő fehérjék kölcsönhatásai *S. pombe*-ben {1508}.

CENP-E fehérje, amely a mikrotubulushoz és a kinetochorhoz kapcsolódva valószínűleg a BubR1 és Bub3 kinázok aktiválásával, a Mad1 és Mad2 fehérjék közvetítésével aktiválja az APC komplexet (3.1.12 ábra). Az APC komplex ubiquitinálja a mitotikus kináz Ciklin komponensét, valamint a Pds1 és Cut1 fehérjéket, amelyek a két leánykromatida centromérek mentén való összekapcsolódásában vesznek részt. Az ubiquitináció következtében a Ciklin lebomlik, és a mitotikus kináz aktivitása leesik. A Pds1 és Cut1 fehérjék lebomlásának következtében a leánykromatidák elválnak egymástól (Prof. Don Cleveland, személyes közlés).

Noha a sejtciklus ellenőrzőpontok működésében már nagyon sok részlet ismert, a szignáltranszdukciós útvonalak teljes mélységig történő megismerése még csak távoli cél.



3.1.12 ábra. Emlős sejtekben a mikrotubulus kinetochorhoz való kötődésével aktiváló szignál indul az APC-hez.

3.2. A KÉMIAI REVERZ TRANSZFORMÁCIÓ

Az 1970-es évek legelején három amerikai laboratórium egymástól függetlenül kimutatta, hogy egyes fibroblaszt eredetű sejteket dibutiril-ciklikus AMP-vel kezelve a malignus fenotípus morfológiai, fiziológiai és biokémiai reverzióját lehet kiváltani {369, 510, 1207}. Azóta a reverz transzformációt számos másféle sejtvonalon és droggal sikerült kiváltani, és a folyamatot különböző szemszögekből részletesen jellemezték. Meglepő azonban, hogy míg a morfológiai és fiziológiai változások jellemzése részletes és szinte mindenre kiterjedő, mennyire kevés adat áll rendelkezésre a reverz transzformáció során fellépő génextpressziós változásokról, ezek egy része is más rendszerekben kapott adatok extrapolációján alapul.

A következő oldalakon a reverz transzformációról eddig ismert adatokat foglalom röviden össze.

3.2.1. A cAMP metabolizmus változásai in vivo és in vitro

A megnövekedett intracelluláris cAMP koncentráció hatásait a cAMP dependens protein kinázok aktiválásán keresztül fejti ki. A PKA holoenzimek két regulátor és két katalitikus alegységből állnak, amelyek katalitikus alegységei azonosak, míg a regulátor alegységek különbözőek. Foszforilációs aktivitásukat szerin vagy treonin oldalláncokon fejtik ki. Az intracelluláris cAMP koncentrációt fiziológiásan két enzim illetve enzim csoport, az adenilát cikláz és a ciklikus nukleotid foszfodiészteráz befolyásolja. Az adenilát ciklázhoz az extracelluláris szignált a G proteinek közvetítik, míg a foszfodiészteráz aktivitás szabályozásában a cAMP koncentrációnak van szerepe. Az intracelluláris cAMP szint és a PKA aktivitás a sejtciklus során is jellegzetes változásokat mutat {1120, 1121}, és a malignus transzformációval összefüggésben is jelentősen megváltozhat {1206}.

Kísérletes körülmények közt a sejtbeli cAMP koncentrációt legtöbbször helyspecifikus cAMP analógokkal (többnyire 8Br- és N⁶,O²-dibutiril -cAMP), prosztaglandinokkal (többnyire PGE₁) és a PDE gátló teofillinnel történő kezeléssel befolyásolják. Ezen drogok egymással kombinálva jelentős szinergisztikus hatást fejtenek ki, míg a helyspecifikus cAMP analógok hatását tesztoszteronnal lehet jelentősen potenciózni. A citoskeleton szerveződését csökkentő drogok pedig a hatással antagonizálnak. Hatástalan kontrollvegyületek egész sorával pedig azt bizonyították, hogy a hatást a cAMP, nem pedig az alkalmazott analógok bomlástermékei (butirát, AMP) okozzák.

3.2.2. Sejttípusok

A reverz transzformáció folyamatát CHO sejteken írták le először, és azóta számos más fibroblasztoid (pl. Ha-MuSV transzformált 3T3 {548}, BHK {616}, L929 {1093}, XC: RSV indukált patkány szarkóma {510}), karcinóma (pl. HT-29 vastagbélkarcinóma, A549 tüdőkarcinóma {560}), limfoid (K562 leukémia {558}, S49 limfóma {1400}, U-937 hisztocitikus limfóma {607}, HL-60 promielocita {366}), idegi eredetű (FOG, U251 {560}, 138 MG {1336} és C6 glióma {627}; C1300 {1270} NG108-15 és LA-N-2 neuroblasztóma {609}), hepatóma (H4-E-II {527}), feokromocitóma (PC7e {651}) és emlőrák (pl. MCF-7, T47D, HBL-100 {560}) sejtvonalon sikerrel ismételték meg valamely hatását.

Ugyanakkor a primer egér fibroblasztok {668} és HT1080 {456}, valamint egyes epiteloid (HeLa {668}, humán korion karcinóma; egér emlőtumor {510}) sejtek nem reagálnak az intracelluláris cAMP koncentrációt növelő kezelésre.

3.2.3. A reverz transzformáció időbeli lefutása

A reverz transzformáció hatásai közül jól meg lehet különböztetni a korai és késői válaszokat. A korai válaszok megjelenéséhez sem új RNS- sem új fehérjeszintézis nem szükséges, a hatás már meglévő molekulák átszerveződése, vagy modifikációja következtében alakul ki, mint pl. a vimentin vagy egy aktin szerű fehérje foszforilációja {554, 475}.

A morfológiai hatások közül leggyorsabban a membrán dinamikája változik meg, CHO sejteken a pulzáló bütykök eltűnése a reverz transzformáció kezdete után már 2 perccel elkezdődik {325, 1022}. Az intenzív vándorlást végző sejtek mozgása 20 perc múltán {600}, a bivalens kationok megvonása illetve KonA adagolás hatására felkerekedő CHO sejtek aránya pedig 1 óra múlva csökken le {1025}.

A CHO sejtek nyilvánvaló morfológiai változása csak mintegy 0.5-1 óra múlva kezdődik meg, és 2-3 órán belül válik jól láthatóvá {1026, 369, 1108, 533, 614}. 24-48 óra múltán a kezelt sejtek erősen megnyúlt orsó alakúak {454}. A CHO sejtek párhuzamos egymás mellé rendeződése pedig mintegy 5-8 órát vesz igénybe {533}.

A génextpressziós változások szempontjából is elég világosan meg lehet különböztetni korai és késői válaszokat. Nagy részükről viszont nem tudni, hogy tényleges velejárá-e a reverz transzformációs folyamatnak, vagy pedig csak a vizsgált modell organizmus fiziológiás válaszát képezik. Az intracelluláris cAMP szintet emelő kezelés után PC7e sejtekben a tirozin hidroxiláz transzkripciójának emelkedése már 10 perccel {651}; HL-60 sejtekben a *c-myc* és ovotranszferrin transzkript eltűnése 30 percen belül {366}; intakt patkányokban a máj tirozin aminosztransferáz aktivitás emelkedése 30 percen belül {529}, H4-II-E sejtekben a PEPCK mRNS szint emelkedése 1 óra múlva {527}; szérumehezettett CHO sejtekben az ODC aktivitás emelkedése 2 óra múlva {515}; C6 glióma sejtekben az LDH enzim mennyiségi növekedése 3 óra múlva {531} már jól látható. A késői hatások csak jóval a morfológiai változások után jelennek meg. A CHO genom DNáz I érzékenységének megváltozása, "felnyílása", 24 óra múltán detektálható {609}. A fibronectin lerakódás első jelei 24 óra múlva tűnnek elő {533}.

A reverz transzformáció reverzibilis, a visszaalakulás sebessége a kialakuláséhoz hasonló.

3.2.4. A sejtek szaporodása

A sejtek szaporodásának paramétereire kifejtett hatás sejttípusonként meglehetősen eltérő, sőt még azonos sejttípusok vonatkozásában is találhatóak egymásnak ellentmondó adatok, amelyek nagyrészt az alkalmazott drog mennyiségétől és minőségétől függenek.

3.2.4.1. CIKLUSIDŐ, TELÍTÉSI SEJTSŰRŰSÉG

A reverz transzformációhoz már elegendő Bt_2cAMP + tesztoszteron koncentrációknál a CHO sejtek generációs ideje nem nyúlik meg, magasabb koncentrációjú Bt_2cAMP azonban már 30 %-al megnyújtja a ciklusidőt {369}. A hatékony metil-xantinok már 14-105 %-os ciklusidő növekedést, és 20-81.5 %-os telítési sejtsűrűség csökkenést váltanak ki {454}. Ha-MuSV transzformált NIH3T3 sejteken a különbözőképpen szubsztituált cAMP származékok minőségtől és koncentrációtól függően 7-95 %-os szaporodás-gátlást okoznak {478}. A K562 sejtek szaporodása helyspecifikus cAMP analógok hatására 20-60 %-al lecsökken, és megakariocitikus illetve kis mértékben B4 limfocita irányba differenciálódnak {558}, míg a HL-60 sejtvonal növekedése teljesen legátlódik {366}. Egyes sejteket, mint pl. az Y-1 egér

adrenokortikális tumorsejteket a cAMP és analógjaival történő kezelés elpusztít {1116}.

3.2.4.2. A SZAPORODÁS SŰRŰSÉG FÜGGÉSE

A transzformált sejtek szaporodás kontrolljának egyik leglényesebb momentuma a szaporodás sűrűség függő gátlásának (kontakt gátlás) elvesztése. CHO {369}, L929 {510} és XC {510} sejtek reverz transzformációja során a kontakt gátlás visszatér, a sejtek egymásra lapolódása megszűnik, szigorú *monolayer*-t alkotnak.

3.2.4.3. A SZAPORODÁS LETAPADÁS FÜGGÉSE, AZ ALJZATHOZ TAPADÁS ERŐSSÉGE

A transzformált sejtek lényeges tulajdonsága, hogy a normál sejtekkel ellentétben képesek szuszpenzióban, vagy lágyagarban is osztódni. A reverz transzformáció legkönnyebben, és -egyértelműben vizsgálható változása, hogy az osztódás letapadás függése visszatér (6.2.19, 6.2.18, 6.2.19 ábrák) {610}. A fibroblasztoid morfológiájú reverz transzformált CHO sejtek szorosabban tapadnak a Petri csésze felszínéhez, míg az epiteloid jellegű kezeletlen sejtek gyengébben {325}. A sejteket híg tripszinnel hosszan kezelve, vagy a Ca^{2+} és Mg^{2+} ionokat megvonva a reverz transzformált sejteknek csak kis része, míg a transzformált sejtek 100 %-a felkerekedik {454, 1025}.

3.2.4.4. IN VIVO TUMOR KÉPZÉS

A CHO sejtek mind szíriai aranyhörcsög pofazacskójában {1022}, mind immunszupresszált egérben képesek tumort formálni {681}. Az *in vivo* tumor képzés képessége reverz transzformált sejtekkel elvész, bár a megfelelő Bt_2cAMP szint *in vivo* fenntartása nem egyszerű feladat.

3.2.5. A sejtek morfológiája

A kezeletlen CHOK1 sejtek alakja a sejtciklus állapotának és a kultúra telítettségének függvénye {594}. A sejtek 1/3-a vékonyan szétterül, nincs polaritása, a többiek vastagabbak, kevésbé szétterültek, sokuk talán mitotikus. A konfluens kultúrában a sejtek kis része kerek, párban áll, a sejtek többsége erőteljesen szétterül, alakjuk roppant változékony, pleomorf, romboid, sokszög alakú, rövid orsó. Néhány sejt poliploid óriássejt. A kontakt a sejtek alakját anizotróppá teszi {553}. Más transzformált fibroblaszt sejtek alacsony sejtdenzitás mellett tenyésztve kissé megnyúltak, néha keskeny nyúlványok vannak rajtuk. Osztódás és a sejtdenzitás növekedése során azonban elvesztik orsó alakjukat és nyúlványaikat, és sokszög alakúvá válnak {510}. A sejtek növekedése kolóniában random, a kolónia többé-kevésbé kör alakú. A transzformált kolóniák körül mikrokolóniák vannak, amelyeket a lazán letapadt, felúszott, majd újra letapadt sejtek alapítanak {1022}.

A normál fibroblasztok egymás mellé rendeződött, megnyúlt sejtek; a kolónia nyúlványokat, hurkokat, örvényeket növeszt a széleken {1022}.

A reverz transzformáció során a CHO sejtek alakja a normál fibroblasztokéhoz válik hasonlóvá. A sejtek kifejezett aszimmetriát, megnyúlt orsó alakot vesznek fel, bipolárisak lesznek {369}. A populáció sejteinek mérete meglepően egységes. A konfluens kultúrában a sejtek szélesebbek, általában vékonyabbak, és jobban kiterülnek mint a ritka kultúrákban {553}. A szórt állásús, orientálatlan sejtek egymás mellé rendeződnek és párhuzamosan felsorakoznak {369}. A CHO sejtek morfológiai változásait más transzformált fibroblaszt vonalak (L929, XC {510}, Ha-MuSV transzformált NIH3T3 {548}, ASV

transzformált pocok FB {1026}, egér L {530}) is mutatják. Más sejttípusokban a reverz transzformáció inkább a dedifferenciált állapot megszűnését és egyfajta normális differenciált állapot elérését jelenti; pl. a C1300 egér neuroblasztóma sejtek ellaposodnak és axon szerű nyúlványokat képeznek {1270, 1481, 1482}.

A morfológiai konverzió - megnyúlás - iniciációja specifikus G_1 hatás, ha azonban sejtek már megnyúltak az M fázist kivéve megnyúlt állapotban maradnak amíg a drog jelen van {614}.

3.2.6. A sejtfelszín

3.2.6.1. A SEJTMEMBRÁN FELSZÍNI STRUKTÚRÁI, MEMBRÁNDINAMIKA

A normál, nem neoplastikus sejtek felszíne roppant változatos lehet, de alapvető különbségek fedezhetők fel a transzformált sejtek felszínének összehasonlításával. A normál interfázisos sejtek felszínén néhány, a kerek, vagy mitotikus sejteken jelentős számú mikrovillus látható. Fillopódiumok a kiterült interfázisos sejtek szélein, fodrok, lamellipódiumok, oszcilláló bütykök rendszerint csak az osztódó sejteken, a telofázis végén vannak {473, 1026}. A sejtek közt sok kontaktus alakul ki. Az összeérő széleken a mikrovillusok és a ritkább fillopódiumok interdigitálódhatnak. Ritkán kis fodrok is vannak a széleken {597}. Kolcemid hatására bütykök a normál fibroblasztokon is kialakulnak.

A transzformált sejtekben a mikrotubulus-mikrofilament rendszer egyensúlya megbomlott, aminek következtében aktin tartalmú kontraktilis elemek a mikrotubulus rendszerről leválva foltszerűen felhalmozódnak a membrán alatt. Ezeknek folyamatos kontrakciói okozzák a bütyköket. {610}. Kezeletlen CHO sejteken a membrán gomb-szerű kitüremkedései intenzív membrán mozgások középpontjai. A vékony CHO sejtek felülete sima, széleik fodrosak, a vastagabbakon bütykök és mikrovillusok vannak {592}. Más transzformált fibroblaszt sejtek felszínére is ez jellemző, de igen nagy változatosság figyelhető meg az egyes sejtek közt. A CHO sejtek felszíne sejtciklus specifikus változásokat is mutat {594}.

A többi megváltozott tulajdonsághoz hasonlóan a reverz transzformált sejtek felszíne is a normál sejtekéhez hasonlatos. A reverz transzformált CHO sejtekről eltűnnek a bütykök, helyette még több mikrovillus és a széleken fodor található, különösen a hosszú sejtek végeinél. A fodrokban nincs jelentős mennyiségi növekedés {553, 1022}. A membrán mozgásai nem szűnnek meg teljesen, finom hullámzássá szelődülnek. A mitózis során és a visszatapadás után is még kb. 1 óráig a bütykök megvannak reverz transzformált sejteken is {325}. Az L929 sejtek mozgása drámaian lecsökken {600}. Az ASV transzformált pocok FB sejtek reverz transzformációja során a legtöbb sejtnél rigid sima szélei vannak {1026}.

3.2.6.2. PERMEABILITÁS VÁLTOZÁSOK, TRANSPORTFOLYAMATOK

A reverz transzformációval párhuzamosan, részben membrándinamikai, részben általános metabolikus változások következményeképpen egyes anyagokra nézve a membrán permeabilitása megváltozik. Bt_2cAMP kezelés CHOK1-ben a sejtek 29 %-ában Ca^{2+} influxot okoz {472}. A glükóz felvételének sebessége jelentősen lecsökken a cukortranszport rendszer V_{max} értékének jelentős csökkenése következtében, míg a K_m érték változatlan marad. Az 'A' aminosav transzport rendszeren történő aminosav felvétel is jelentősen csökken, míg az 'L' transzport rendszer aktivitása változatlan marad {535}, ugyanakkor mások az aminosav transzport sebességének emelkedését figyelték meg {610, 1022}.

3.2.6.3. A SEJTFELSZÍNI GLÜKOPROTEINEK, GLÜKOLIPIDEK

Sejtkultúrában a magas molekulású fukóz tartalmú glükopeptidek jelenléte a transzformált állapot jellegzetes tulajdonsága. CHO sejtek reverz transzformációja során a sejtfelszín fukóz tartalmú glükopeptidjeinek átlag mérete csökken {1356}, egy 133 kDa membrán glükoprotein mennyisége megemelkedik {1102}. KonA kezelés a bivalens kationok megvonásához hasonlóan a sejtek felkerekedését idézi elő, melyet a reverz transzformáció meggátol. Bt₂cAMP kezelt SV40 transzformált egér FB sejtek csökkent szialil- és galaktozil-transzferáz aktivitást mutatnak {1359}.

3.2.6.4. AGGLUTINÁLHATÓSÁG

A kezeletlen CHOK1 sejtek KonA-val és valamivel gyengébben búzacsíra agglutininnel agglutinálhatók. Reverz transzformáció során a búzacsíra agglutininnel történő agglutinálhatóság jelentősen lecsökken {532}. Hasonlóan, az L929 sejtek jól agglutinálhatók, rövid MIX pulzust követően azonban az agglutinálhatóság jelentősen lecsökken {1107}.

3.2.6.5. ANTITEST + KOMPLEMENT

CHO sejtfelszíni antigének elleni poliklonális antitestek komplementtel együtt adagolva lizálják és megölik a sejteket. Komplement hiányában a sejtek nem lizálódnak, hanem felkerekednek. Reverz transzformált A_L sejtekre a kezeletlen A_L sejteket elpusztító a₁ antiszérum + komplement mennyiség nincs hatással {1022}. CHO ellenes poliklonális antitest + elölt komplement hatására a kezeletlen sejtek szintén felkerekednek, reverz transzformálás hatására ez is elmarad {532}.

3.2.6.6. A SEJTEK KÖZÖTTI KOMMUNIKÁCIÓ, METABOLIKUS KOOPERÁCIÓ

Néhány sejtvonalban összefüggés mutatható ki a sejtek közötti kapcsolatok permeabilitása, az elektromos kapcsolatok hiánya valamint a kontrollálatlan sejtnövekedés és az epiteliális morfológia között. Erre jó példát jelentenek a patkány máj tumor sejtvonalak {617}, az egér L sejtek {612} és L929 sejtek amelyek defektívek a metabolikus kooperációban és nem formálnak *gap junction*-t.

A BHK származék PyY transzformált sejtekből izolált *mec*⁻ mutánsok {630} morfológiája Bt₂cAMP és teofillin kezelést követően megváltozik, tipikus fibroblasztoid morfológiát vesznek fel. A parentális *mec*⁺ sejtek némiképp jobban megnyúlnak. 40 órás kezelés során jelentősen növekedik a kooperáció a Bt₂cAMP kezelt sejtek és a donorsejtek közt {617}. A *mec*⁺, *mec*⁻ és Bt₂cAMP kezelt *mec*⁻ sejtek fehérjemintázatában jelentős eltérések tapasztalhatók (3.2.11 fejezet, 20. o.){616}.

3.2.7. Extracelluláris matrix

3.2.7.1. FIBRONEKTIN

A normál és malignusan transzformált sejtek jellegzetes különbségeket mutatnak a sejteket normálisan extracellulárisan körbevevő fibronectin mátrix milyenségében. A tumorigenikus, kezeletlen CHO sejtek legfeljebb diffúz, szervezetlen fibronectin festődést mutatnak {533}.

A reverz transzformáció során a fibronectin indukálódik, és a fibronectin mátrix a normális sejtekéhez válik hasonlóvá. A fibronectin molekulák mintegy 12-18 óra múlva jelennek meg a felszínen, majd 48 óra múlva a felszínen gazdag filamentózus fibronectin mátrix szerveződik {454}.

3.2.7.2. FIBRONEKTIN RECEPTOR

Egyes rágszálósejtek *ras*, vagy más tirozin kináz onkogénnel való transzformációja során az α_5 integrin alegység expressziója lecsökken, az α_3 vagy β_1 alegységeké viszont nem, ami hozzájárulhat a fibronectin mediált letapadás erősségének transzformáció során bekövetkező csökkenéséhez {1039}. A fibronectin receptor α_5 alegységét különböző mértékben expresszáló CHO sejtek *nude* egérbe oltva az expresszió mértékével fordítottan arányos nagyságú tumort formálnak {452}. Ezzel szemben az $\alpha_5\beta_1$ fibronectin receptor megemelt expressziója szupresszálja a CHO sejtek transzformált fenotípusát. Az integrin túltermelés intenzitásával párhuzamosan emelkedik a fibronectin lerakódás a sejtek körül, a legerősebben túltermelő sejtnél a fibronectin szervezett mátrixot alkot. A túltermelés mértékével fordítottan arányosan csökken a lágyagarban való növekedés és az *in vivo* daganatformálás képessége {489}.

3.2.7.3. KOLLAGÉN

CHO sejtek reverz transzformációja során 6-9-szeres kollagén szintézis növekedés történik {532}. Ezzel ellentétben viszont extracelluláris kollagén rostok elektronmikroszkóposan nem láthatók {553}. A transzformált sejtek kevesebb hialuronánt is szintetizálnak {587}.

3.2.8. A citoszkeleton

A kolcemid és citokalazin B, valamint a cAMP hatása a citoszkeletonra antagonisztikus. A cAMP citoszkeleton szerveződést előidéző hatása kolcemiddel és citokalazin B -vel megakadályozható, azonban még nagyobb dózisú cAMP-al ez visszafordítható.

A normál fibroblaszt sejtekben egymással és a sejt hossz tengelyével párhuzamos mikrofilament köteg rendszer alakul ki. A nyúlványokban a mikrofilamentumok vagy diszkrét kötegekben, vagy a membrán alatt rétegben helyezkednek el {473, 1026, 593, 595}. A transzformáció során a mikrofilament kötegek a legtöbb esetben eltűnnek {1321, 1332, 1337, 1338, 1292, 1341, 1342}. A reverz transzformáció a mikrofilament rendszer normál sejtekre jellemző szervezettségét állítja vissza. A mikrofilament kötegek a sejt hossz tengelyével párhuzamosan helyreállnak, és láthatók a fillopódiumokban, a síma, vagy enyhén görbe membránok alatt és a mag körül. Citokalazin B a Bt_2cAMP ilyen jellegű hatását megakadályozza {473, 1026}.

A normál fibroblasztok vimentin antitesttel festve jellegzetesen szervezett intermediate filament rendszert alkotnak a sejtben {554}. Transzformált sejtekben az intermediate filamentumok organizációja megváltozik. Ez látható egy hörcsög sejt szarkóma vírussal történő transzformálása során {1335}, illetve CHOK1 sejtekben, amelyek rendezetlen, diffúz vimentin eloszlást mutatnak {554}. A reverz transzformált CHO sejtekben a rendezett, karakterisztikus vimentin mintázat helyreáll, bár nem 100 %-osan {554}. Az ASV transzformált pocok FB sejtek reverz transzformációjakor az intermediate filamentumok párhuzamossá válnak a többi mikrofibrillummal, és elsősorban a ritka nyúlványokban láthatók {1026}.

A normál sejtekre általánosan jellemző, hogy a mikrotubulusok a sejt hossz tengelyével és a mikrofilament kötegekkel párhuzamos rendszert alkotnak, amely a transzformáció során dezintegrálódik. A transzformált FB sejtekben a tubulin amorf, raktározott fehérjedepozit, rövid, dezorganizált mikrotubulusokkal {473, 1026, 553}. A reverz transzformált CHO sejtekben a mikrotubulusok száma konzekvensen, kvantitálhatóan megnő, sokkal denzebbé válnak {1022}, és a sejt hossz tengelyével párhuzamosan

orientálódva szervezett rendszert alkotnak. A sejtek magja körül is tubulin és aktin depozíció látszik {610}. Puck a reverz transzformáció összes hatásában - többek közt a genom DNáz érzékenységének megnövekedésében is - jelentős szerepet tulajdonít a mikrotubulusoknak {549, 550, 360}.

3.2.9. Anyagcsere

Egy alacsonyabb cAMP szint kialakulása a sejtben az aerob glükolízis megemelkedéséhez, és a specializált funkciók csökkenéséhez vezethet a neoplasztikus transzformáció során. A PyY sejtek médiuma rendkívüli módon elsavasodik, metil-xantinok jelenlétében azonban a kiindulási pH közelében marad. Ez a "normális" aerob glükolízishez való visszatérésre utalhat {1110}. Már nagyon régóta ismert, hogy a malignus elváltozások folyamán az oxidatív foszforiláció szintje csökken míg az aerob glükolízis intenzitása emelkedik {780}. Az anyagcsere intenzitásának eltolódását a glükolitikus reakcióút és az oxidatív foszforiláció enzimeit kódoló mitokondriális és nukleáris gének expressziójának változásai kísérik. Northern blot analízisekkel tisztasejtes karcinómában, onkocitómában és urotéliális vesetumorkban, a belőlük származó sejtvonalakban és a megfelelő kontrollszövetekben vizsgálták az ATP-produkcióban résztvevő enzimek mRNS-einek mennyiségét. Az összes vizsgált mitokondriális transzkriptum szintje alacsonyabb volt a tumor biopsziákban és a tumor sejtvonalakban. Az oxidatív foszforilációban résztvevő nukleáris gének transzkripciója viszont magasabb szintű volt az onkocitómákban és a sokkal rosszindulatúbb urotéliális tumorban {766}.

Humán hepatocelluláris karcinóma biopsziából izolált mitokondriumok csökkent respiratorikus ATP szintézist és ATP szintáz aktivitást mutatnak, amely az ATP szintáz β csökkent mennyiségének következménye. A neoplasztikus szövetekben ugyanakkor az ATPáz inhibitor protein IF1 expressziója emelkedett, ezzel hozzájárulva a glükolitikus ATP hidrolízisének gátlásához {762}.

Az RNS és fehérjeszintézis szükségességéről látszólag ellentmondó eredmények vannak, melyekből az derül ki, hogy legalábbis a reverz transzformáció korai jelenségeihez nincs szükség *de novo* RNS és fehérje szintézisre {369, 533}. A korai hatások minden valószínűség szerint olyan molekulákat használnak fel, amelyek már raktározott formában jelen vannak a sejtben. Egészen biztosan ilyen a mikrotubulusok újraépülése, amely raktározott tubulinmolekulákból történik {1022, 649}.

3.2.10. Fehérje foszforilációs változások

A fehérje foszforilációs mintázat beli változások a cAMP és származékai egyik részletesen tanulmányozott hatását képviselik. A reverz transzformációt előidéző kezelések során:

- CHO sejtekben egy 55 kDa fehérje foszforilálódik, és egy 20 kDa fehérje defoszforilálódik {666}.
- cAMP függő foszforilációt mutattak ki a filamin, egy mikrotubulus asszociált protein és egy intermediate filament protein esetében is {648}.
- Egy 97.4, egy 67, egy 45, egy 36 és egy 25 kDa fehérje foszforilációja emelkedik; egy 61 és egy 41 kDa fehérje pedig defoszforilálódik. Ezen fehérjék foszforilációja cAMP hatására CHO-180 normál fibroblasztokban is megváltozik, ezért nem valószínű, hogy ezek foszforilálódása a reverz transzformáció része {554}.
- Bt₂cAMP kezelés hatására három 70 kDa, de eltérő pI értékű fehérje és egy 58 kDa fehérje (vimentin) foszforilációja megnő. Normál sejtekben a Bt₂cAMP ezen fehérjék foszforilációjára hatástalan {554}.



- Egy 32 kDa fehérje foszforilációja a normál fibroblasztokban nem változik, a CHO-K1 sejtekben viszont a transzformált sejtekre jellemző hiperfoszforilációja eltűnik {554}.
- Egy 73, egy 62, egy 58, egy 55, egy 50, és egy 48 kDa fehérje foszforilálódik, míg egy az előbbtől eltérő pI értékkel jellemezhető 55 kDa fehérje defoszforilálódik {476}.
- Egy 43 kDa, aktin családba tartozó protein foszforilálódik {475}.
- Foszforilálódik a vimentin CHO sejtekben, HeLa, HT1080, RFS HL60, U937, CHBIV sejtek viszont a vimentin cAMP hatására bekövetkező foszforilációját nem mutatják {554}.
- Patkányok intraperitoneális Bt₂cAMP injekcióját követő 15 percen belül a májsejtekben a 15-40 valamint 60-85 kDa tartományban található savas magi fehérjék foszforilációjának kb. 30 %-os emelkedését lehet megfigyelni {1124}.
- LeCam és mtsai. a cAMP kezelésre nem reagáló CHO mutánsokból {511} egy 52 kDa fehérje-szubsztrátot foszforiláló reverz transzformáció függő aktivitás hiányát jelezték {667}.

3.2.11. Fehérje mintázat, enzimaktivitás és génaktivitás változások

A reverz transzformáció során bekövetkező morfológiai és fiziológiai változások meglehetősen részletességgel feltártak. Ugyanakkor a párhuzamosan lejátszódó fehérjemintázat-, enzim- és génaktivitás változásokról viszonylag kevés direkt információ áll rendelkezésre. Ezért érdemes a cAMP analógokkal történő kezelés más rendszerekben kifejtett hatásait is áttekinteni, az ott kapott eredmények ugyanis igazak lehetnek a reverz transzformációra is. Néhány specifikus esetben azonban az interpretáció félrevezető lehet, ami óvatosságra int. Bt₂cAMP kezelés hatására a különböző sejt- és szövettípusokban, valamint *in vivo* a következő enzim- és génaktivitás változásokról számol be az irodalom:

- **A metabolikus kooperáció helyreállításában potenciálisan szerepet játszó fehérjék:** A *mec*⁺, *mec*⁻ és Bt₂cAMP kezelt *mec*⁻ BHK PyY származék sejtvonalak {630} fehérjemintázatában jelentős eltérések tapasztalhatók. A *mec*⁺ sejtekben erősebb egy 90, egy 28 és egy 13.5 kDa, míg a *mec*⁻ sejtekben egy 185, egy 97, egy 88, egy 29, egy 27.5, egy 15.5, egy 15 és egy 13 kDa fehérje mennyisége mutatkozik többnek. A kétféle *mec* fenotípusú kezeletlen és kezelt sejt fehérje expresszió mintázata négyféleképpen alakulhat. 1) a polipeptidek nagyobb részének mennyisége nem változik egyik sejtben sem a kezelés hatására. 2) a kezelés hatására mind a *mec*⁺, mind a *mec*⁻ sejtben csökken egy 58 kDa és egy 29 kDa fehérje mennyisége, növekszik egy 61 kDa fehérje mennyisége. 3) a kezelés során csak a *mec*⁺ sejtekben növekszik a mennyisége egy 64 kDa, egy 42 kDa, egy 31.5 kDa és egy 24.5 kDa fehérjének. A két utóbbi csoport olyan fehérjéket reprezentál, amelyek a Bt₂cAMP kezelés hatására megváltoznak, de a metabolikus kooperáció helyreállításához nincs köztük. 4) a *mec*⁻ sejtek kezelésekor a *mec*⁺ fenotípus helyreállása során csökken a mennyisége egy 28 kDa és egy 13.5 kDa fehérjének, növekszik a mennyisége egy 27.5, egy 15.5, egy 15, és egy 13 kDa fehérjének. Ezek a különbségek azonosak a kezeletlen *mec*⁺ és *mec*⁻ sejtek összehasonlítása során kapott különbségekkel, és valószínűleg olyan fehérjéket reprezentálnak, amelyek mennyiségi változása hozzájárul a *mec* fenotípus helyreállításához {616}.
- **L típusú piruvát kináz:** A piruvát kináz a glükolitikus reakció út utolsó lépését, a foszfoenol-piruvát → piruvát átalakulást katalizálja. 'L' alakja máj, 'M' alakja izom specifikus. Aktivitása éhezési és hormonális állapot függvényében váltakozik. Patkányok hosszas glukagon kezelése az L-típusú

piruvát kináz mRNS-ének drámai csökkenését okozza. Bt_2cAMP $0.2-20 \frac{mg}{test\ súly\ kg * \ ora}$ dózisban hasonló hatású {656}.

- **Laktát dehidrogenáz (LDH):** Az LDH enzim a (keto)piruvát \rightarrow laktát átalakulást katalizálja anaerob körülmények között. Patkány C6 glióma sejtekben Bt_2cAMP illetve izoproterenol és MIX indukció hatására az LDH enzim mennyisége mintegy 5-szörösére emelkedik. Az indukcióhoz *de novo* mRNS szintézis kell {531}.
- **Foszfoenol-piruvát karboxikináz (PEPCK):** A PEPCK a glükoneogenezis kiinduló lépését, az oxálacetát \rightarrow foszfoenol-piruvát reakciót katalizálja. Intakt patkányokat Bt_2cAMP -al és teofillinnel intraperitoneálisan kezelve a májban a PEPCK mRNS mennyisége 45 perc alatt a detektálhatatlan szintről megemelkedik, majd gyorsan lecsökken. Folyamatos kezeléssel állandó mRNS szint és enzimszintézis tartható fenn {526, 557}. A Bt_2cAMP patkány máj szervkultúrában {525} és H4-II-E patkány hepatóma sejtekben {527} is PEPCK indukciót okoz.
- **Tirozin aminotranszferáz:** A tirozin aminotranszferáz a fenilalanin tirozinon keresztül történő lebomlásának reakcióútjában a tirozin \rightarrow 4-OH-fenil-piruvát átalakulást katalizálja. Intakt patkányokat Bt_2cAMP -al és teofillinnel intraperitoneálisan kezelve a tirozin aminotranszferáz mRNS indukálódik {529}. Patkány máj szervkultúrában a Bt_2cAMP és a hidrokortizon tirozin aminotranszferáz indukciót okoz, a Bt_2cAMP indukció azonban sokkal gyorsabb kinetikájú {525}. Érdekes, hogy egér hepatóma sejteken mind a mikrotubulus dezorganizáláshoz szükséges dózisu kolcemid, mind a Bt_2cAMP tirozin aminotranszferáz indukciót okoz, és hogy egymás hatását potenciózzák {625}.
- **Tirozin hidroxiláz:** A tirozin hidroxiláz enzim a katekolamin szintézis kezdő lépését, a tirozin \rightarrow dioxi-fenilalanin átalakulást katalizálja, a katekolamin szintézis kulcsenzime. Dexametazon, forskolin és cAMP kezelés hatására PC7e (PC12 származék) sejtekben a tirozin hidroxiláz mRNS mennyisége megemelkedik {651}.
- **Hidroximetil-glutaril-koenzim A reduktáz:** A HMG-KoA reduktáz a szteroid szintézis kulcsenzime, a β -OH- β -metil-glutaril-KoA redukcióját katalizálja mevalonsavvá. CHO sejtekben a HMG-KoA reduktáz aktivitása 2-3 szorosára emelkedik Bt_2cAMP kezelést követően {1003}. Citokalazin B kezelés hatására viszont aktivitása csökken {1003, 1004}. Génjének DNáz érzékenysége Bt_2cAMP hatására szintén nő {456}.
- **Alkalikus foszfatáz:** Az alkalikus foszfatáz egy 76 kDa glükoprotein, oligoszacharid oldalláncai valószínűleg szíálsavat tartalmaznak. Egér L sejtekben Bt_2cAMP kezelés hatására 5 órás *lag* periódus után az alkalikus foszfatáz kb 2000-szeres indukciója játszódik le 7 nap alatt {530}.
- **Aktinok:** Bt_2cAMP kezelés hatására CHO sejtekben egy 43 kDa, aktinszerű, foszforilálódó protein jelenik meg 20 perc múltán. Raktározott RNS-ről képződik, vagy legalábbis kezdetben nem igényel új transzkripciót, azonban a transzkripciós szintű indukció sem kizárható {475}.
- **Ornitin dekarboxiláz (ODC):** Az ODC enzim emlősökben az ornitin \rightarrow putreszcin + CO_2 átalakulást katalizálja; a poliaminok bioszintézisének kulcsenzime. Szérum és/vagy Bt_2cAMP stimulációra szérum éheztetett CHO sejtekben az ODC aktivitás 2 óra múlva emelkedik, majd gyorsan alapértékre áll vissza. 8-9 óra múlva megindul a DNS szintézis {515}. CHO sejtekben a koleratoxin is ODC aktivitás növekedést okoz {536}.

- **Dihidrofolát reduktáz (DHFR):** A DHFR enzim a dihidrofolsav tetrahidrofolsavvá történő redukciójáért felelős enzim. A tetrahidrofolsav fontos kofaktora sok egyszénatomos transzfer reakciónak, mint a timidilát és purin szintézis, amelyek a DNS szintézishez szükségesek. Nyugvó 3T6 sejtek szérum stimulációja során a DHFR szérum indukciója gátolt, ha az Bt₂cAMP, vagy más az intracelluláris cAMP szintet emelő drogokkal párhuzamosan történik {1413, 1348}.
- **Transzglutamináz:** A transzglutaminázok egy enzim csoport, amelyek fehérjék kovalens kereszt-kötését végzik ε-(γ-glutamil)-lizin hidakon keresztül. Egymásból levezethető sejtvonalak esetében a transzglutamináz aktivitás transzformált fenotípussal párhuzamos csökkenése figyelhető meg {626}. CHO sejtekben alacsony sejtdenzitásnál a transzglutamináz aktivitás 8BrcAMP-al koncentráció függő módon befolyásolható {451}.
- **p21^{ras}:** Mell (MDA-MD-231) és vastagbélrák (LS-174T) sejtek {560}, valamint Ha-MuSV transzformált NIH3T3 sejtek 8Cl-cAMP illetve Bt₂cAMP kezelése lecsökkenti a p21^{ras} fehérje mennyiségét. Szérum éhezéssel G₀-ban szinkronizált patkány aorta simaizomsejtek szérum indukcióját a Bt₂cAMP koncentráció függő módon gátolja, miközben a *c-ras^{Ha}* protoonkogén mRNS mennyisége ugyancsak koncentráció függő módon jelentősen csökken {362}. Patkányok DMBA indukált emlő tumorsejtjeiben a p21^{Ha-ras} mennyisége élesen csökken a tumor ovariektómia vagy Bt₂cAMP kezelés hatására bekövetkező regressziójával párhuzamosan {1275}.
- **pp60^{src}:** A pp60^{src} kináz a cAMP-től független kinázaktivitással rendelkezik {1333}. Bár a transzformált fenotípus reverziója nyilvánvaló, a Bt₂cAMP kezelt és kezeletlen ASV transzformált pocok FB sejtek pp60^{src} kinázaktivitása egységnyi fehérjére vonatkoztatva nem különbözik {473}.
- **c-myc:** A HL-60 promielocita sejtvonalon monocita és granulocita differenciációs irányba indukálható különböző ágensekkel. A HL-60 Bt₂cAMP hatására bekövetkező differenciálódásával párhuzamosan a *c-myc* mRNS és fehérje eltűnik {558}.
- **Prolaktin:** cAMP blokkolja egy dopamin agonista prolaktin expressziót gátló hatását hipofízisben. A cAMP szint emelése cAMP analógok adásával a prolaktin gén transzkripciójának 4-5 -szörös emelkedését idézi elő a stimulálatlan GH4 sejtekhez képest {1041}.
- **Szomatosztatin:** PC12 sejteket 4 órán át forskolinnal kezelve a szomatosztatin mRNS mennyisége 4-szeresére emelkedik {654}.
- **Ovotranszferrin:** A HL-60 sejtekben a *c-myc* fehérjével párhuzamosan az ovotranszferrin receptor expressziója is megváltozik, a differenciációval párhuzamosan a sejtfelszíni és celluláris transzferrin receptor eltűnik {366}.
- **Acetilcolin észteráz:** Az acetilkolin észteráz enzim az idegi irányba differenciálódó sejtek jellegzetes markere. C1300 neuroblasztóma sejtekben az acetilkolin észteráz enzim aktivitását mind a Bt₂cAMP mind a szérum megvonás megnöveli {1270}.
- CHO sejtben MIX kezelés egy kb. 200 kDa fehérje indukcióját okozza, ami talán miozin. Teofillin + MIX egy 72 kDa, teofillin magában pedig egy másik 130 kDa fehérjét indukál. Ugyanakkor az is elképzelhető, hogy e két utóbbi csak degradációs termék {454}.

A cAMP direkt génregulációs hatásait sem szabad ugyanakkor figyelmen kívül hagyni a reverz transzformáció során bekövetkező génexpressziós változások tárgyalásakor. cAMP *responsive* elemek találhatóak többek között a tirozin hidroxiláz, a szomatosztatin, a PEP karboxikináz, a VIP, a parathormon, a proenkefalin, az α -chorion gonadotropin, és a c-fos génjében, a citomegalovírus enhanszerében, a BLV LTR -ben, a HTLV-II LTR-ben és az intraciszternális A partikulum génjében. A CRE palindrom viszont nem található meg néhány olyan gén promoterében, amelyekről ismert, hogy cAMP regulálhatóak, ilyen például a növekedési hormon és a prolaktin, ami arra utal, hogy más mechanizmus is létezik, amely a cAMP génexpressziót befolyásoló hatásáért felelős

3.2.12. Kromatinszerkezet

Az aktívan expresszálódó kromatin a DNáz I számára sokkal hozzáférhetőbb. A differenciálatlan egér teratocarcinóma 12-1 sejt kromatinja sokkal gyorsabban emésztdődik és kisebb fragmenteket ad, mint a differenciált 12-1a. F9, PCC4-aza, OTT6050-F1-Brdu sejteknél ugyanezt tapasztalták: a stem sejtek sokkal érzékenyebbek, míg a differenciált vonalak sokkal ellenállóbbak, bár sejttípusonként eltérő mértékben {606}. Ez ellentmondásban áll a reverz transzformációnál tapasztaltakkal, ott az aktívan osztódó differenciálatlan (malignus) sejtek az ellenállóbbak {602}. A CHO-K1 sejteket reverz transzformálva az emésztsési mintázat a normál fibroblasztokéhoz válik hasonlóvá {555}. A DNáz I érzékenységs változása a genom különböző szakaszait nem egyformán érinti (3.2.1 táblázat) {556}.

In vivo nick translációs módszerrel és konfokális mikroszkópiával jól nyomon követhető, hogy a felnyílt DNS normál sejtekben a nukleáris perifériára koncentráldódik, míg a kezeletlen CHO-K1 sejtek diffúz, uniform festődést mutatnak. Reverz transzformált CHO-K1 sejteken a mintázat a normál fibroblasztokéhoz hasonló, perifériális lokalizációjú. A kezeletlen C6 glióma magok szintén uniform festődést mutatnak, míg a kezelt C6 gliómasejt magja szerkezetileg a patkány embrionális agyi fibroblasztéra hasonlít. A mintázat átrendeződése, csakúgy mint a reverz transzformáció többi jelensége, reverzibilis. {609, 464}.

Sejtvonal	Detektált régió	Fragmentek száma	DNáz I emészthetőség		Változás a Bt ₂ cAMP kezelést követően
			Kezeletlenül	Bt ₂ cAMP kezelve	
CHO-K1	HMG-KoA reduktáz	3	Rezisztens	Szenzitív	+
CHO-K1	18S, 5.8S 28S rDNA	1	Szenzitív	Szenzitív	0
CHO-K1	?, random klón	1	Szenzitív	Szenzitív	0
CHO-K1	?, random klón	1	Szenzitív	Szenzitív	0
CHO-K1	?, random klón	1	Szenzitív	Szenzitív	0
CHO-K1	?, random klón	10	Rezisztens	Szenzitív	+
CHO-K1	?, random klón	1	Rezisztens	Szenzitív	+
CHO-K1	?, random klón	1	Rezisztens	Szenzitív	+
A ₁ -J1	HP29	1	Szenzitív	Szenzitív	0
A ₁ -J1	A36Fc	24	Rezisztens	Rezisztens	0
A ₁ -J1	Hp67	1	Szenzitív	Szenzitív	0
A ₁ -J1	Humán β globin	1	Rezisztens	Rezisztens	0

3.2.1 táblázat. Génspecifikus DNáz I érzékenység változások CHO-K1 és A₁ sejtek reverz transzformációja során. HP29, A36Fc és HP67: 11-es humán kromoszóma specifikus alacsony kópiaszámú repetitív szekvenciák.

3.2.13. Retinsav

Néhány transzformált sejt a reverz transzformációhoz hasonló jelenséget mutat, ha retinsavval kezelik. Retinsav, amely antagonizálja a forbolészter és a pp60^{src} géntermék tumor indukáló hatását, a cAMP-hoz hasonlóan viselkedik: gátolja a CHO sejtek szuszpenzióban történő növekedését, míg a szubsztráton való növekedést nem {625}.

3.2.14. Gyógyászati perspektívák

A cAMP szintet emelő drogok, illetve szubsztituált cAMP származékok széleskörű morfológiai és fiziológiai hatása gyógyászati alkalmazási lehetőségeket is felvet. Ugyanakkor, a gyógyászati alkalmazások irodalma - az alapkutatási eredményekhez képest mindenképpen - meglehetősen csekély. Ennek oka többek között minden bizonnyal az, hogy a reverz transzformációs hatások csaknem mindegyike teljes mértékben reverzibilis, a drogok elvonását követően az eredeti állapot áll vissza. A tényleges törekvéseket viszont mindenképpen jól demonstrálja, hogy a 8Cl-cAMP, a legpotensebb helyspecifikus cAMP analóg, a 80-as évek végén a preklinikai kipróbálás I-es fázisában volt a *National Cancer Institute*-ban {558}.

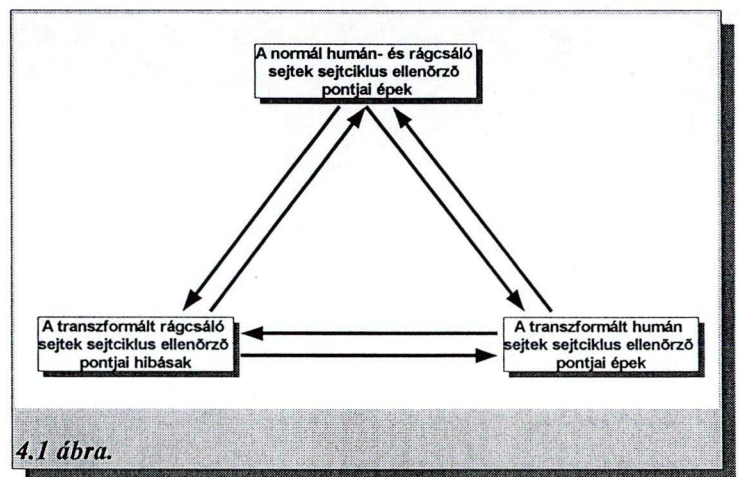
Állatkísérletekben jelentős eredmény, hogy ovariektómiát vagy Bt₂cAMP injekciót követően a Sprague-Dawley patkányokban DMBA hatására indukálódott tumor visszahúzódik hasonlóan ahhoz, ahogy a normál emlő is atrofizál ovariektómia után {1273}. A hormon dependens emlő tumorokban a Bt₂cAMP és az ösztrogén hatás egymással antagonistáz {1274, 1085}.

4. Célkitűzések

Az irodalmi adatok és kollaborációs partnereink személyes közlése alapján kirajzolódott egy általános kép, amely a malignusan transzformált rágcslősejtek, a transzformált humán sejtek és a normál sejtek tulajdonságai közti különbségeket vázolja fel:

1. A normál humán és normál rágcslősejtek (primer fibroblasztok, vagy akár immortalizált fibroblasztok) sejtciklus ellenőrző pontjai épek, a sejtek válasza a vizsgált technikákkal teljesen normálisnak tekinthető.
2. A legtöbb transzformált humán sejt sejtciklus ellenőrző pontjai épek. Egy-egy ellenőrzőpont vonatkozásában azonban lehetnek kivételek, például egyes vastagbél karcinóma sejtek mitotikus ellenőrzőpontjának defektusa kromoszomális instabilitást okoz {705}.
3. A legtöbb transzformált rágcslősejt sejtciklus ellenőrzőpontjai hibásak. Egy-egy sejtvonal azonban egyes ellenőrzőpontok helyes működését mutatja.

Citogenetikai módszerekkel egy sejt tulajdonságait meg lehet változtatni úgy, hogy a háromszög alakú modellen (3.1.1 ábra) tulajdonságai egy másik csúcs irányába mozduljanak el. A transzformált kínai hörcsög ovárium sejt kémiai ágensekkel reverz transzformálható, szinte az összes tulajdonsága a normál sejtre jellemzővé változik; a változás reverzibilis. Ugyanezen sejtek egyes tulajdonságai "humanizálhatók"; szomatikus CHO/humán hibridsejtben a jelenlévő humán kromoszómák komplementálhatják a vizsgált sejtciklus ellenőrzőpont defektusát. Egyes domináns onkogének túltermeltetésével pedig a transzformált fenotípust fokozni tudjuk. Ezen séma alapján a dolgozatomban felvázolt kísérletek a következő kérdésekre kerestek választ:



kus CHO/humán hibridsejtben a jelenlévő humán kromoszómák komplementálhatják a vizsgált sejtciklus ellenőrzőpont defektusát. Egyes domináns onkogének túltermeltetésével pedig a transzformált fenotípust fokozni tudjuk. Ezen séma alapján a dolgozatomban felvázolt kísérletek a következő kérdésekre kerestek választ:

1. Melyek lehetnek azok az onkogének, tumor szupresszorok vagy sejtciklus szabályozó faktorok, amelyek megváltozott működése a CHO sejtek transzformációját, sejtciklus szabályozásának megváltozását okozta?
2. A CHO sejtek reverz transzformálása hogyan befolyásolja az S és M fázisos ellenőrzőpont működését?
3. Lehet-e befolyásolni a CHO sejtek sejtciklus ellenőrzőpont szabályozásának sajátosságait egyes onkogének túltermeltetésével? Befolyásolja-e a túltermeltetés a reverz transzformáció képességét és a morfológiát?
4. Lehet-e olyan CHO/humán szomatikus hibridsejtet találni, amelyben az S és M fázisos ellenőrzőpontok működése helyreállt?

5. Anyagok és módszerek

5.1. ANYAGOK

5.1.1. Mikrobiológiai táptalajok és pufferek

2YT tápoldat: 1.6 % tripton; 1 % élesztőkivonat, 0,5 % NaCl

LB-agar táptalaj: 2 % tripton; 1 % élesztőkivonat; 0.02 M NaCl; 1.5 % agar, 100 µg/ml ampicillin

SOB tápoldat: 2 % tripton; 0.5 % élesztőkivonat; 0.01 M NaCl; 2.5 mM KCl; 0.01 M MgCl₂; 0.01 M MgSO₄

YTB tápoldat: 1 % tripton; 0.5 % élesztőkivonat; 0,5 % NaCl

Fágpuffer: 20 mM Tris*HCl, pH:7.4; 100 mM NaCl; 10 mM MgSO₄

SEM TB puffer: 10 mM PIPES; 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl; 55 mM MnCl₂; pH:6.7

SM puffer: 50 mM Tris*HCl, pH:7.5; 100 mM NaCl; 8 mM MgSO₄; 0.01 % zselatin

5.1.2. Sejtenyésztéshez használt anyagok

0.1 % polylyzin (Poly-L-Lysin Hydrobromide, MW 70000-150000, Sigma #P6282)

15 lyukú multiteszt tárgylemez (ICN Flow, #6041505)

Carnoy fixáló: metanol:jégecet 3:1 arányú jég hideg elegye frissen készítve

DPX (BDH #36029 4H)

Hank's hipotonizáló oldat: 136 mM NaCl; 5.3 mM KCl; 1.2 mM MgSO₄; 400 mM Na₂HPO₄; 400 mM KH₂PO₄; 28 mM fenolvörös; 250 mM CaCl₂; 4.1 mM glükóz; 5.2 mM NaHCO₃

PBS: 136 mM NaCl; 2.6 mM KCl; 5 mM Na₂HPO₄; 1.7 mM NaH₂PO₄

Propidium-jodidos festőoldat FACS analízishez: 0.5 mg/ml propidium-jodid; 100 mg/ml RNáz A; 0.1% Na₃-citrát; 0.1% Triton-X100; 1000 x (PI) illetve 100 x törzsoldatokból frissen hígítva.

Toluidin-kék festék: 2.5 g por alakú toluidin kék festéket teljesen feloldottunk 500 ml desztillált vízben. Hozzáadtunk 0.3 g NaHCO₃-ot, gondosan elkevertük, szobahőmérsékleten 1 órát állni hagytuk, majd Whatman No 1. szűrőpapíron átszűrtük

5.1.3. Molekuláris biológiai munkákhoz használt vegyszerek

10X MOPS puffer: 200 mM MOPS, pH:7.0; 50 mM Na-acetát; 10 mM EDTA;

10X TBE puffer: 1 M Tris-borát; 20 mM EDTA pH:8.3

20X SET: 3 M NaCl; 20 mM EDTA; 0.6 M Tris*HCl, pH:8.0

20X SSC: 3 M NaCl; 0.3 M Na₃-citrát, pH:7.0

20X SSPE: 3M NaCl; 200 mM NaH₂PO₄; 20 mM EDTA; pH:7.4

25X TAE puffer: 1 M Tris-acetát; 25 mM EDTA, pH:7.7

50X Denhardt's: 1 % BSA; 1 % ficoll; 1 % polivinil-pirrolidon

Lízispuffer: 0.32 M szukróz; 5 mM MgCl₂; 10 mM Tris*HCl, pH:7.4; 1% Triton-X100

SOL D: 4 M guanidinium-tiocianát; 25 mM Na-citrát; 0.5 % szarkozil; 0.1 M 2-β-merkaptotanol

STET puffer: 50 mM Tris*HCl pH:8.0; 50 mM EDTA; 8 % szacharóz; 5 % Triton X-100

TE puffer: 10 mM EDTA; 1 mM Tris*HCl, pH:8.0

TNE puffer: 50 mM Tris*HCl pH:7.5; 100 mM NaCl; 5 mM EDTA

5.2. MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK

5.2.1. Restriktációs emésztések

Plazmid valamint eukarióta genomiális DNS restriktációs hasítására a New England Biolabs, az MBI Fermentas, az Amersham, a Pharmacia valamint az NBL enzimmészítményeit használtuk, a gyártók által megadott reakciókörülményeket biztosítva.

5.2.2. Fragmentált DNS elválasztása gélelektroforézissel

Az emésztett DNS fragmentumok méret szerinti elválasztására mérettartomány szerint 6 %-os poliakrilamid gélt (40-600 bp), vagy 0.8-1.2 % agaróz gélt (0.4-10 kb) használtunk. A poliakrilamid gélt akrilamid-biszakrilamid 29:1 arányú elegyből, 0.01 % ammónium-perszulfát, és 0.005 % TEMED segítségével polimerizáltuk, futtatását 1x TBE pufferben végeztük. Az agaróz gélt 1x TAE pufferben futtattuk. A DNS fragmentumokat 0.1 µg/ml koncentrációjú etidium-bromiddal festettük.

5.2.3. Ligálási reakció

A ligálást 10 µl térfogatban, a New England Biolabs katalógus által megadott pufferben, T4 DNS ligáz enzimmal végeztük 16 °C-on, egy éjszakán keresztül. Az elegyben a vektor mennyisége 50 ng volt, az inszert ehhez képest 6-szoros moláris feleslegben volt jelen.

5.2.4. *Escherichia coli* transzformálása plazmiddal

Klónozási munkáinkhoz az *E. coli* DH5α, XL1-Blue, XL1-Blue MR és SURE labortörzseit használtunk. A sejteket 30 ml SOB tápoldatban 18 °C-on rázatva szaporítottuk OD₆₀₀=0.5-0.6 értékig. 10 percig jégen inkubáltuk, majd centrifugálással kiülepítettük (2500 rpm; 10 perc, 4 °C). Ezt követően 10 ml SEM TB pufferben reszuszpendáltuk, 10 percig inkubáltuk jégen, és újra kiülepítettük. Ezután 2.5 ml SEM TB pufferben szuszpendáltuk fel, majd 200 µl DMSO-t kevertünk hozzá, és ismét inkubáltuk jégen 10 percig. A kompetens sejteket 250 µl-es adagokra szétosztva folyékony nitrogénben lefagyasztva tároltuk.

A transzformáláskor a kompetens sejteken jégen felolvasztottuk, 2 µl ligálóelegyet kevertünk hozzá, és jégen tartottuk 30 percig. A DNS felvételét 30 másodperces 42 °C-os hőszökkel indukáltuk. 800 µl SOC tápoldatot (SOB + 0.02 M glükóz) adva hozzá egy órára rázatással regeneráltattuk a sejteket. 20, 100 és 200 µl-es adagokat szélesztettünk a megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB-agar lemezekre. Ezzel a módszerrel 10⁸ nagyságrendű telep/µg hasíthatlan vektor transzformációs gyakoriságot értünk el.

5.2.5. Plazmid kinyerése forralásos módszerrel

3 ml antibiotikumot tartalmazó SOB tápoldatban ráztuk 37 °C-on egy éjszakán át a baktériumkultúrát. A tenyészet 1.5 ml-ének sejtjeit centrifugálással kiülepítettük, 200 µl STET pufferben s felszuszpendáltuk, majd a sejteket 15 µl 10 mg/ml frissen készített lizozim oldat adása után forró vízfürdőn feltártuk. A sejtörmeléket centrifugálással kiülepítettük, és fogpiszkálóval eltávolítottuk. A felülúszóhoz 200 µl hideg izopropanolt adva a nukleinsavakat kicsaptuk, majd centrifugálás, mosás, szárítás után 25 µl TE pufferben oldottuk fel. Restriktációs fragmentáláskor az elegybe 0.03 µg/ml DNáz mentes RNázt adtunk.

5.2.6. Plazmid preparálása nagy mennyiségben

100 µg/ml ampicillin tartalmú tápfolyadékban egy éjszakán át növesztett starterrel oltottunk be 1 l YTB tápoldatot. 37 °C-on levegőztettük OD₆₀₀=0.4-0.5 értékig, ekkor 170 mg kloramfenikollal amplifikáltuk, és egy éjszakán keresztül tovább rázattuk. Másnap kiülepítettük a sejteket (4000 rpm; 30 perc), majd 6 ml 25 % szacharóz, 50 mM Tris*HCl, pH:8.0 oldatban szuszpendáltuk fel. 1.2 ml 250 mM Tris*HCl, pH:8.0; 5mg/ml lizozim oldatot adva hozzá a sejtfalet felbontottuk. 2.4 ml 250 mM EDTA, majd 9.6 ml 50 mM Tris*HCl, pH:8.0; 62.5 mM EDTA, 0.2 % Triton X-100 oldat hozzákeverése után a feltárt sejtuszpenziót 16000 rpm fordulattal 60 percig centrifugáltuk. A felülúszót TNE telített fenollal, ezt követően kloroform:izoamilalkohol 24:1 arányú keverékével extraháltuk, majd 0.1 térfogat 20 %-os K-acetátot, és 2.5 tf. hideg etanolt adva hozzá a nukleinsavakat kicsaptuk. Mosás és szárítás után RNáz kezeléssel az RNS-t eltávolítottuk, majd megismételtük az extrakciós és kicsapási lépéseket. A plazmid DNS-t egyensúlyi etidium-bromid CsCl grádiens centrifugálással vagy Sephacryl S1000 oszlopkromatográfiával tisztítottuk tovább.

5.2.7. λ fág DNS preparálás

Késő délután Ø 90 mm Petri csészénként körülbelül 10⁵ pfu λ fagot összekevertünk 100 ml éjszakán át növesztett LE392 baktérium kultúrával, és 37 °C-on 20 percig inkubáltuk. Ezt követően 2.5 ml 0.6 %-os, 47 °C-os LB fedőagarózzal elkevertük, és LB lemezek felületére kiöntve egyenletesen eloszlattuk. A lemezeket lefordítva másnap reggelig 37 °C-on inkubáltuk. Reggel a lemezekre 5 ml SM puffert tettünk, a fedőagarózt óvatosan felkapargatva belegyűjtöttük egy 30 ml-es JA20-as centrifugacsőbe, és 30 percig szobahőn időnként megrázogatva inkubáltuk. Ezt követően 9000 RPM fordulattal 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk, majd a felülúszót tiszta csőbe gyűjtöttük.

A λ lizátum felülúszóhoz 1µg/ml végkoncentrációkban RNázt és DNázt (marha hasnyálmirigyből, Sigma, DN25) adtunk, és 37 °C-on 30 percig inkubáltuk. Ekkor azonos térfogat 20 % PEG 8000; 2 M NaCl oldatot adtunk hozzá, és jeges vízfürdőn 1 óráig inkubáltuk. A kicsapódott fágreszecskeket ezután 9000 RPM-el, 20 percig, 4 °C-on centrifugálva kiülepítettük, majd a felülúszót maradéktalanul eltávolítottuk a centrifugacsőből. Ezt követően az eredeti lizátum 10 ml-ére 1 ml fágpuffert számolva az üledéket felsuszpendáltuk, majd a törmeléket a szuszpenzióból 9000 RPM, 2 percig, 4 °C-on történő centrifugálással távolítottuk el. Ezt követően fenol majd fenol-kloroform végül kloroform-izoamilalkohol azonos térfogataival extraháltuk, majd a fág DNS-t etanollal kicsapva üvegbotra tekerve nyertük vissza. 70 %-os etanollal mostuk, szárítottuk, majd TE pufferben vettük fel.

5.2.8. Genomiális DNS preparálása sejt kultúra sejtjeiből

Genomiális DNS-t Woodhead és mtsai. módszerének {673} kis módosításával preparáltunk. A Ø 90 mm Petri csészén nőtt sejteket 2-szer mostuk PBS-el, 1 ml PBS-ben sejtkeparóval felkapargattuk. Eppendorf csőbe gyűjtöttük, és 1200 RPM fordulattal 5 percig centrifugálva kiülepítettük. Ezt követően 10 mM Tris*HCl, pH:7.5; 100 mM EDTA; 1 % szarkozil és 100 µg/ml proteináz K (Merck) oldat 500 µl-ében felsuszpendáltuk, és egy éjszakán át inkubáltuk 55 °C-on. Fenol majd fenol-kloroform végül kloroform-izoamilalkohol azonos térfogataival extraháltuk, etanollal kicsaptuk, majd üvegbotra tekerve kinyertük. Mostuk 70 %-os etanollal, szárítottuk és TE pufferben vettük fel.

5.2.9. RNS preparálás sejtkultúra sejtjeiből

Sejtkultúrában tartott sejtekből RNS-t Chomchynsky és Sacchi {176} módszere szerint preparáltunk. A sejteket 500 µl SOL D oldatban lizáltuk, a lizátumot Eppendorf csőbe gyűjtöttük. 50 µl 2 M Na-acetát pH:4.0 oldatot adtunk hozzá, majd azonos térfogatú vízzel telített fenollal, savas körülmények között extraháltuk. A fázisok elválását 100 µl kloroform:izoamilalkohol 24:1 elegyével, 15 perc jégen történő inkubálással segítettük elő. Centrifugálás után a felülúszót azonos térfogatú izopropanollal kicsaptuk, majd 300 µl SOL D oldatban feloldottuk. Etanollal ismét kicsaptuk, 70 %-os etanollal mostuk, szárítottuk, majd dietil-pirokarbonát-tal kezelt tridesztillált vízben oldottuk fel. Koncentrációját 260 nm-en történő fotometrállással állapítottuk meg.

5.2.10. DNS Southern blott

10 µg megfelelő restrikciós enzimmal fragmentált genomiális DNS-t 0.8 %-os agaróz gélen 1x TBE pufferben, maximum 40 V feszültséggel elektroforézissel szétválasztottuk. A gélt utólag festettük etidium bromiddal, és a későbbi fragmentméret meghatározás céljából fotóztuk. Ezt követően a gélt 2-szer 15 percig 0.25 M sósavban áztatva a DNS-t hidrolizáltuk, 1 óra hosszáig 0.5 M NaOH és 1.5 M NaCl oldatban denaturáltuk, majd 1 óra hosszáig 1 M Tris*HCl, pH 8.0 és 1.5 M NaCl oldattal neutralizáltuk. Ezután a DNS-t kapilláris transzfer módszerrel Hybond N+ (Amersham) nylon filterre blottoltuk át, és UV keresztkötőben kovalensen rögzítettük.

5.2.11. RNS Northern blott

Az izolált össz RNS 10 µg-nyi aliquotjait 0.9 % agaróz/formaldehid gél elektroforézissel választottuk szét 1X MOPS pufferben {506}. Kapilláris módszerrel 20X SSPE pufferben Amersham Hybond N nylon membránra blottoltuk át, és UV keresztkötőben 2 percig kovalensen rögzítettük.

5.2.12. DNS radioaktív jelölése

Teljes hosszában jelölt próbákat random oligonukleotid primer extenziójával nyertünk (Amersham Multiprime kit) a gyártó utasítása szerint. A jelölt DNS-t és a be nem épült aktivitást Sephadex G-50 gélszűrő oszlopon, vagy kicsapással választottuk el. A beépült aktivitás rendszerint $2-4 \times 10^7$ cpm körüli érték volt 50-100 ng bevitt DNS fragmentum esetén.

5.2.13. Hibridizáció

A nukleinsavakat tartalmazó filtereket a jelölt radioaktív próbával, 0.33 M NaH_2PO_4 , 6.66 % SDS oldatban, 65 °C-on egy éjszakán át hibridizáltuk. A filtert fokozatosan erősödő stringenciával mostuk a következők szerint: 2x SSPE, 0.1% SDS, 3*15 perc, szobahőn; 2x SSPE, 0.1% SDS, 15 perc, 65 °C-on; 1x SSPE, 0.1% SDS, 15 perc, 65 °C-on; végül 0.2x SSPE, 0.1 % SDS, 15 perc, 65 °C-on. Ezután rendszerint egy éjszakán át autoradiografáltuk. A filterről a jelet közvetlenül Molecular Dynamics típusú foszforimagerrel, vagy pedig az autoradiogramm denzitometrállásával kvantitáltuk. A kvantitatív analízis értékeit a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDh) mRNS mennyiségére vonatkoztatva normáltuk.

5.2.14. Kolóniahibridizáció

A baktériumokat hordozó lemezről nitrocellulóz filterrel replikát készítettünk, majd a filtert 0.5 M NaOH oldattal kétszer 3 percig, 1 M Tris*HCl, pH:7.4 oldattal 5 percig, majd 0.5 M Tris*HCl, pH:7.4; 1.5 M NaCl oldattal 5 percig kezeltük. A filterekre a DNS-t UVP típusú UV keresztkötővel, 2 perces besugárással rögzítettük, majd 65 °C-on 2 óráig mostuk a filtereket 5x Denhardt's; 0.5 % SDS oldatban. Ezt követően 6x SET; 1x Denhardt's; 0.1 % SDS oldattal előhibridizáltuk 15 percig, hozzáadtuk az előzőleg denaturált radioaktív próbát (2×10^6 cpm/ml), és egy éjszakán át hibridizáltuk 65 °C-on. Másnap 2x SSC; 0.1 % SDS oldatával mostuk 65 °C-on négyszer 20 percig. Szárítás után autoradiografáltuk.

5.3. SEJTBIOLOGIAI MÓDSZEREK

5.3.1. Sejtenyésztés

A munkánk során alkalmazott sejtek nagy része kínaihörcsög ovárium (CHO) sejtvonal származék. A CHO-K1 ovárium szövetkultúrából létrehozott fibroblaszt vonal {1430} spontán transzformációjából keletkezett hipodiploid sejtvonal {665}. A spontán kromoszomális átrendeződések következtében csaknem az összes génre nézve aneuploid, ezzel tökéletes alanya a mutagenesis vizsgálatoknak {567}. A CHO-K1 modális kromoszómaszáma 21, DNS tartalma kb. 4 %-al alacsonyabb, mint a normál kínaihörcsög sejté. A normál kínaihörcsög sejtek kromoszómaszáma 22. A CHO sejtben a kromoszómaszám variációit legtöbbször az egy vagy két legkisebb metacentrikus kromoszóma elveszése okozza. G sáv festéssel a CHO-K1 8 kromoszómája tűnik normálisnak: 1, 2, X, 6, 8, 10, 11, míg a többi kromoszómán kisebb nagyobb átrendeződések, deléciók, inszerciók vannak. Az átrendeződött kromoszómákat Kao és munkatársai Z kromoszómáknak nevezték el {567}. A G sávozási mintázat több-kevesebb biztonsággal lehetővé teszi az egyes Z kromoszómák eredetének beazonosítását {1118}:

- A Z1 egy intakt N1, a rövid kar végéről hiányzik egy sötét sáv.
- A Z2 hosszú karja az N2 hosszú karja, rövid karja az N2 rövid karján bekövetkezett deléció eredménye.
- A Z3 és Z7 az N4 és N5 közötti transzlokáció eredménye. A Z3 az N4 hosszú karját és a rövid kar egy kis részét tartalmazza; egy sötét sáv előtt fuzionált az N5 rövid karja. A Z3 ennek következtében metacentrikus. A Z7 az N5 hosszú karja, és a centromer felett egy kis darab a rövid karból; ehhez fuzionált hozzá az N4 terminális sötét és világos sávja.
- A Z4 egy pericentrikus inverzió átesett N4.
- A Z5 egy a centromer közeli részen kis deléciót tartalmazó N5.
- A Z6 egy N6, aminek a hosszú karjához egy extra sötét és világos sáv fuzionált.
- A Z8 egy N7, de egy extra sötét és világos sávot tartalmaz a rövid karon.
- A Z9 egy N7, egy extra világos sávval a rövid karon.
- A Z10 egy N8, a rövid kar egy része deletálódott.
- A Z11 hasonló az N9-hez, a hosszú karon egy extra világos sávval
- A Z12 semmire nem hasonlít, valószínűleg az X₂ centromeronja.
- A Z13 valószínűleg deletált N10

A CHO-K20 vonal modális kromoszóma száma 20, kariotípus még analízise nem történt meg.

A kísérleteink során alkalmazott sejtvonalatokat a 5.3.1 táblázat foglalja össze. A sejteket 10 % újszülött borjú savó, 100 NE/ml penicillin és 100 µg/ml sztreptomycin tartalmú F12 {537}, MEM, illetve DMEM tápoldatokban tenyésztettük. A reverz transzformációhoz a médiumot 200 µM N⁶, O²-dibutiril-adenozin-3':5'-ciklikus monofoszfát

Sejtvonala	Rövid leírása	Médium	Referencia
HeLa	humán cervikális karcinóma	MEM	
primer egér fibroblaszt		DMEM	
C113T3	immortalizált egér fibroblaszt	MEM	{487}
10a2b	transzformált egér fibroblaszt	MEM	{486}
A9	8-azaguanin és 6-thioguanin rezisztens 'L' transzformált egér fibroblaszt vonal származék	DMEM	
A9+15	15-ös humán kromoszómát hordozó A9 származék	DMEM	{683}
CHO-K1	kinaihörscög ovárium sejtvonala	F12	{324}
CHO-K20			
15A	15-ös humán kromoszómát hordozó CHO-K1	F12	{463}
A _L	11-es humán kromoszómát hordozó CHO-K1	F12	{868,485}
AND6	A 11-es humán kromoszómán neo rezisztenciát hordozó A _L származék	F12	{599}
901-11D	A 11-es humán kromoszóma q karján deléciós A _L származék	F12	
128-2B3	A 11-es humán kromoszóma p karján deléciós A _L származék	F12	

5.3.1 táblázat. A munkánk során használt sejtvonalak.

(Bt₂cAMP, Sigma) és 15 µM tesztoszteron (Sigma) {325} hozzáadásával egészítettük ki.

RNS preparáláshoz kb. 2x10⁶ sejtet lemeztünk ki egy-egy 90 mm átmérőjű Petri csészére normál és reverz transzformáló tápoldatban. A sejteket három napos tenyésztést követően dolgoztuk fel.

5.3.2. Kromoszómapreparálás

A médiumot a Petri csészéből egy 15 ml-es Falcon csőbe gyűjtöttük, majd 2 ml meleg PBS-el mostuk a sejteket, a PBS-t a megfelelő Falcon csőbe gyűjtve. Ezt követően 1 ml tripszinnel inkubáltuk a sejteket, amíg felkerekedtek, gyengéden felszuszpendáltuk őket, majd a szuszpenziót a megfelelő Falcon csőbe gyűjtöttük. A még lemezen maradt sejteket 1 ml PBS-el belemostuk a Falcon csőbe. Ez követően a csőben lévő sejtsuszpenziót (5 ml) 10 ml-re egészítettük ki meleg desztillált vízzel és 15 percig 37 °C-os vízfürdőben inkubálva hipotonizáltuk. 1000 rpm fordulaton 5 perces centrifugálással a sejteket kiülepítettük, majd egyetlen határozott, de óvatos mozdulattal leöntöttük a folyadékot a sejtekről, a visszacsorgó néhány cseppben újra felszuszpendáltuk őket. 5 ml jéghideg Carnoy oldatot hozzáadva felszuszpendálva fixáltuk a sejteket. Centrifugálás után a felülúszót ismét leöntöttük majd 5 ml Carnoy oldatban felszuszpendáltuk. Ezt a mosási lépést összesen háromszor hajtottuk végre.

Ha a sejteket nem cseppentettük ki rögtön tárgylemezre akkor 2 ml Carnoy oldatban, hűtőszekrényben tároltuk a sejtsuszpenziót. Az utolsó centrifugálást követően maradt néhány csepp szuszpenziót jéghideg, nedves tárgylemezre cseppentettük ki. A tárgylemezeket száradás után kristályibolya vagy etidium bromid (1 µg/ml) oldattal festettük.

5.3.3. Mitotikus ellenőrzőpont vizsgálat I.

Egy-egy 60 mm átmérőjű szövettényesztő Petri csészére kilemeztünk 5x10⁵ sejtet. Másnap reggel a sejteket 0.04 µg/ml végkoncentrációjú nokodazollal blokkoltuk. 0-1-2-3-4-6-8-10-12 és 24 óra múlva a Petri csészékről mosás majd tripszinezés után az összes sejtet begyűjtöttük, és kromoszómát preparáltunk. Másik lehetőségként a sejteket többszöri PBS-es mosás után citocentrifugával tárgylemezre centrifugáltuk rá, Carnoy fixálóval fixáltuk, majd kristályibolyával festettük.



A preparátumokat látható fényben vagy UV fluoreszcenciával 100-szoros nagyítással értékeltük ki, és megadtuk minden sejtvonalra az adott időpontra jellemző mitotikus index ($\frac{\text{mitotikus sejtek száma}}{\text{össz sejt szám}}$) értéket.

A működő mitotikus ellenőrzőponttal rendelkező sejtek mitotikus indexe e rendszerben \approx 8-10 óráig meredeken emelkedik, utána lecsökken, ezáltal karakterisztikus csúcsot hozva létre. A hibás ellenőrzőpontú sejtek mitotikus indexének görbéjéről a csúcs hiányzik.

5.3.4. Mitotikus ellenőrzőpont vizsgálat II.

Egy-egy 90 mm átmérőjű szövettenyésztő Petri csészére kilemezelünk 3×10^6 sejtet. Következő nap reggel a sejteket 0.04 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációjú nokodazollal blokkoltuk. A mitotikus sejteket négy óra múlva leráztuk, majd 5-5 30 mm átmérőjű Petri csészére osztottuk szét. 0-1-2-3-4 óra múlva a lemezekről kromoszómát preparáltunk. A működő mitotikus ellenőrzőpontú sejtek mitotikus indexe a kezdeti kb. 90%-ról kb. 80%-ra, a hibás ellenőrzőpontú sejtéké kb. 45-50% -ra esik vissza.

5.3.5. Mitotikus ellenőrzőpont vizsgálat III.

Megfelelő számú 15 lyukú tárgylemezt 20 μl 1/10-ére hígított polilizin oldattal előkezeltünk, 10 percig hagytuk szobahőn állni, háromszor leöblítettük desztillált vízzel, majd levegőn megszárazítottuk.

A sejteket 2-5 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációjú kolchicinnel, vagy 0,04 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációjú nokodazollal blokkoltuk. Négy óra múlva leráztuk a mitotikus sejteket, majd a sejtuszuspenziót úgy állítottuk be, hogy 15-30, maximum 50 μl -ben legyen kb. 100 sejt. Kikapcsolt ventilációjú sterilfülkében, mikropipettával felvittük a megfelelő mennyiségű sejtuszuspenziót a tárgylemez lyukaiba. A tárgylemezeket CO_2 -dal előinkubált nedveskamrában a CO_2 termosztátba tettük.

0-1-2-3-4 óra múlva egy-egy tárgylemezt -20°C -os metanolban 5 percig fixáltunk, desztillált vízben öblítettük, 1/20-ára hígított toluidin kék oldattal 2 percig festettük, majd ismét öblítettük. A lyukak még kissé nedves állapotában a tárgylemezeket DPX-el fedtük. Az eljárás során a mitotikus kromoszómák pirosra (esetleg kékesre), az interfázisos magok erősen kékre, a citoplazma halványkékre festődtek.

5.3.6. Mitotikus ellenőrzőpont vizsgálat IV.

A kísérleteket Kung és mtsai. alapján végeztük {505}. Egy-egy 60 mm átmérőjű Petri csészére 50% konfluenciának megfelelő mennyiségű sejtet lemezelünk ki (CHO vonalak: 1.4×10^6 ; HeLa: 0.9×10^6 ; transzformált fibroblaszt vonalak [A9, 10a2b]: 1.15×10^6 ; C113T3, primer fibroblaszt: 0.9×10^6). Következő nap a sejteket 70 ng/ml végkoncentrációjú kolcemiddel (Demecolcin, Sigma) blokkoltuk. 72 óra múlva a Petri csészékről mosás majd tripszinezés után az összes sejtet begyűjtöttük. Centrifugálás (1000 rpm, 4°C , 5 min) után kétszer mostuk PBS+0.1% glükóz oldatában, majd sejt számlálás után 5×10^5 - 1×10^6 sejtet átvittünk egy új centrifugacsőbe, kiülepítettük, majd 1 ml propidium-jodidos festőoldattal 4°C -on 30 percig festettük. Ezt követően áramlási citometriával megmértük azon sejtek arányát, amelyekben a DNS tartalom a 4C-nek megfelelő értéknél (normál G_2/M) magasabb volt. Ép mitotikus ellenőrzőpontú sejtéknél ez 10% alatt marad, hibás ellenőrzőpontú sejtéknél pedig 80% feletti.

5.3.7. CHO sejtek transzfekeciója elektroporálással

Aktívan osztódó, egészséges CHO sejteket feltripszinezünk, majd kiülepítés után annyit tápfolyadékban vettünk fel, hogy 200 μl szuszpenzióban 4×10^6 sejt legyen. Elektroporátor küvettában

200 µl sejtszuszpenzióhoz hozzáadtunk 20 µl 1 µg/µl (összesen 20 µg) koncentrációjú, előzőleg a megfelelő helyen restriktíós endonukleázzal linearizált plazmid konstrukciót. Alapos keverés után a szuszpenziót 10 percig inkubáltuk jégen. A tápegységet 250 V feszültség, 25 mA áramerősség és 25 W teljesítmény értékekre állítva feltöltöttük az elektroporátort (Invitrogen Elektroporator II). Az elektromos pulzust 1000 µF és 8 Ω értékeken adtuk. A transzfekciót követően a sejteket ismét 10 percig inkubáltuk jégen, majd egy-egy 90 mm átmérőjű Petri csészére lemezeltek ki. A sejtek túlélése kb. 40-50 %-os volt, tapasztalatok alapján ilyen túlélés mellett a sejtek majdnem 100 %-a transzfectáns lesz.

A transzfectánsokat 400 µg/ml G418 (Geneticin, Gibco BRL) tartalmú tápoldatban való tenyésztéssel szelektáltuk ki; a szelekciót az elektroporálást követő második napon kezdtük el. Amint a G418 rezisztens sejtek kolóniává fejlődtek (mintegy 5-7 nap) transzfekciónként rendszerint 24 klónt izoláltunk, és stabil sejtvonalakat neveltünk belőlük.

5.3.8. Korai kromoszómakondenzáció indukálása (PCC)

A kísérlet első napjának délutánján kilemezeltek a vizsgálni kívánt sejtvonalakból 4-4 Ø 35 mm Petri csészére 5×10^4 sejtet. Második nap reggel 9-kor háromszori PBS-el történő mosás után 5% dializált FCS + PenStrep + GLU tartalmú ILE(-) F12 médiumban előszinkronizáltuk a sejteket 28 óra hosszan. Harmadik nap délután 1 órakor kiengedtük a sejteket a szinkronizáló blokkból: lecseréltük az ILE(-) médiumot meleg normál médiumra. Délután 5 órakor (4 óra *release*) 5 mM végkoncentrációjú hidroxycarboxamidot blokkoltuk a DNS szintézist. Negyedik nap 11 órakor (18 óra hidroxycarboxamid szinkronizálás) 2 mM végkoncentrációban koffein oldatot adtuk, majd kromoszómát preparáltunk 0, 2, 4 és 6 óra múlva. A preparátumokat etidium bromiddal festettük meg, és fluoreszcens mikroszkópiával értékeltük ki. A kiértékelés során legalább 200 sejtet számoltunk le, és a PCC-t mutató sejtek %-os arányát ábrázoltuk. Egyes kísérletekben koffein helyett 1 mM végkoncentrációjú 6-dimethylaminopurin-t vagy 100 mM végkoncentrációjú okadainsavat alkalmaztunk.

5.3.9. Sejttenyésztés lágyagarban

A kísérlet első napján a vizsgálni kívánt sejtek szubkonfluens kultúrájából egy-egy Ø 60 mm Petri csészére 1.5×10^6 sejtet lemezeltek ki 200 µM Bt₂cAMP + 15 µM tesztoszteron jelenlétében, illetve kezeletlenül. A második nap lecseréltük a médiumot, és előkészítettük a lágyagar kultúra alsó, sűrűbb rétegét: 1.4 % agaróz steril, vizes oldatát 42 °C-ra hűtve azonos térfogat 2x F12 + 20% FCS tápoldattal kevertük össze a szükséges mennyiségben, majd 1-1 ml-ét Ø 35 mm Petri csészék alján egyenletesen elosztottuk. Másnapig a CO₂ termosztátban tartottuk őket.

Harmadik nap feltripszineztek az előtenyésztett sejteket, és a sejtszámot 1350 illetve 13500 / ml -re állítottuk be 1x F12 + 10 % FCS tápoldatban (1000 illetve 10000 sejt / 750 µl szuszpenzió). Steril 1.4 %-os agaróz oldatot 42 °C-ra hűtöttünk. Kilemezeléskor összemértünk 750 µl sejtszuszpenziót, 375 µl agaróz oldatot és 375 µl 2x F12 + 20 % FCS tápfolyadékot (1.5 ml), gyorsan összekevertük és az előző nap elkészített agaróz Petri csészékbe öntöttük, egyenletesen elosztatva a felületén. A reverz transzformált sejtekhez a tápfolyadékot Bt₂cAMP-al és tesztoszteronnal egészítettük ki 2.5 ml re számolva.

Ezt követően a sejteket 10 napig tenyésztettük. A folyékony tápoldatot két naponta óvatosan lecseréltük. A tumorigenikus sejtek ezidő alatt gömb alakú kolóniákat formálnak, a normál sejtek nem osztódnak.

5.3.10. Szomatikus sejt fúziós hibridek előállítás

Mintegy 10^7 recipiens sejtet összekevertünk ugyanennyi donor sejttel 1 ml Hank's oldatban. A sejt-szuszpenzióhoz 1000 HE UV fényel 10-15 percig inaktívált Sendai vírust adtunk, 4 °C-on 30 percig inkubáltuk, majd Ø 100 mm Petri csészékre lemeztük ki. A szelekciót két nap elteltével kezdtük el.

5.4. GÉNEXPRESSZIÓS MINTÁZATOK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

5.4.1. Differential Display

A 'differential display' kísérleteket a GeneHunter Corporation RNAimage™ kitjeivel végeztük a gyártó utasításai alapján.

200 ng DNáz (MessageClean™ Kit, GeneHunter Corporation) kezelt össz RNS-t cDNS-é írtunk át 25 mM Tris*HCl, pH 8.3; 37.6 mM KCl; 1.5 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 20 μM dNTP; 0.2 μM H-T₁₁M primer; 100 U MMLV reverz transzkriptáz tartalmú reakcióelegyben, 20 μl végtérfogatban, 37 °C-on 80 percig. A cDNS szintézis termékének 2 μl-ét PCR-rel szaporítottuk fel 10 mM Tris*HCl, pH:8.4; 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂; 0.001% zselatin; 2 μM dNTP; 0.2 μM H-AP primer; 0.2 μM H-T₁₁M (ugyanaz, amelyet a reverz transzkripcióhoz használtunk); 1 μl α^[35S]-dATP, 1000< Ci/mmole (Amersham); 1 U AmpliTaq DNS polimeráz (Perkin Elmer) tartalmú reakcióelegyben, 20 μl térfogatban, a következő ciklusban: 30 mp 94 °C-on; 2 perc 40 °C-on, 60 mp 72 °C-on, 40 ciklusban; ezt egy 5 perces extenziós lépés követte 72 °C-on, majd a mintákat 4 °C-ra hűtöttük. Az amplifikációs termék 3.5 μl-ét 6 %-os denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el, 60 W konstans teljesítményen.

5.4.2. A cDNS fajták klónozása és szekvenciáinak meghatározása

A génexpressziós különbségeket mutató ígéretes sávokat a denaturáló gélből szikével kivágtuk, a DNS-t a gélszeletkéből 100 ml desztillált vízben való forralással kiextraháltuk, glikogén hordozó alkalmazása mellett etanollal kicsaptuk, majd 10 μl desztillált vízben vettük fel. Ennek 4 μl-ét amplifikáltuk fel 40 μl végtérfogatban, a fentiekhez (5.4.1) hasonló körülmények között, azzal a különbséggel, hogy a dNTP koncentrációja 20 μM volt, valamint nem adtunk izotópot.

A PCR termékét 1.5 %-os agaróz gélen ellenőriztük le, kivágtuk, majd a gélből GenElute™ Agarose Spin Column (Supelco) oszlopon kiextraháltuk. Az izolált cDNS-t ³²P izotóppal jelöltük, és radioaktív próbaként használtuk a megfelelő mRNS fajták expresszióváltásának ellenőrzéséhez.

A northern blott során is génexpresszió változást mutató cDNS-eket pCR-TRAP klónozó vektorban (GeneHunter Corporation) klónoztuk, és direkt szekvenáltuk. A szekvenciák meghatározása mindkét irányból, és cDNS fajtánként legalább két független klónból történt. A szekvenálást a Szegedi Biológiai Központ szekvenáló laboratóriumában Páy Anikó és Kószó Zsuzsanna végezte. A klónozott cDNS fajták expresszióját szintén leellenőriztük Northern blottal.

5.4.3. Szekvencia analízis

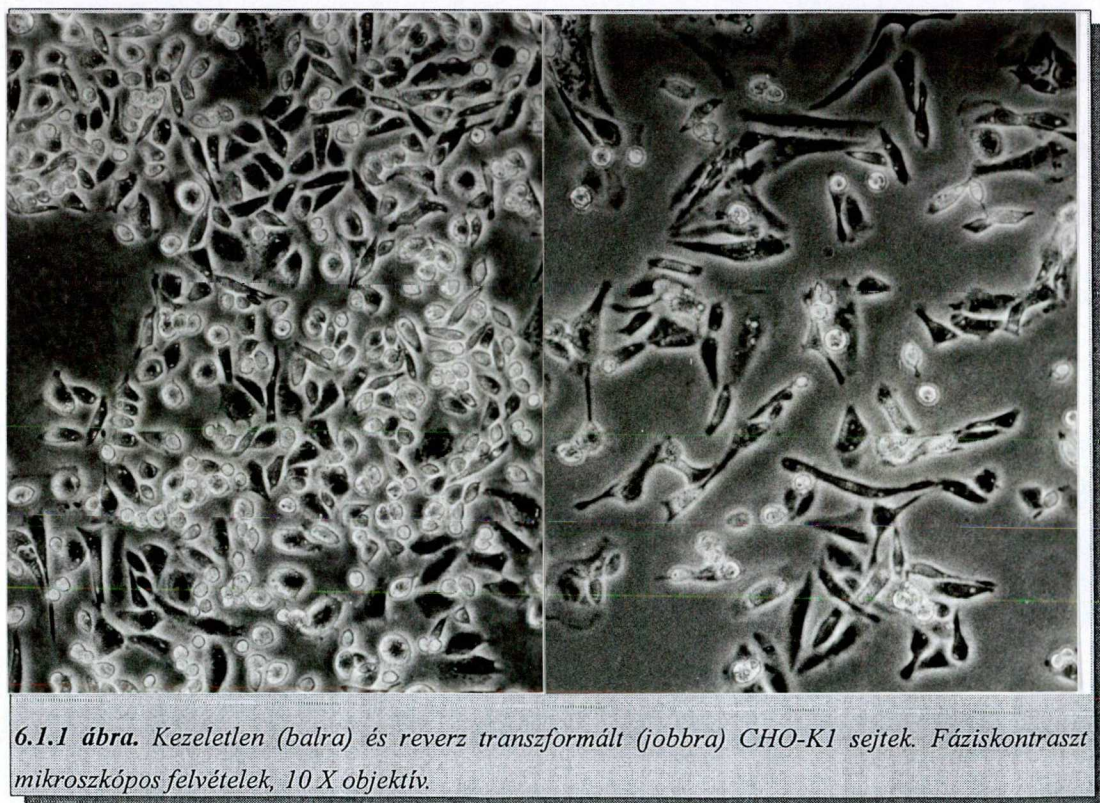
A cDNS szekvenciákat összehasonlítottuk az EMBL nukleinsav adatbázis tagjaival. A szekvenciaanalízishez a GCG programcsomag programjait használtuk{140}.

6. Eredmények

6.1. A REVERZ TRANSZFORMÁCIÓ HATÁSAI A GÉNEXPRESSZIÓRA ÉS A SEJTCIKLUS ELLENŐRZŐPONTOKRA

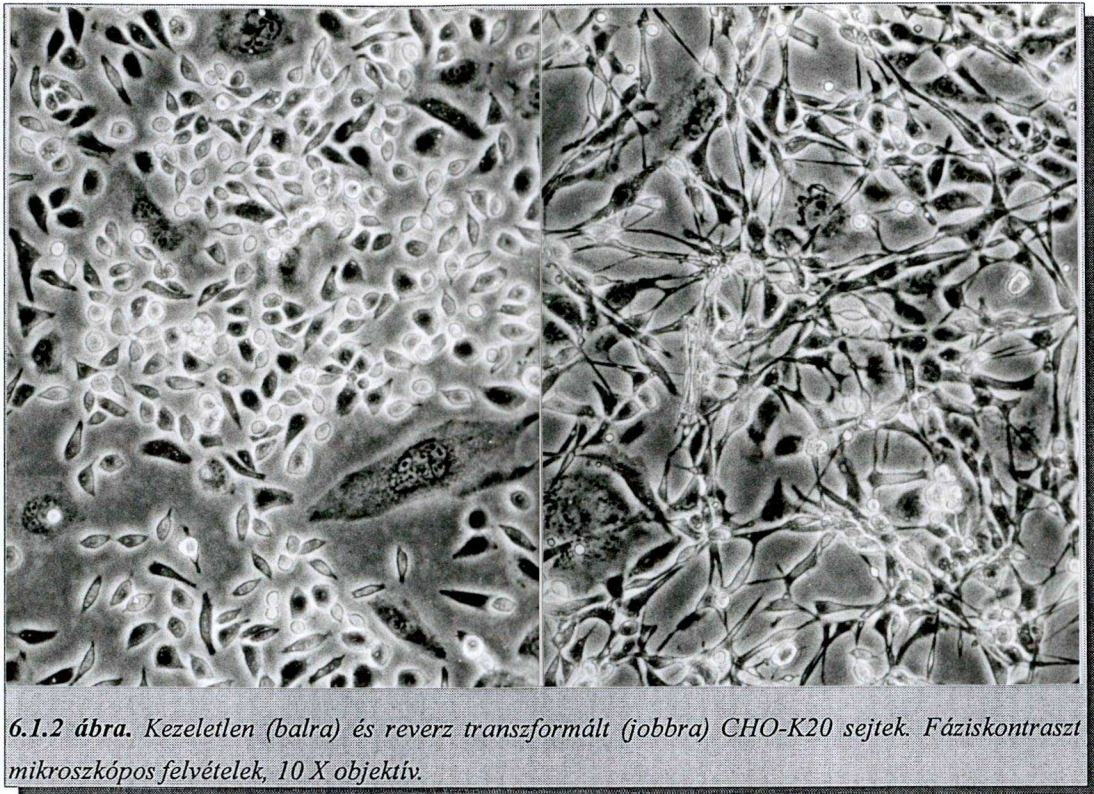
6.1.1. Génexpressziós mintázat -beli változások CHO sejtek reverz transzformációja során - Northern blott vizsgálatok

Amióta Hsie és Puck a CHO sejtek Bt₂cAMP és tesztoszteron hatására bekövetkező reverz transzformációját leírta {369}, a transzformált fenotípus reverzióját számos más sejtvonalnál kimutatták. Az egyes sejtvonalak, még a CHO szubklónok is a Bt₂cAMP és tesztoszteron kezelésre más-más intenzitással reagálnak, ezért arra számítottunk, hogy az általunk használt sejtvonalak sem viselkednek egyformán. A megnyúlás mértéke, a lágyagarban való szaporodás képességének elvesztése és a ciklusidő megnövekedése alapján a legintenzívebb választ a laboratóriumunkban a 70-es évek közepén izolált CHO-K20 jelű sejtvonal adta (6.1.1 és 6.1.2 ábrák). További vizsgálatainkhoz ezért ezt a vonalat választottuk.



6.1.1 ábra. Kezeletlen (balra) és reverz transzformált (jobbra) CHO-K1 sejtek. Fáziskontraszt mikroszkópos felvételek, 10 X objektív.

Össz RNS-t preparáltunk 2, 3, 8 és 15 napig reverz transzformáltatott; revertált; csak Bt₂cAMP-al; csak tesztoszteronnal kezelt; valamint kezeletlen kontroll CHO-K20 sejtekből Chomczynski és Sacchi módszere alapján {176}. Az RNS mintákat 0.9 % agaróz-formaldehid gélelektroforézissel {506} való elválasztás után Amersham Hybond N+ nitrocellulóz filterre blottoltuk át, és hibridizáltuk *c-jun*, *c-src*, *v-sis*, *v-ERB-B* és *wnt1* onkogén próbákkal. Hibridizációs kontrollként GAPDh próbát használtunk. Kísérleteinkben sikerült kimutatnunk a *c-jun* és a *c-src* onkogének kifejeződését, azonban ezek expressziója a reverz transzformáció során nem változott. A *v-sis*, *v-ERB-B* és *wnt1* próbákkal nem sikerült expressziót detektálnunk.



6.1.2 ábra. Kezeletlen (balra) és reverz transzformált (jobbra) CHO-K20 sejtek. Fáziskontraszt mikroszkópos felvételek, 10 X objektív.

6.1.2. Génexpressziós mintázat -beli változások CHO sejtek reverz transzformációja során - differential display vizsgálatok

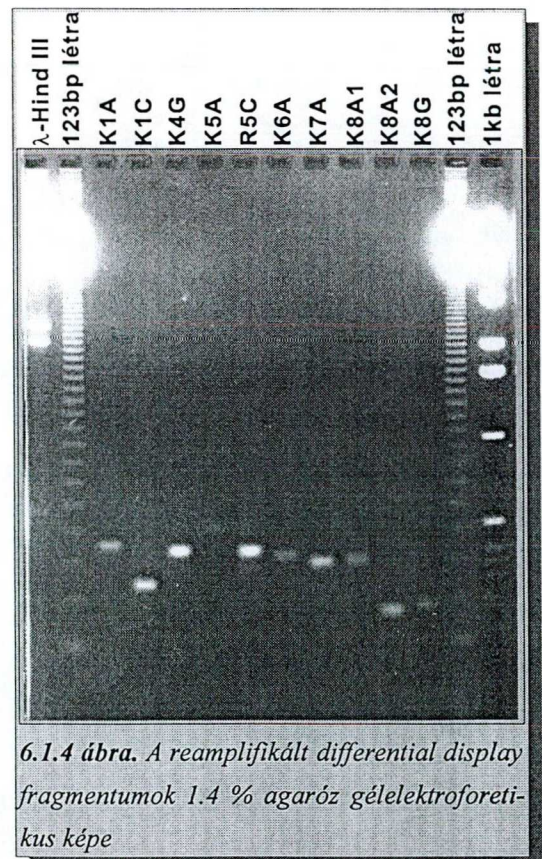
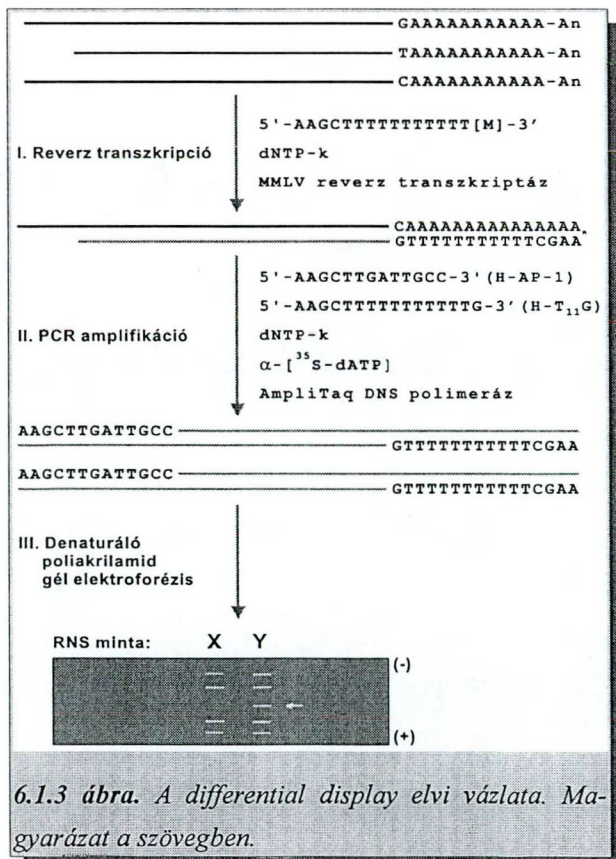
A reverz transzformáció során bekövetkező génexpressziós mintázat-beli változások kimutatásához a Northern blott hibridizációs kísérletek nem bizonyultak elég hatékonyak. Két egymáshoz közel álló szövet, sejtkultúra vagy esetleg fejlődési, differenciálódási állapot expressziós mintázatának összehasonlítására az irodalomban többféle módszert írtak le (szubtraktív hibridizálás {1496}, RNS *fingerprint* {1497}, *representational difference analysis* {450} ...), ezek közül a mi rendszerünkre a *differential display* {538, 392} látszott a legkönnyebben alkalmazhatónak.

A magasabb rendű eukarióta sejtek mintegy 100000 különböző génnel rendelkeznek, amelyeknek csak mintegy 15 %-a aktív a sejt egy adott fejlődési állapotában. A *differential display* reverz PCR alapú technika, két fejlődési állapotában vagy szövetében közelálló sejtfele részben átfedő expressziós mintázatát hasonlítja össze. A reverz transzkripcióhoz két bázispáros horgonnyal ellátott oligo dT primert használ, amelyből 12 féle lehetséges (mivel a T-re végződő dinukleotidok kiesnek: AA, AC, AG, AT, CA, CC, CG, CT, GA, GC, GG, GT, TA, TC, TG, TT), ezáltal az mRNS populációt 12 alpopulációra osztja. A reverz PCR-hez az 5' primereket úgy tervezik meg, hogy statisztikai valószínűséggel *annealing* pozíciójuk a mRNS 3' végétől legfeljebb 500 bázispárra essék, ami a szekvenáló gélek feloldási tartományának maximuma. Az 5' primer hibridizációja az egyes mRNS fajtákon random pozíciókon fog bekövetkezni, és a különböző cDNS-ek hosszúsága is különböző, de az adott mRNS-re nézve állandó lesz. Ennek megfelelően 6-7 bp hosszú 5' primer lenne statisztikailag ideális. Ezek olvadáspontja azonban már túlságosan alacsony, a Taq polimeráz optimális működési hőmérsékletén nem történik hatékony *annealing*. A 10 bp hosszú primerek viszont sokkal több cDNS fajtát produkálnak, mint ami statisztikailag lehetséges lenne, ami arra utal, hogy - legalábbis az első néhány ciklusban - *mispriming* is

előfordul. A 10 bp hosszú primerek úgy viselkednek statisztikailag, mintha 6-7 bp hosszúak lennének. Elméletileg mintegy 10000 ($4^6=4096$; $4^7=16384$) 6-7 bp primer lehetséges. Annak valószínűsége, hogy egy ilyen primer 500 bp-on belül talál párt magának eképpen 0.05 (500/10000). Ennek megfelelően 20 tetszőlegesen kiválasztott 10-mer - ami 6-7 -merként viselkedik - a 12 féle 3' primerrel párban, elegendő a teljes mRNA populáció lefedéséhez ($12 \cdot 20=240$). A dNTP koncentrációt rendkívül alacsonyra állítják be, ami a PCR reakció specifitását nagyban elősegíti - erre az egyébként laza *annealing* hőmérséklet miatt szükség is van -, ezen kívül lehetővé teszi a radioaktív jelölést is {538}.

Az első generációs *differential display* rendszernek voltak azonban hibái, egyes mRNA fajták redundánsan túl-, míg mások alulreprezentáltak szerepeltek benne, másrészt meglehetősen magas volt a fals pozitív fragmentumok száma, melyeket Northern blotban egyáltalán nem lehetett kimutatni később. A harmadik generációs rendszer az egyes mRNA fajták torzult reprezentáltságát küszöböli ki azzal, hogy csak 1 bp-os horgonyprimert használ (AT_N , CT_N , GT_N) ezáltal a kiindulási mRNA populációt csak három alpopulációra osztja, minimalizálva a kísérlethez szükséges reverz transzkripciók számát. A statisztikailag szükséges 240 kombinációhoz ekkor 80 tetszőleges 5' primer kapcsolódik, amelyek hosszabbak, ezáltal sokkal hatékonyabbak is. Mind az 5' mind a 3' primeren ezen kívül van egy HindIII restriktációs felismerőhely is, amely a későbbi klónozást könnyíti meg {386}. A harmadik generációs rendszerre alapul a GeneHunter Corporation RNAImage™ kitjeinek sorozata, amelyet kísérleteink során használtunk.

A *differential display* a gyakorlatban a következőképpen működik. A reverz transzkripcióban átírt cDNS populációt ugyanazzal a reverz primerrel, valamint egy tetszőleges 5' primerrel, radioaktív körülmények közt PCR-rel felszaporítottuk. A kapott radioaktív cDNS fragmentumokat ezután denaturáló poliakrilamid gél elektroforézissel szekvenálós gélen elválasztottuk (6.1.3 ábra), majd autoradiografáltuk. Az autoradiogramot a szárított géllal fedésbe hozva az expressziót váltó transzkriptet reprezentáló

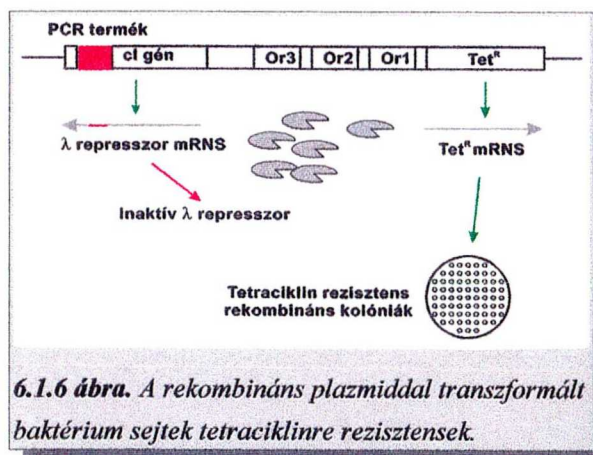
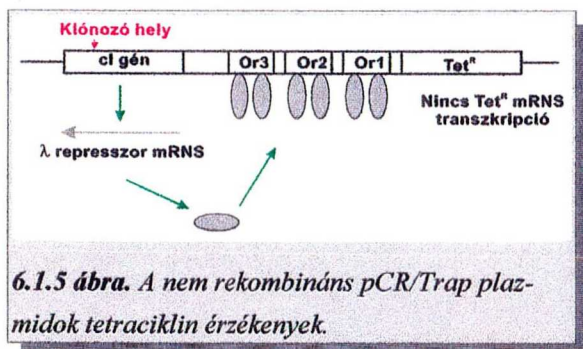


csíkot kivágtuk a gélből, majd a DNS-t eluáltuk belőle, és egy következő PCR reakcióban felszaporítottuk (6.1.4 ábra). A reakcióterméket közvetlenül radioaktívan jelölve Northern blott hibridizációs kísérletekben használtuk az expresszió váltás bizonyításához.

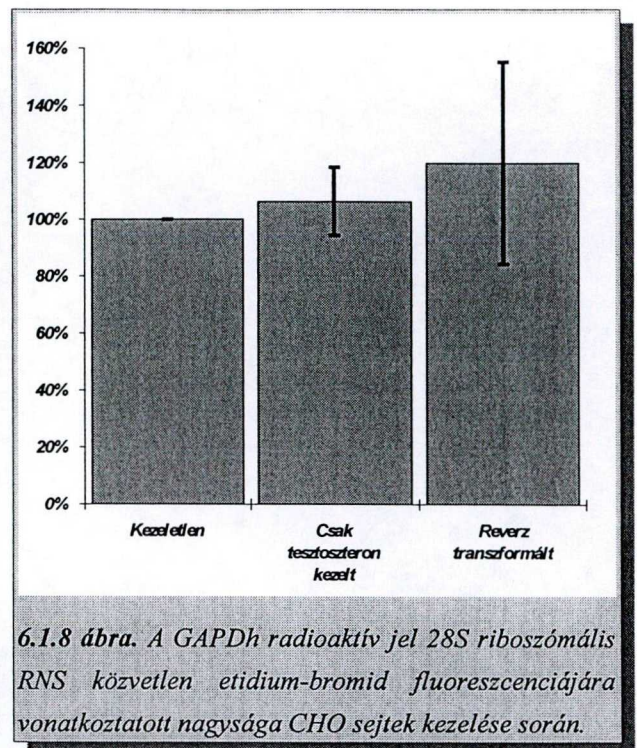
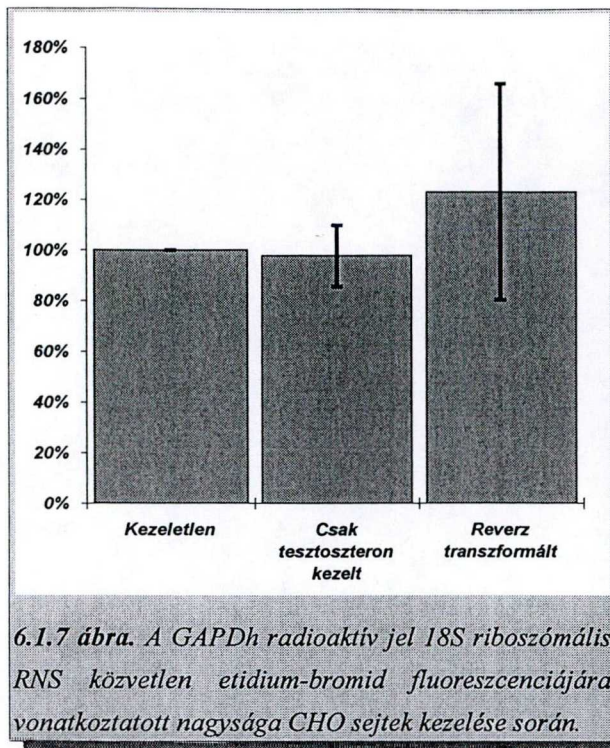
A Northern blotban is pozitívnak mutató fragmentumokat ezután a GeneHunter Corporation pCR/Trap vektorába klónoztuk. Ez a vektor elvi alapjaiban különbözik a több forgalmazó által is favorizált TA klónozó vektoroktól. A TA vektorok az egyszerű tompa végű klónozáshoz képest nagy előrelépést jelentettek a PCR fragmentumok klónozásában. A Taq DNS polimeráz azon tulajdonságát használják ki, hogy némi templát független polimeráz aktivitása folytán a termék DNS populáció mintegy fele egy 3' túlnyúló adozin nukleozidot hordoz. A vektoron ennek megfelelően 3' túlnyúló T van, amely azt az előnyt is biztosítja, hogy a vektor önmagában nem záródik össze. A rekombinánsokat kék/fehér szelekcióval lehet kiválasztani.

A pCR/Trap vektor ezzel szemben egy direkt, pozitív szelekciós vektor. A plazmid tetraciklin rezisztencia markert hordoz, amelyet a λ cI gén promotere hajt meg. A plazmidon rajta van a λ represszor gén is, benne a klónozóhellyel. A nem rekombináns klónokban nem képes tetraciklin rezisztencia kifejeződni, mivel a λ represszor a Tet^R gént represszálva tartja (6.1.5 ábra). A rekombináns konstrukciókban a beékelődött PCR fragmentum miatt inaktív λ represszor képződik, amely nem képes a Tet^R gént kikapcsolni; a rekombináns plazmidokat hordozó baktériumok ezért tetraciklinrel direkt szelektálhatóak (6.1.6 ábra).

A klónozott fragmentumokat ezután ismét visszaellenőriztük Northern blott hibridizációval. A



változatlanul expresszióváltást mutató cDNS klónokkal a hibridizációt legalább három független kísérletből származó RNS mintán megismételtük. Kontrollként kezeletlen és csak tesztoszteronnal valamint csak Bt₂cAMP-al kezelt sejtekből származó RNS-t használtunk. A hibridizációs jelet Molecular Dynamics 445 SI típusú PhosphorImager-en, ImageQuant 4.2 programmal értékeltük ki. Mindegyik filtert hibridizáltuk gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDh) cDNS próbával is, ennek jele szolgált belső kontrollként. Kísérleteink szerint a riboszómális RNS-ek mennyiségéhez képest a GAPDh mRNA szintje nem változik a reverz transzformáció során. A riboszómális RNSek mennyiségét az RNS gélek etidium-bromid fluoreszcenciájának közvetlen denzitometriás kiértékelésével határoztuk meg kezeletlen, csak 15 μ M tesztoszteronnal kezelt, és reverz transzformált CHO sejtekben (6.1.7 és 6.1.8 ábrák). A sejteket vagy 1 mM Bt₂cAMP kezeléssel magában, vagy 15 μ M tesztoszteron + 200 μ M Bt₂cAMP kombinációjával reverz transzformáltattuk. A változás nem szignifikáns, Student's t tesztben a p értékei páronkénti összehasonlításban



(kezeletlen / tesztoszteron kezelt; kezeletlen / reverz transzformált; tesztoszteron kezelt / reverz transzformált) a 18S rRNS esetén rendre 0.31, 0.11 és 0.13; a 28 rRNS esetén 0.11, 0.1 és 0.24. A riboszómális RNSeket kódoló génekről Ashall és mtsai. {456} kimutatták, hogy DNáz érzékenységük mind kezeletlen, mind reverz transzformált CHO sejtekben nagy, ami arra utal, hogy mindkét féle sejtben hasonlóan, konstitutívan expresszálódnak.

A szignifikáns expresszió változást mutató klónozott cDNS fragmentumokat ezt követően szekvenáltattuk.

A differential display kísérleteket a lehetséges 240 primerkombinációból 51-el végeztük el. A részleges kísérletek 69, az intenzitásban, és ezzel a génexpresszióban változást mutató cDNS

A fragmentum jele	A cDNS fragmentum mérete	A detektált mRNS mérete	Változások a reverz PCR fragmenttel hibridizálva	Változások a klónozott cDNS-el hibridizálva	A szekvencia accession number-e	Szekvencia homológia
K1A	~ 410 bp	~ 2.4 Kb	<	Nem kimutatható		
R7A	360 bp	~ 1.1 Kb	<<	139 ± 15 %	AF081140	eIF6/p27 ^{BSP}
A4C	~ 240 bp	~ 0.9 Kb	<	Nem kimutatható		
K4C1	496 bp	~ 3.1 Kb	<	≡		
		~ 1.7 Kb	<	≡		
		~ 1.4 Kb	<<	≡		
		~ 0.5 Kb	≡	≡	AF081142	Riboszómális protein CEP52 / Ubiquitin fúziós protein
R4A	159 bp	~ 1.7 Kb	<	133 ± 21 %	AF081138	NADH-Ubiquinon oxidoreduktáz 4-es lánc
K7C2	353 bp	~ 3.2 Kb	<	155 ± 29 %	AF081139	krit-1
K7C3	346 bp	~ 0.5 Kb	>>	62 ± 19.5	AF081143	40S riboszómális protein S18
A8C	520 bp	~ 0.7 Kb	>	Nem kimutatható	AF081141	Monocita kemoattraktáns protein 1

6.1.1 táblázat. A differential display kísérletekben expresszióváltozást mutató cDNS fragmentumok összefoglalása.

fragmentumot eredményeztek. Ezekből 39-et újra ellenőriztünk Northern blott hibridizációban, 8 bizonyult olyannak, amely expressziós változást mutató mRNS fajtaikat detektál. A 8 cDNS fragmentum adatait a 6.1.1 táblázat foglalja össze. Öt fragmentum adott reprodukálható változást, amelyeket a következőkben részletezünk.

A Northern blott kísérletek kvantitatív kiértékelése során nehézséget okozott hitelt érdemlően bizonyítani, hogy a kapott génexpresszió változások valóban szignifikánsak-e. Ugyanis a részleges differential display analízis során még nem kaptunk olyan gént, amely egyáltalán nem expresszálódna az egyik típusú sejtben, míg a másikban igen. Ez részben magyarázható azzal, hogy nem reverz transzformálódik a sejtek 100 %-a, illetve bizonyos sejtciklus specifikus különbségek sem látszanak, mivel aszinkron sejtpopulációval dolgozunk. Ez ugyanakkor előny is lehet, mivel a gyengébb változásokat nem fedik el az erősebbek.

A következő két fejezetben bemutatok négy olyan gént, melynek expressziója a reverz transzformáció során szignifikánsan változik (6.1.12 ábra). Annak alátámasztására, hogy a változások statisztikailag valóban szignifikánsak előbb következék egy negatív példa.

A *differential display* kísérletből kaptunk egy K4C1 jelű, 491 bp hosszúságú fragmentumot, amely a Northern blott kísérletekben 4 különböző mRNS-hez hibridizált (6.1.1 táblázat). A differential display technikáról tudott, hogy a reamplifikáció során a kapott termék sokszor nem

LOCUS	AF081142	496 bp	mRNA	ROD	11-JAN-1999
DEFINITION	Cricetulus sp. ubiquitin/ribosomal protein CEP52 fusion protein mRNA, complete cds.				
ACCESSION	AF081142				
NID	g4139065				
VERSION	AF081142.1	GI:4139065			
KEYWORDS					
SOURCE	Cricetulus sp.				
ORGANISM	Cricetulus sp. Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Cricetinae; Cricetulus.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 496)				
AUTHORS	Bachrati,C.Z., Downes,S. and Rasko,I.				
TITLE	Chemical reverse transformation of CHO-K1 cells induces changes in expression of a candidate tumor suppressor and of a gene not previously characterised as transformation-related				
JOURNAL	Unpublished				
REFERENCE	2 (bases 1 to 496)				
AUTHORS	Bachrati,C.Z., Downes,S. and Rasko,I.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (31-JUL-1998) Institute of Genetics, Biological Research Centre of Hungarian Academy of Sciences, Temesvari Krt. 62., Szeged H-6726, Hungary				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..496 /organism="Cricetulus sp." /db_xref="taxon:10031" /cell_line="CHO-K1" /note="differential display analysis"				
primer_bind	1..13 /note="H-AP4 primer"				
CDS	39..425 /codon_start=1 /product="ubiquitin/ribosomal protein CEP52 fusion protein" /protein_id="AAD03678.1" /db_xref="PID:g4139066" /db_xref="GI:4139066" /translation="MQIFVKTLTGKITLEVPSDTIENKAKIQDKEGIPDPQORLI FAGKQLEDGRTLSDYNIQKSTLHLVLRRLGGIIEPSLRQLAQKYNCDKMICRKYAR LHPRAVNCRRKKCGHTNLRPKKVK"				
polyA_signal	462..467 /evidence=not_experimental				
primer_bind	complement(481..496) /note="H-T11C primer"				
BASE COUNT	142 a	148 c	119 g	86 t	1 others
ORIGIN	1 aagctttctca acgagggcggc cgagcggcag acgctaaccat cgagatcttt gtgaagaccc 61 tgacgggcaa gaccatcact cttgaggtcg agcccaagta caccatcgag aatgtcaagg 121 ccaaatccca agataaagaa ggcattccac ctgaccaaca gagrctgata tttgccggca 181 agcagctgga ggtggccgc accctgtcag actacaacat ccagaaagag tccaccttgc 241 acctggtgct tcgaccttgc ggtggcctca tcgagccatc ccttctgtag cttgccocaga 301 agtacaactg tgacaagatg atctggccca agtgctacgc agcctgtcac cccctgtgcyg 361 tcaactgtcg caagaagaag tgtggccaca caaacaacct gcgccccaag aagaaggtca 421 aataaagctt tggccatacc aggcctatga ccctgggacc aataaagtc cccttccatc 481 gaaaaaaaaa aagctt				

6.1.9 ábra. A K4C1 szekvencia a GenBank adatbázisban

```

1 AAGCTTCTCAACGAGGGCGGCGAGGGCAGACGCTAACATGCAGATCTTT 50
1 .....GACGCAAAACATGCAGATCTTT 21
51 GTGAAGACCCGTGACGGGCAAGACCATCACTCTTGAGGTGAGCCCAAGTGA 100
22 GTGAAGACCCCTCACTGGCAAAACATCAACCCTTGAGGTGAGCCCAAGTGA 71
101 CACCATCGAGAATGTCAAGGCCAAGATCCAAGATAAGGAAGGCATTCCAC 150
72 CACCATTGAGAATGTCAAGGCCAAAATCAAGACAAGGAGGTATCCAC 121
151 CTGACCAACAGAGRCTGATATTTCGCCGCAAGCAGCTGGAGGATGGCCGC 200
122 CTGACCAACAGCGTCTGATATTTCGCCGCAACAGCTGGAGGATGGCCGC 171
201 ACCCTGTGCACTACAACATCCAGAAAGATCCACCTTGACCTGGTGT 250
172 ACTCTCTCAGACTACAACATCCAGAAAGATCCACCTGCACCTGGTGT 221
251 TCGCCTTCGTGGTGGCCTATCGAGCCATCCCTTCGTCAAGCTTGCCGAGA 300
222 GCGCCTGCGAGGTGGCATTATTGAGCCTTCTCTCCGCAAGCTTGCCGAGA 271
301 AGTACAACCTGTGACAAGATGATCTGCCGCAAGTGTACGACGCGCTGCAC 350
272 AATACAACCTGCGCAAGATGATCTGCCGCAAGTGTATGCTCGCCTTCCAC 321
351 CCCGTGCGGTCAACTGTGCGCAAGAAGAGTGTGGCCACACCAACAACCT 400
322 CCTCGTGTGCAACTGCGCAGAAAGAGTGTGGTACACCAACAACCT 371
401 GCGCCCAAGAAAGAGTCAAAATAAGCTTT.....GGCCAT 437
372 GCGTCCCAAGAAAGAGTCAAAATAAGTGTGTTCTTCTTCTTGAAGGGGAGC 421
438 ACCAGGCCCATGACCCCTGGGAC.....CAAATAAAGTCCCTTCCA 478
422 CTCTGCGCCAGGCCCGCTGGCCCTGGAGCCTCAATAAAGTGTCCCTTCCA 471
479 TCGAAAAAAAAAAGCTT..... 496
472 TTGACTGGAAAAAAAAAAAAA 495

```

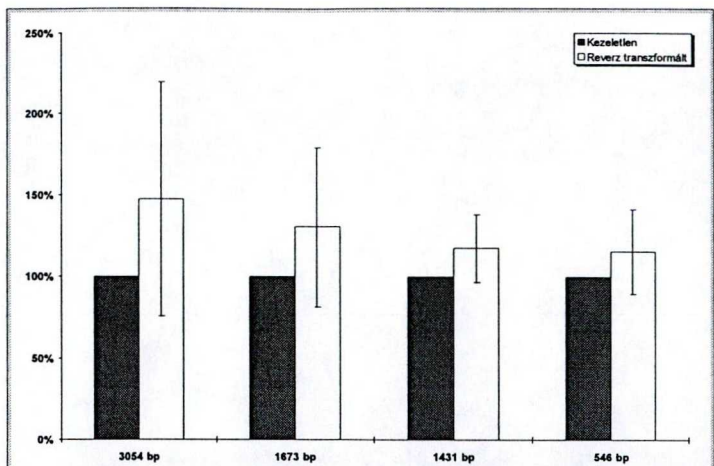
6.1.10 ábra. A K4C1 és a humán UBA52 szekvenciák összehasonlítása

homogén {753}, ezért arra gondoltunk, hogy a K4C1 fragment klónozásával megkaphatjuk a valóban expressziót váltó cDNS-t. Nem így történt, a klónozott fragmentum továbbra is négy mRNS-hez hibridizál. Szekvenciájának ismeretében (6.1.9 ábra) a magyarázat rögtön adódik. A K4C1 klón a humán riboszómális protein CEP52/ubiquitin fúziós fehérjét kódoló mRNS szekvenciával nukleinsav szinten 84.797 %-os (6.1.10 ábra), fehérje szinten 100 %-os azonosságot mutat, ami mérete alapján a legalsó kb. 0.5 kbp méretű mRNS-nek felel meg a Northern blott-ban.

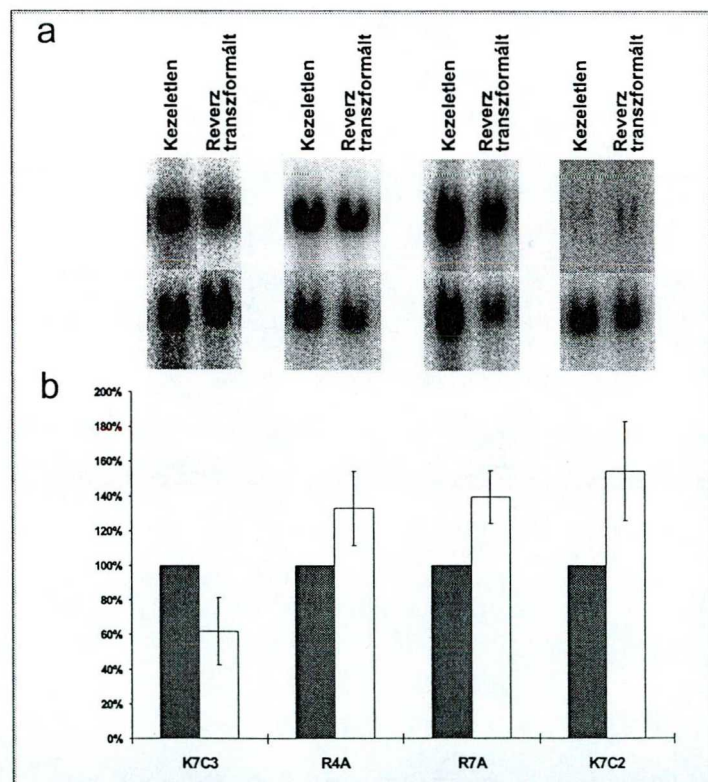
Az ubiquitin jelmolekula a fehérjelebontás útját jelöli ki a sejtben. A kész ubiquitin fehérjét egy multienzim komplex kapcsolja a gyors degradációra ítélt fehérje amino terminusához közeli, szterikusan elérhető lizin oldallánchoz. Vannak olyan fehérjék is, amelyeken az ubiquitin szignál eleve rajta van, kódoló mRNS-ük már hordozza azt. Ezek a fehérjéken az ubiquitin peptid jelenléte jelenthet ubiquitin forrást a sejtnek, illetve jelentheti a fehérje gyors degradációját is. Az ubiquitin *tag* kétféle képpen kerülhet az mRNS-be, transz *splicing* útján, illetve léteznek az ubiquitin *tag*-et már DNS szinten hordozó gének is.

Úgy gondoljuk, hogy a K4C1 cDNS fragmenttel kapott többféle méretű mRNS az ubiquitin *tag* jelenléte következtében fellépő kereszthibridizáció. Ez azonban további megerősítést igényel.

A Northern blott kísérletek kezdetén úgy tűnt, hogy az 1.4 kb-os mRNS mennyisége változik a reverz transzformáció során. A hibridizációkat többször megismételve a kvantitatív eredmények azonban statisztikailag ezt nem igazolták (6.1.11 ábra). Az 1.4 kb-os mRNS talán érdekes lehet, ha sikerül a nem ubiquitin részt is azonosítani.



6.1.11 ábra. A reverz transzformáció során a K4C1 fragmentummal kereszthibridizáló mRNS fajta expressziójának változása nem szignifikáns. A Student's *t* teszt eredményei balról jobbra rendre: 0.1478; 0.1629; 0.0972; 0.1696.



6.1.12 ábra. A részletesebben jellemzett négy cDNS fragmentum expressziójának változásai a reverz transzformáció során. a) Northern hibridizációs kép, az alsó sorban a GAPDh szignál látható. b) kvantitatív eredmények.

6.1.2.1. A TRANSZFORMÁCIÓS FOLYAMATBAN RÉSZT VEVŐ, DE NEM ONKOGENIKUS GÉNEK

Két reverz PCR-rel kapott cDNS fragmentum, klónozás és szekvenálás után már ismert gén termékének bizonyult. Expressziójuk megváltozása valószínűleg nem oka, hanem következménye a reverz transzformációnak.

A 346 bp hosszúságú K7C3 fragmentum egy kb. 0.5 kbp hosszúságú mRNS-t detektál. Szekvenciája (6.1.13 ábra) a patkány 40S riboszómális alegység S18 jelű fehérjéjével mutat nukleinsav szinten 90.26 %-os, fehérje szinten 97.917 %-os azonosságot (6.1.14 ábra), így annak kínaihőrcsög homológjának tekinthető, amelyet eddig még nem klónoztak. A detektált mRNS mennyisége a reverz transzformáció során a kezeletlen sejtekhez képest 62.08 ± 19.5 %-ra ($p=0.0040$) csökken (6.1.12 ábra).

LOCUS	AF081143	346 bp	mRNA	ROD	11-JAN-1999
DEFINITION	Cricetulus sp. ribosomal protein S18 mRNA, partial cds.				
ACCESSION	AF081143				
NID	g4139067				
VERSION	AF081143.1 GI:4139067				
KEYWORDS					
SOURCE	Cricetulus sp.				
ORGANISM	Cricetulus sp. Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Cricetinae; Cricetulus.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 346)				
AUTHORS	Bachrati,C.Z., Downes,S. and Rasko,I.				
TITLE	Chemical reverse transformation of CHO-K1 cells induces changes in expression of a candidate tumor suppressor and of a gene not previously characterised as transformation-related				
JOURNAL	Unpublished				
REFERENCE	2 (bases 1 to 346)				
AUTHORS	Bachrati,C.Z., Downes,S. and Rasko,I.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (31-JUL-1998) Institute of Genetics, Biological Research Centre of Hungarian Academy of Sciences, Temesvari Krt. 62., Szeged H-6726, Hungary				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..346 /organism="Cricetulus sp." /db_xref="taxon:10031" /cell_line="CHO-K1" /note="differential display analysis"				
primer_bind	1..13 /note="H-AP7 primer"				
CDS	<1..288 /codon_start=1 /product="ribosomal protein S18" /protein_id="AAD03679.1" /db_xref="PID:g4139068" /db_xref="GI:4139068" /translation="KLNEDEVERVITIMQNPQYKIPDWFLNRQKDVKDGKYSQVLNGLDNKLRDLERLKKIRAHRLRHFWGLRVGQHTKTTGRRGRVTGVSKK"				
3'UTR	289..346				
polyA_signal	309..314 /evidence=not_experimental				
primer_bind	complement(331..346) /note="H-T11C primer"				
BASE COUNT	101 a	82 c	101 g	61 t	1 others
ORIGIN	1 aagcttaacg aggcagaggt ggagcgcgtc atccatcatc tcgagaacc acgacgtac 61 aagatcccag actggttctt gaacagacag aaggacgtga aggcaggaaa gtacagccag 121 gttctggcca atggtctgga caacaagctg cgagagagacc tggagcgact gaagaagatc 181 agagcccaca ggggctcgc ccacttttgg ggtcttcgtg tccgaggtca gcaaccaag 241 accactggcc gccggggcgc cactgtgggt gtatccaaga agaaatgagy cgctggggcct 301 tcactgttaa taaatagttt atatgcctgt gaaaaaaaaa aagctt				

6.1.13 ábra. A K7C3 szekvenciája A GenBank adatbázisban

Gap Weight: 5.000	Average Match: 1.000	Gap Weight: 3.000	Average Match: 0.540
Length Weight: 0.300	Average Mismatch: 0.000	Length Weight: 0.100	Average Mismatch: -0.396
Quality: 279.0	Length: 554	Quality: 140.0	Length: 153
Ratio: 0.806	Gaps: 0	Ratio: 1.458	Gaps: 0
Percent Similarity: 90.584	Percent Identity: 90.260	Percent Similarity: 97.917	Percent Identity: 97.917
k7c3.seq x x57529.gb_ro	May 3, 1999 17:45 ..	k7c3.pep x x57529.pep	May 3, 1999 19:03 ..
1AAGCTTAACGAGGACGAGGTTGGAGCGCGTCAACCATCATG 42		1KLNEDEVERVITIMQNPQYKIPDWFLNRQKDVKDGKYSQVLA 43	
201 GGGCTGGGGAGCTCACGGAGGACGAGGTTGGAGCGTGTGATCACCATCATG 250		51 DLTKRAGELTEDEVERVITIMQNPQYKIPDWFLNRQKDVKDGKYSQVLA 100	
43 CAGAACCCACGACAGTACAAGATCCCAGACTGGTTCTTGAACAGACAGAA 92		44 NGLDNKLRDLERLKKIRAHRLRHFWGLRVGQHTKTTGRRGRVTGVSK 93	
251 CAGAACCCACGACAATAACAAGATCCCTGACTGGTTCTTGAACAGACAGAA 300		101 NGLDNKLRDLERLKKIRAHRLRHFWGLRVGQHTKTTGRRGRVTGVSK 150	
93 GGACGTGAAGGACGGAAAGTACAGCCAGGTTCTGGCCAATGGTCTGGACA 142		94 KK 96	
301 GGACGTGAAGGATGGGAAGTATAGCCAGGTTCTGGCCAACGGTCTAGACA 350		11	
143 ACAAGCTGCGAGAGGACCTGGAGCGACTGAAGAAGATCAGAGCCACAGG 192		151 KK 153	
351 ACAAGCTGCGTGAAGGACCTGGAGCGGCTGAAGAAAATCCGAGCCATAGA 400			
193 GGGCTGCGCCACTTTTGGGGTCTTCGTGTCGAGGTCAGCACACCAAGAC 242			
401 GGACTGCGCCACTTTTGGGGCTTCGTGTCGAGGTCAGCACACCAAGAC 450			
243 CACTGGCCGCGGGGCGGACTGTGGGTGTATCCAAGAAGAAATGAGYCG 292			
451 CACTGGCCGCGAGGCGGCTACTGTGGGTGTATCCAAGAAGAAATGAGTCT 500			
293 CTGGGCCTTCACTGTTAATAAATAGTTTATATGCCTGTGAAAAAATAAAA 342			
501 TTGGGCCTTTCGTGTT..... 516			

6.1.14 ábra. A K7C3 és patkány riboszómális protein S18 nukleotid és fehérje szekvenciáinak összehasonlítása

Az R4A jelű klón 159 bp hosszúságú, és egy 1.7 kbp hosszúságú mRNS-hez hibridizál. Szekvenciája (6.1.15 ábra) egy patkány mitokondriális fehérje, a NADH-ubiquinon oxidoreduktáz 4-es lánc C terminális régiójához 78.723 %-os hasonlóságot mutat, nukleinsav szinten az azonosság 64.78 %-os (6.1.16 ábra). Expressziója nem túl nagy mértékben de szignifikánsan ($p=0.0013$), a kezeletlen sejtek szintjéhez képest 132.84 ± 21.41 %-ra emelkedik (6.1.12 ábra).

LOCUS	AF081138	159 bp	mRNA	ROD	11-JAN-1999
DEFINITION	Cricetulus sp. NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4 mRNA, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, partial cds.				
ACCESSION	AF081138				
NID	g4139058				
VERSION	AF081138.1	GI:4139058			
KEYWORDS					
SOURCE	Cricetulus sp.				
ORGANISM	Mitochondrion Cricetulus sp. Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Cricetinae; Cricetulus.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 159)				
AUTHORS	Bachrati,C.Z., Downes,S. and Rasko,I.				
TITLE	Chemical reverse transformation of CHO-K1 cells induces changes in expression of a candidate tumor suppressor and of a gene not previously characterised as transformation-related				
JOURNAL	Unpublished				
REFERENCE	2 (bases 1 to 159)				
AUTHORS	Bachrati,C.Z., Downes,S. and Rasko,I.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (31-JUL-1998) Institute of Genetics, Biological Research Centre of Hungarian Academy of Sciences, Temesvári Krt. 62., Szeged H-6726, Hungary				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..159 /organism="Cricetulus sp." /mitochondrion /db_xref="taxon:10031" /cell_line="CHO-K1" /note="differential display analysis"				
CDS	<1..146 /codon_start=3 /transl_table=2 /product="NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4" /protein_id="AAD03675.1" /db_xref="PID:g4139059" /db_xref="GI:4139059" /translation="ASQRGKLTPHMINLQPSHTRELTLMMLHITPLSLLMINPKFIMGNTL" /note="H-AP4 primer" complement(144..159) /note="H-T11A primer"				
primer_bind	1..13				
primer_bind	144..159				
BASE COUNT	68 a	37 c	11 g	43 t	
ORIGIN	1 aagcttctca acgaggttaag ttaaccaccac atataattaa tctacaacca tcacacacac 61 gagaacttac ctaataataa ctccacatta caccacttcc actttaaagc attaacccaa 121 aatttatcat agccaataca ttataaaaaa aaaagctt				

6.1.15 ábra. Az R4A szekvenciája a GenBank adatbázisban

Gap Weight: 5.000	Average Match: 1.000	Gap Weight: 3.000	Average Match: 0.540
Length Weight: 0.300	Average Mismatch: 0.000	Length Weight: 0.100	Average Mismatch: -0.396
Quality: 103.0	Length: 16295	Quality: 55.3	Length: 460
Ratio: 0.648	Gaps: 0	Ratio: 1.152	Gaps: 0
Percent Similarity: 64.780	Percent Identity: 64.780	Percent Similarity: 78.723	Percent Identity: 74.468
r4a.seq x v00711.gb_ro	May 3, 1999 17:47 ..	r4a.pep x nu4m_rat.swiss	May 3, 1999 19:15 ..
1AAGCTT 6		1ASQRGKLTPHMINLQPSHTRELTLMMLHITPLSLLMIN 38	
11351 AATTAACATTATTATTACAGGTATATACTCAATATACATAATTATTACCA 11400		401 VITGMYSYMIITTRGKLTSHMNNLQPSHTRELTLMALHIPLMLLTIN 450	
7 CTCAACGAGGTAAGTTAACACCACATATAATTAATCTACAACCATCACAC 56		39 PKFIMGNTL 48	
11401 CCCAACGGGCAAACTAACCAACCATATAATTAACCTCCAACCCCTCACAC 11450		451 PKLITGLTM 459	
57 ACACGAGAACCTACCTTAATAACTCCAGATTACACCACTTTCACITTT 106			
11451 ACACGAGAACCTAACCTAATAGCCCTTCACATAATTCACCTATTCTTCT 11500			
107 AATGATTAACCCAAATTTATCATAGGCAATACATATAAAAAAAAAAAG 156			
11501 AACTACCAGTCCAAACTAATTAACAGGCGTGACAATATGTGAATATAGTT 11550			
157 CTT..... 159			
11551 TACAAAAACATTAGACTGTGAATCTGACAACAGGAAATAAACCTCCTTA 11600			

6.1.16 ábra. Az R4A és a patkány NADH ubiquinon oxidoreduktáz 4-es lánc szekvenciáinak összehasonlítása

Az A8C fragmentummal kapott eredményeink még nem teljeseek. A fragmentum 520 bp, az általa detektált mRNS 0.7 kb hosszú. Szekvenciája (6.1.17 ábra) alapján a kemokin fehérjék családjába tartozó monocita kemoattraktáns protein 1 (MCP-1) kínaihörcsög megfelelőjét kódolja (6.1.18 ábra). Az egér és kínai hörcsög szekvenciák nukleinsav szinten 80.039 %-os azonosságot, fehérjeszinten 78.095 %-os hasonlóságot mutatnak. Ugyanakkor a patkány és az egér MCP-1 közti homológia nagyobb fokú: 88.514 %.

A reamplifikált fragmentummal történt hibridizáció a megfelelő mRNS mennyiségének csökkenését mutatja, a klónozott fragmentummal viszont nem sikerült a hibridizáció. A reamplifikált fragmentum azonban valószínűleg nem kevert, erre utal, hogy a klónozás során az összes tesztelt transzformáns bakté-

rium ugyanazt a plazmidot hor- dozta. Ezen kívül a reamplifikált fragmentum az MCP-1 méretével egyező nagyságú mRNS fajtát detektál. Úgy véljük, hogy a klónozott A8C-vel való hibridizá- lás sikertelenségét -1 kísérlet - metodikai hiba okozta, és a megismételt hibridizációk sikere- sek lesznek.

LOCUS	AF081141	520 bp	mRNA	ROD	11-JAN-1999
DEFINITION	Cricetulus sp. monocyte chemoattractant protein 1 mRNA, partial cds.				
ACCESSION	AF081141				
NID	g4139063				
VERSION	AF081141.1	GI:4139063			
KEYWORDS					
SOURCE	Cricetulus sp.				
ORGANISM	Cricetulus sp. Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Cricetinae; Cricetulus.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 520)				
AUTHORS	Bachrati,C.Z., Downes,S. and Rasko,I.				
TITLE	Chemical reverse transformation of CHO-K1 cells induces changes in expression of a candidate tumor suppressor and of a gene not previously characterised as transformation-related				
JOURNAL	Unpublished				
REFERENCE	2 (bases 1 to 520)				
AUTHORS	Bachrati,C.Z., Downes,S. and Rasko,I.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (31-JUL-1998) Institute of Genetics, Biological Research Centre of Hungarian Academy of Sciences, Temesvari Krt. 62., Szeged H-6726, Hungary				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..520 /organism="Cricetulus sp." /db_xref="taxon:10031" /cell_line="CHO-K1" /note="differential display analysis"				
CDS	<1..323 /codon_start=3 /product="monocyte chemoattractant protein 1" /protein_id="AAD03677.1" /db_xref="PID:g4139064" /db_xref="GI:4139064" /translation="AFTAKRIPEKRLESYKRITSSKCPKEAVIFITKLRKREICADPKQ DWVQTYTKKLDQSQAKSEAAATVYKTAFLNANI.THESAVNASTTAFPTTDLRKSVRVTS MTVN"				
primer_bind	1..13 /note="H-AP8 primer"				
primer_bind	complement(505..520) /note="H-T11c primer"				
BASE COUNT	164 a	114 c	105 g	136 t	1 others
ORIGIN	1 aagcttttac cgccaagagg atcccagaga agaggctgga gagctacaag agaatcacca 61 gcagcaagtg tcccaagaa gctgtgatt tcatcaccaa gctcaagaga gagactctgtg 121 ctgaccctaa gcagactgg gtccagacat acacaaaaaa actggaccag agccaagcta 181 aatcagaagc tgcaactgtg tataaacag cacctttaa tgtaacttg accatagat 241 ctgcagtaa tgatccact actgccttcc caccacaga cttgagaagt tctgtaagag 301 tgaccagtat gacagtgaac tagtgtgacc tggagtgtga tgccttaagt aatattaact 361 ttatttaact tattaatgtt tcaatatccc cctccctgta tacttggatt tcttagatgc 421 atgactggtt ttcattgttt tccctctgtg aacctggtt ctcacccta aatgttatga 481 gagatgactt ttgtaagat gagtgaaaaa aaaaaagctt				

6.1.17 ábra. Az A8C szekvencia a GenBank adatbázisban

Gap Weight: 5.000	Average Match: 1.000	336 TGTGATGCCTTAAGTAATTAACCTTATTTAACTTATTAATGTTTCAAT	385
Length Weight: 0.300	Average Mismatch: 0.000		
Quality: 391.5	Length: 815	548 TGTGATGCCTTAATTAATTAACCTTATTTAACTTATTTAGTGTATGTTG	597
Ratio: 0.753	Gaps: 3		
Percent Similarity: 80.233	Percent Identity: 80.039	386 ATCCCCCTCCCTGTACTTGGATTTCTTAGATGCATGACGTGGTTTCAT	435
a8c.seq x j04467.em_ro	May 3, 1999 19:35 ..		
1AAGCTT	598 ATCCCTTTCATGAATACTAAAATTTCTTAAATGCAAGGTGGATCCAT	647
151 GTTGCTCAGCCAGATGAGTTAACGCCCACTCACCTGTCTACTCAT	200	436 TGTTTTCCCTCTGTGAACCTGGTTCTCCACCTAAATGTTATGAGAGAT	485
7 TTACCGCAAAGAGGATCCCAGAGAAGAGGCTGGAGAGTACAAGAGAATC	56		
201 TCACCAGCAAGATGATCCCAATGAGTAGGCTGGAGAGTACAAGAGGATC	250	648 TTTTCCCTCTGTGAATCCAGATTCACACTTCAATG.TATGAGAGAT	696
57 ACCAGCAGCAAGTGTCCCAAGAAGCTGTGATTTTCATCACCAAGCTCAA	106	486 GACTTTTGTAAAGATGAGTGAAAAAAGCTT.....	520
251 ACCAGCAGCAGGTGTCCCAAGAAGCTGTAGTTTTTGTCCACCAAGCTCAA	300	697 GAATTTTGTAAAGATGAATGGGTAACCTTTGTGTTTGTAGATTCCAAGGTA	746
107 GAGAGAGATCTGTGCTGACCCCAAGCAGGACTGGTCCAGACATACACAA	156	Gap Weight: 3.000	Average Match: 0.540
301 GAGAGAGTCTGTGCTGACCCCAAGAAGGATGGTCCAGACATACATTA	350	Length Weight: 0.100	Average Mismatch: -0.396
157 AAAAAGTGGACAGAGCAAGCTAAATCAGAAGCTGCAACTGTGTATAAA	206	Quality: 113.9	Length: 150
351 AAAAAGTGGATCGGAACCAATGAGATCAGAACCTACAACCTTATTTAAA	400	Ratio: 1.064	Gaps: 2
207 A.....CAGCACCTTTGAATGCTAACTTGACCCA	235	Percent Similarity: 78.095	Percent Identity: 67.619
401 ACTGCATCTGCCCTAAGTCTTCAGCACCTTTGAATGTGAAGTTGACCCG	450	a8c.pep x mcp1_mouse.sw	May 3, 1999 19:30 ..
236 TGAGTCTGCAGTTAATGCATCCACTACTGCCTTTCCACCACAGACTTGA	285	1AFTAKRIPEKRLES
451 TAAATCTGAAGCTAATGCATCCACTA...CCTTTCCCAACCACTCAA	497	1 MQVPVMLLGLLFTVAGWSIHVLAQPDAVNAPLTCYSFTSKMIFMSRLES	50
286 GAAATTTCTGTAGAGTGACCAAGTATGACAGTGAAGTGTGACTGGAA	335	15 YKRITSSKCPKEAVIFITKLRKREICADPKQDWVQTYTKKLDQSQAKSEAA	64
498 GCACCTCTGTAGGAGTGACCAAGTGTGACAGTGAAGTGTGACTGGAC	547		
		51 YKRITSSRCPKEAVVFVTKLRKREICADPKKEWVQTYIKNLDNRNMRSEPT	100
		65 TVYKT.....APLNANLTHESAVNASTTAFPTTDLRKSVRVTSMTVN*	107
		101 TLFKTASALRSSAPLNVLTRKSEANASTT.FSTTSSSTSVGVTSVTVN.	148

6.1.18 ábra. Az A8C és az általa kódolt fehérje valamint az egér MCP-1 szekvenciák összehasonlítása

6.1.2.2. A TRANSZFORMÁCIÓS FOLYAMATBAN RÉSZT VEVŐ, FELTEHETŐEN ONKOGENIKUS GÉNEK

Két másik cDNS fragmentum szekvenciája szintén már ismert, de részleteiben még nem karakterizált génekhez mutatott homológiát.

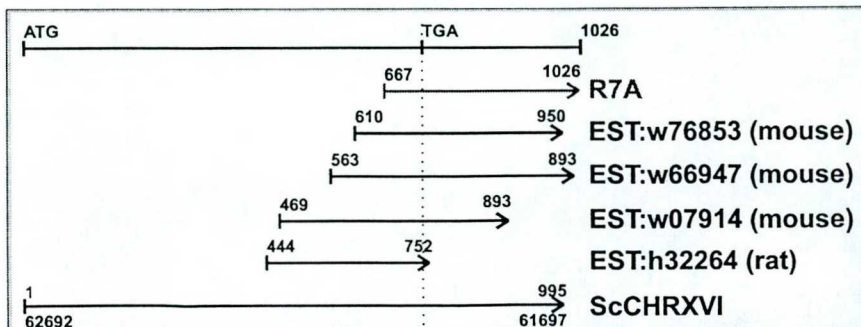
Az R7A klón 360 bp, az általa detektált mRNS 1.1 kbp hosszúságú, mennyisége a reverz transzformáció során szignifikánsan, a kezeletlen sejtek szintjének 139.25 ± 15.14 %-ára emelkedik ($p=0.0012$). Szekvenciája (6.1.19 ábra) számos EST-n kívül kezdetben semmivel nem mutatott homológiát. Az EST szekvenciákból azonban a *genomic walking* mintájára *database walking*-nak (6.1.20 ábra) elnevezhető módszerrel sikerült egy hosszú hibrid cDNS szekvenciát előállítani, melynek transzlációjával kapott elméleti peptid szekvenciája homológiát mutatott egy 26 kDa feltételezett fehérjével. Ennek kódoló szekven-

LOCUS	AF081140	360 bp	mRNA	ROD	11-JAN-1999
DEFINITION	Cricetulus sp. unknown mRNA.				
ACCESSION	AF081140				
NID	g4139061				
VERSION	AF081140.1 GI:4139061				
KEYWORDS	.				
SOURCE	Cricetulus sp.				
ORGANISM	Cricetulus sp. Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Cricetinae; Cricetulus. 1 (bases 1 to 360)				
REFERENCE	Bachrati,C.Z., Downes,S. and Rasko,I. Chemical reverse transformation of CHO-K1 cells induces changes in expression of a candidate tumor suppressor and of a gene not previously characterised as transformation-related				
AUTHORS	Unpublished				
TITLE	2 (bases 1 to 360)				
JOURNAL	Bachrati,C.Z., Downes,S. and Rasko,I. Direct Submission				
REFERENCE	Submitted (31-JUL-1998) Institute of Genetics, Biological Research Centre of Hungarian Academy of Sciences, Temesvari Krt. 62., Szeged H-6726, Hungary				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..360 /organism="Cricetulus sp." /db_xref="taxon:10031" /cell_line="CHO-K1" /note="differential display analysis"				
primer_bind	1..13 /note="H-AP7 primer"				
CDS	<1..72 /note="similar to Homo sapiens beta4 integrin interactor p27BBP" /codon_start=1 /product="unknown" /protein_id="AAD03676.1" /db_xref="PID:g4139062" /db_xref="GI:4139062" /translation="KLNEAKPSTIATSMRDSLIDSLT"				
3'UTR	73..360				
polyA_signal	323..328 /evidence=not_experimental				
primer_bind	complement(345..360) /note="H-T11A primer"				
BASE COUNT	80 a	101 c	85 g	94 t	
ORIGIN	1 aagcttaacg aggccaaagc tagcactatt gccaccagca tgcggggattc cctcattgac 61 agcctcacat gagtcaacct ccatgctgct gtgtgggctc ctggctctgg actttggctc 121 atttaccatg cctgagctag tatgtaccac acgtggcag cagggcgtgg cagagagctt 181 accagagctg aatggttgag cgcgcccacc ccttcttcat ccgtgccatc tctagactat 241 tgttataaaa aggccttgccg tgtcatgctg gctttgagtt gtggctcctg gatgagagtt 301 ctgctgtctt gtgtcccacc ccattaaagt actgcctccc cccataaaaa aaaaaagctt				

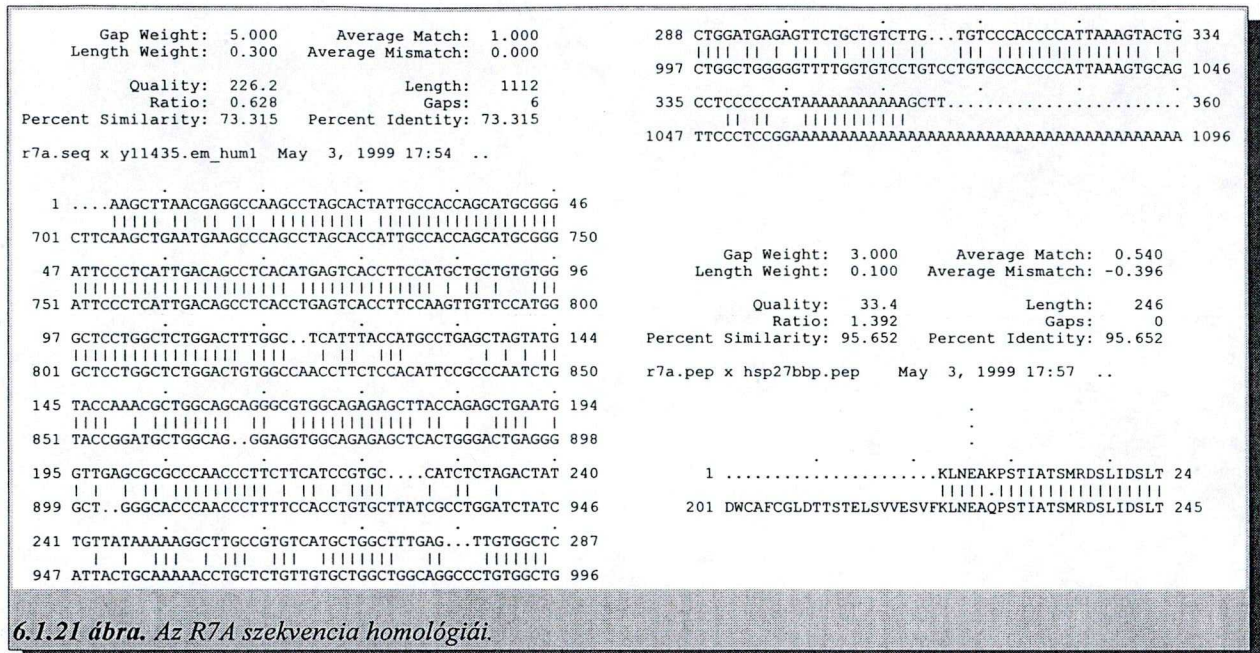
6.1.19 ábra. Az R7A szekvenciája a Genbank adatbázisban

ciáját az élesztő genom project közölte a *Saccharomyces cerevisiae* XVI. kromoszómáján. Az EST adatbázisból kiszedegetett szekvenciák tanúsága szerint eléggé széleskörűen expresszálódik. Megtalálták humán magzati máj, lép és tüdő; humán előbőr melanocytá; emlő; placenta; tüdő; multiplex sclerosis lesio; hasnyálmirigy Langerhans szigetek valamint teljes egér embrionális cDNS könyvtárakban.

A teljes humán cDNS szekvenciát nemrégén közzétették {734, 735}. Az R7A szekvenciával nukleotid szinten 73.315 %-os, fehérje szinten 95.652 %-os azonosságot mutat (6.1.21 ábra). Terméke egy 27 kDa fehérje, amely legalább két, egymástól meglehetősen távol álló funkciót tölt be. A p27^{BBP/eIF6} fehérje homológjai rendkívül széles körben elterjedtek és igen erősen konzerváltak. A fehérje eukarióta sejtekben a nukleoluszban lokalizálódik, és a 60S riboszómális alegység biogenezisében lehet életfontosságú szerepe. Evolúciósan konser-
vált funkciója mellett epiteliális eredetű sejtvonalakban talán az intermediate filament citoskeleton hemidezmoszómákhoz történő kapcsolásában vesz részt {1487}.



6.1.20 ábra. Database walking az R7A szekvenciával



6.1.21 ábra. Az R7A szekvencia homológiái.

A K7C2 cDNS fragmentum 353 bp. az általa detektált mRNS 3.2 kbp hosszúságú. Az mRNS rendkívül alacsony szinten expresszálódik, amely azonban a kezeletlen szint 154.63 ± 28.69 %-ára emelkedik a reverz transzformáció során ($p=0.048$) (6.1.12 ábra). Szekvenciájára (6.1.22 ábra) nagyon sokáig nem sikerült homológiát találnunk, mígnem a humán genom projectből származó 7. kromoszómás 142396 bp hosszú HTG (*high throughput genomic*) szekvenciában jó egyezést mutatott (6.1.23). Tudván, hogy a K7C2 egy mRNS fajta 3' vége, a homológiától 5' irányban kiválasztottunk egy 40 kbp nagyságú szakaszt, és ezzel megszűrtük az EST szekvencia adatbázist. A HTG szekvencia fejlécében jelzett potenciális exonok, valamint két EST (m62210, w03496) segítségével sikerült összeállítanunk egy 914 bp hosszúságú 5' végi elméleti mRNS szekvenciát, ami potenciálisan egy 384 aminosav hosszúságú fehérjét kódolt. Ez azonban nem ért el a K7C2 homológiáig. Nem sokkal ezután jelent meg Serebriiskii és mtsai közleménye a humán Krit1 fehérjét kódoló cDNS klónozásáról {699}. Az ott közölt cDNS szekvencia és az általunk összeállított feltételezett szekvencia teljes egészében megegyezett.

Az említett munkacsoport a Ras családba tartozó GTPáz Krev1/Rap1a fehérjével kölcsönhatásba lépő fehérjéket keresve klónozte a *krit1* cDNS-t. A Krev1/Rap1a fehérjéről korábban kimutatták, hogy a *ras* transzformáló mutációival antagonizál.

Bár a K7C2 és a közölt humán *krit1* szekvenciák közvetlenül nem

LOCUS	AF081139	353 bp	mRNA	ROD	11-JAN-1999
DEFINITION	Cricetulus sp. unknown mRNA, 3' UTR, partial sequence.				
ACCESSION	AF081139				
NID	g4139060				
VERSION	AF081139.1 GI:4139060				
KEYWORDS					
SOURCE	Cricetulus sp.				
ORGANISM	Cricetulus sp. Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Cricetinae; Cricetulus.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 353)				
AUTHORS	Bachrati,C.Z., Downes,S. and Rasko,I.				
TITLE	Chemical reverse transformation of CHO-K1 cells induces changes in expression of a candidate tumor suppressor and of a gene not previously characterised as transformation-related				
JOURNAL	Unpublished				
REFERENCE	2 (bases 1 to 353)				
AUTHORS	Bachrati,C.Z., Downes,S. and Rasko,I.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (31-JUL-1998) Institute of Genetics, Biological Research Centre of Hungarian Academy of Sciences, Temesvari Krt. 62., Szeged H-6726, Hungary				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..353 /organism="Cricetulus sp." /db_xref="taxon:10031" /cell_line="CHO-K1" /note="differential display analysis"				
3'UTR	<1..353				
primer_bind	1..13 /note="H-AP7 primer"				
primer_bind	complement(338..353) /note="H-T11c primer"				
BASE COUNT	134 a	36 c	56 g	127 t	
ORIGIN	1 aagcttaacg aggtgtatag tctctttag tatatatgta tatgctgtta catacaactgt 61 acagaatctg tactctctgt ttggtgtgtaa tataccactt agcttctgtat gataggtcat 121 aaactcttaa tttttgagag aaccacataa aaataaacag tctgtattat attagacaaa 181 atagtaagct ttataaaaag ttatttttgg taaatagtaa agaattatgg tggaaatgta 241 tgaataataa atatagcttt gatataattt tatgtgttac tcaacatat actgaaaaatc 301 aacatgattt gaataaataa aatgtatttt gtactttgaa aaaaaaaaag ctt				

6.1.22 ábra. A K7C2 szekvencia a GenBank adatbázisban



fednek át (6.1.24 ábra), mégis úgy gondoljuk, hogy a K7C2 a *krit1* kínaihörccsög homológia amely eltérő poliA addíciós szignál, és talán alternatív splicing eredményeképp a prototípustól különbözik. Elképzelésünket több tény is alátámasztja: 1) A *krit1* különböző hosszúságú (3-4.5 kb) mRNS-eit detektálták különböző szövetekben {699}. 2) A *krit1* 3' vége és a K7C2 homológia 5' vége egymástól 22 bp távolságra van a humán HTG szekvencián. 3) A K7C2-vel tökéletesen átfedő EST szekvencia (aa598899), amely a *krit1* 3' végétől 172 bp távolságban kezdődik, és a K7C2 homológián 11 bp-al túlnyúlik. 4) Alternatív splicingra utal a *krit1* 7. és 8. exonja közé ékelődő két EST exon is (aa023763). (6.1.24 ábra) 5) A K7C2 mRNS-hez hasonlóan a *krit1* is alacsony szinten expresszálódik a sejtekben.

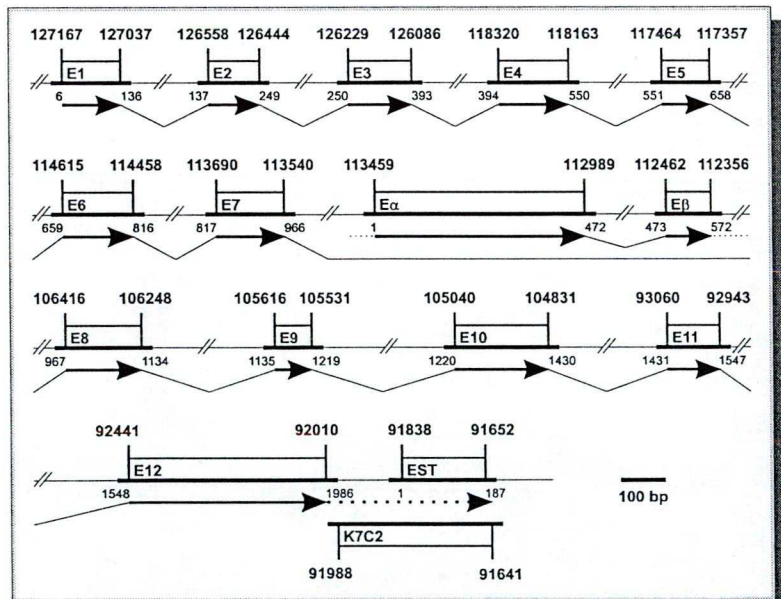
Gap Weight: 5.000	Average Match: 1.000
Length Weight: 0.300	Average Mismatch: 0.000
Quality: 258.9	Length: 2008
Ratio: 0.733	Gaps: 5
Percent Similarity: 83.526	Percent Identity: 83.526

k7c2.seq x hsac000120.seq May 3, 1999 18:06 ..

```

1 .....AAGCTTAACGAGGTGTATAGTCTCTTGTAGTATATATGTATA 42
92000 AAAAAATTACTTTCAACAAGGCATATAGTCTCTTGTAAATATATGTATA 91951
43 TGCTGTTACATACACTGTACAGAATCTGTACTCTGTTGGTGTGAATA 92
91950 CTAT.....TACATTGTACAGAATCTGTACTTATGTTGGTGTGAATA 91907
93 TACCACTTAGCTTTGTATGATAGGCATAAA...CTTCTAATTTTTGAGA 139
91906 TACCAATTAGTTTTATATAATATCCCTCATAAGCTATTCTAATTTTTGAGA 91857
140 GAACCACA.....TAAAAATAAACAGCTGTATTATATAGACAAAATA 183
91856 GAAACACAAAAGTTATAGATTGATAGTCTGTATAATATAGACAAAATA 91807
184 GTAAGCTTTATAAAAAGTTATTTTGGTAAATAGTAAAGAA..TTAGTGTG 232
91806 GTAAGCTTTATAAAAAGTTATTTTGGTAAATGTAAGGAATTTGGGGTG 91757
233 GAATGTGATGAAATTAATAATAGCTTTGATATAATTTTATGTGTACTT 282
91756 GAATGTGATGAGATTAATATAGCTTTGGTATAAATTCATGTG.TATTT 91708
283 CAACATATACTGAAAATCAACATGATTGGAATAAATAAATGATTTTGT 332
91707 CAAAATATACTGAACGTCACATGATTGGAATAAAGAAAATGATTTTCT 91658
333 ACTTGGAAAAAAAAGCTT..... 353
91657 ACTTGAACCACATAACACTGTTATTTAAAACAGTTTTCTGCAGCTATAA 91608
    
```

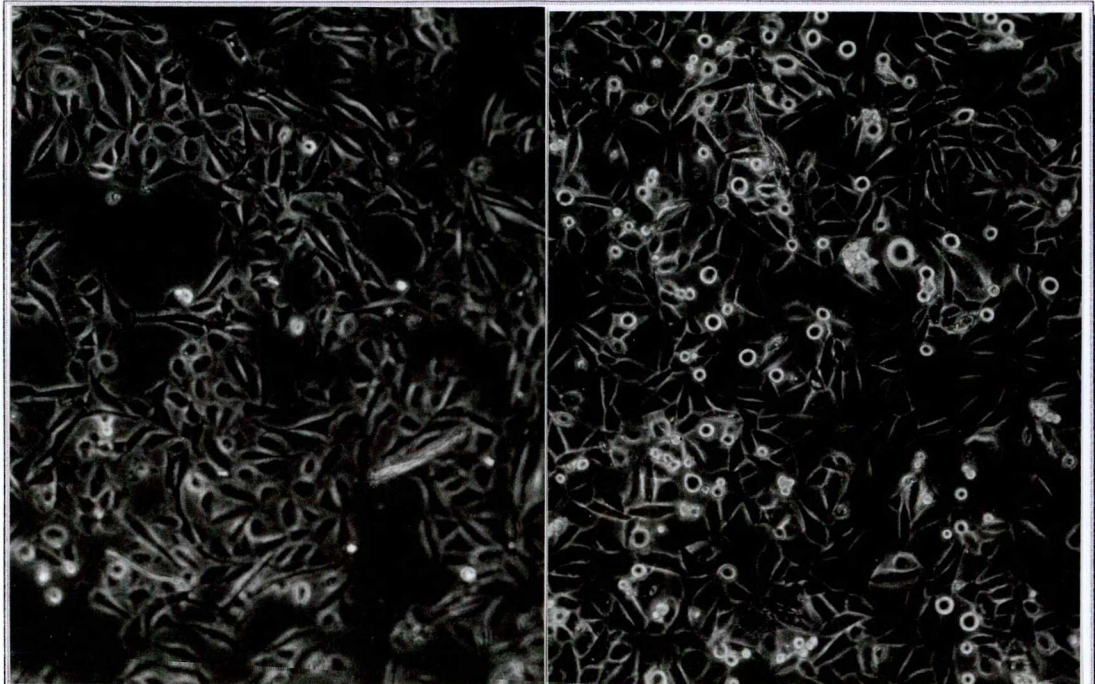
6.1.23 ábra. A K7C2 és a humán HTG szekvencia megfelelő szakaszának összehasonlítása.



6.1.24 ábra. A K7C2 fragmentum és a nagyobb EST szekvenciák viszonya a *krit1* génhez. A normál szedésű számok a *krit1* cDNS szekvencia (u90268) a kövérrel szedett számok az aa000120 HTG szekvencia koordinátái. E1-E12: a *krit1* exonjai, Eα-Eβ feltételezett alternatív exonok.

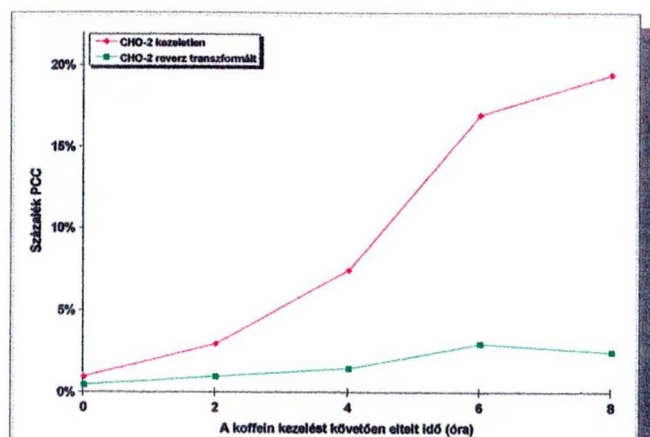
6.1.3. A reverz transzformáció hatása a sejtciklus ellenőrző pontokra.

Mint azt a bevezető fejezetekben összefoglaltam, a kémiai reverz transzformáció a sejt fiziológiájának, morfológiájának és biokémiájának rendkívül széles spektrumán fejt ki a transzformált fenotípus reverzióját. Az S fázisos ellenőrzőpont hibája a transzformált rágsálósejtek sajátossága, a normál és transzformált humán sejtekre nem jellemző. Kíváncsiak voltunk, hogy mi történik az S fázisos ellenőrző pont működésével a reverz transzformáció során.



6.1.25 ábra. A hibás S fázisos ellenőrzőpontú sejtek hidroxürea blokkot követő koffein kezelés hatására 4 óra múlva felkerekednek mitózishoz (jobbra), míg a normál sejtek nem (balra). Fluoreszcens mikroszkópos felvételek, 100 X objektív.

Izoleucin éheztetéssel késői G₁ fázisra előszinkronizált sejteket blokkoltunk S fázisban hidroxürea, vagy afidikolin kezeléssel legalább 18 óra hosszáig. Ez a kezelés a malignusan transzformált rágsálósejtek sejtciklusát a G₂-nek megfelelő állapotra állítja be, holott a DNS szintézis blokkolása miatt a replikáció nem játszódhatott le. A maradék sejtciklus kontrollt ezt követően koffein kezeléssel könnyen tönkretethető, a sejtek felkerekednek mitózishoz (6.1.25 ábra) és korai kromoszómakondenzációba (PCC) kezdenek (6.2.21 és 6.2.22 ábrák), végzetes következményekkel {367}. A PCC-t mutató sejtek száma kvantitatív válasz, arányos az S fázisos ellenőrzőpont működésének szigorúságával. Az S fázisos ellenőrzőpont ezen hibája csak transzformált rágsálósejtekben (BHK-21, CHO, 10a2b) jelenik meg, a normál rágsálósejtekben (pl. primer fibroblasztok, 3T3), illetve az összes vizsgált humán sejtben (293, AT5BIVA, HeLa) működik {681}.



6.1.26 ábra. A kémiai reverz transzformáció visszaállítja az S fázisos ellenőrzőpont integritását.

Két napig reverz transzformáló médiumban tartott CHO-K1 kultúrában a PCC-t mutató sejtek aránya az ép S fázisos ellenőrzőpontú sejtekétől (HeLa, MF) alig megkülönböztethető (6.1.26 ábra), ami egyértelmű bizonyítéka annak, hogy a reverz transzformáció az S fázisos ellenőrzőpont hibáját helyreállítja.

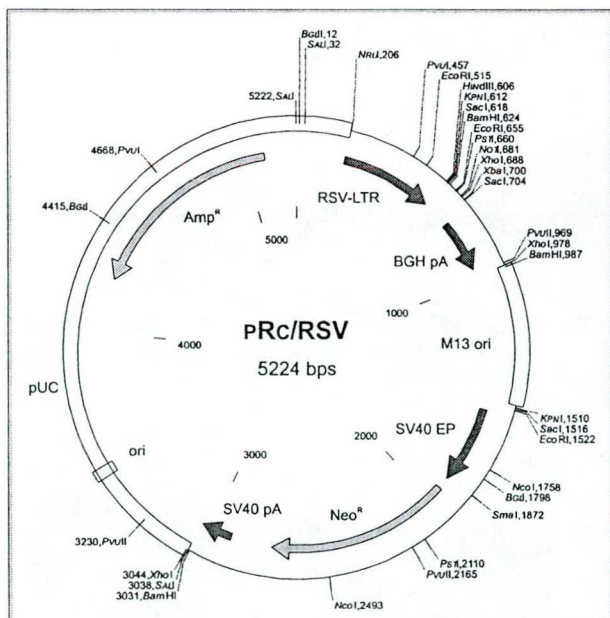
Érdekes ellentmondás van ugyanakkor a mitotikus ellenőrzőpont tekintetében. Az ugyanis az irodalmi adatokból egyértelmű, hogy a reverz transzformáló és a mikrotubulus destabilizáló ágensek egymás hatását teljes mértékben antagonizálják. Kolcemiddel, kolchicinnel meg lehet akadályozni a reverz transzformáció számos jellegzetes változását, viszont még nagyobb dózisú cAMP származékkal kompenzálni lehet a gátlást. Ugyanez áll fordítva is, a mikrotubulusok destabilizációjával járó reakciókat a cAMP származékok gátolják.

Ugyanakkor a mitotikus ellenőrzőpontra a reverz transzformáció nincs hatással. Az instabil M fázisos ellenőrzőponttal rendelkező sejtek a mikrotubulus destabilizáló ágensek okozta blokkból mintegy négy óra múlva abortív mitózissal kilépnek, és a reiniciációs ellenőrzőpont működésétől függően vagy végrehajtanak egy újabb (4n kromoszómaszámú) ciklust, vagy G₁-ben megrekedve végül multimikronukleált sejt ként elpusztulnak. A reverz transzformáció a transzformált rágszalósejtek M fázisos ellenőrzőpontjának működésére semmilyen hatással nem volt.

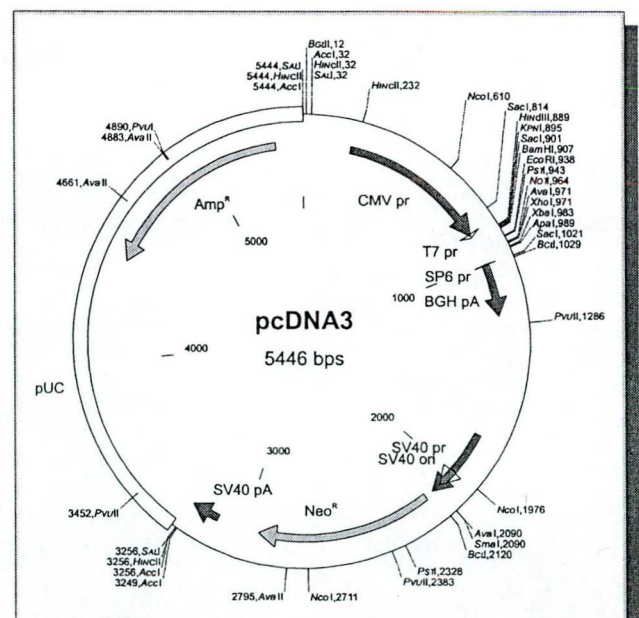
6.2. ONKOGÉNEK TÚLTERMELTETÉSÉNEK HATÁSAI A SEJTCIKLUS ELLENŐRZŐPONTOKRA

6.2.1. Onkogén túltermeltetésre alkalmas expressziós plazmidkonstrukciók építése, és stabil túltermelő sejtvonalak létrehozása

A Northern blott kísérletek eredményeit alapul véve (6.1.1 fejezet) túltermeltetésre három onkogént választottunk ki, melyek az onkogének három különböző csoportját: szignál transzdukciós faktorok (*c-src*), transzkripciós faktorok (*c-jun*), valamint extracelluláris szignál faktorok (*wnt1*) képviselik {1486}. A *c-jun*, *c-src* és *wnt1* onkogének végigtranszlálható cDNS klónjait az ATCC (*American Type Culture Collection*) klóntárból, illetve személyes kapcsolatok útján szereztük be. A cDNS fragmenteket az



6.2.1 ábra. A pRC/RSV eukarióta expressziós vektor (Invitrogen) térképe.

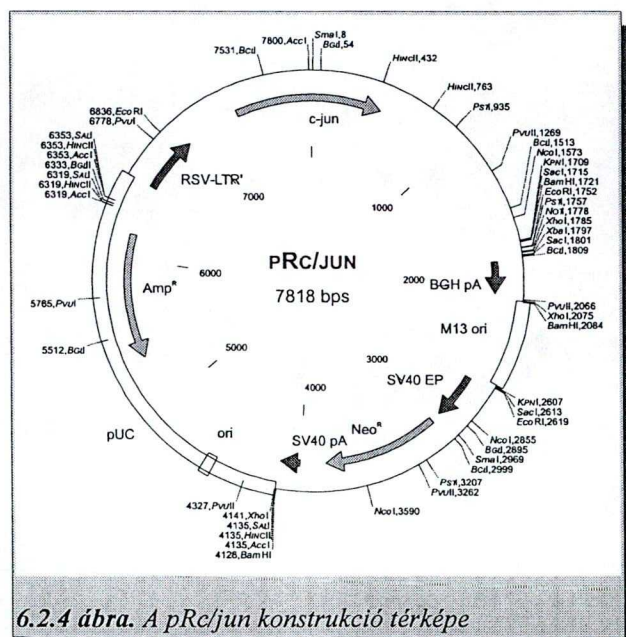
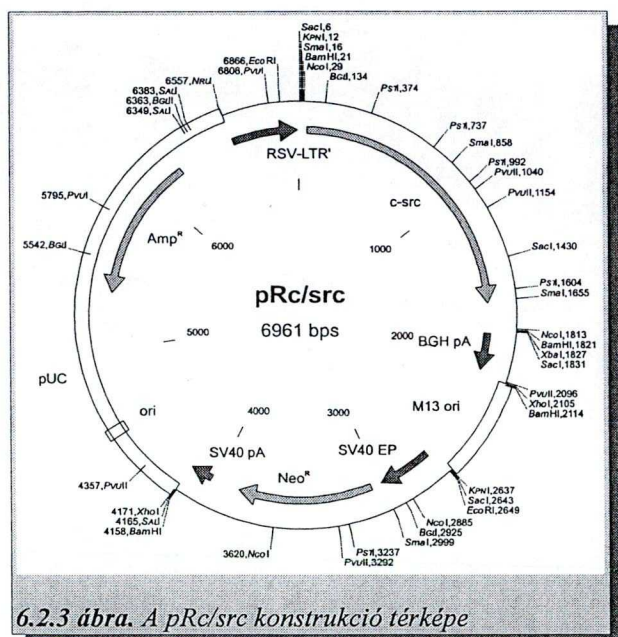


6.2.2 ábra. A pcDNA3 eukarióta expressziós vektor (Invitrogen) térképe.

In vitro gen által forgalmazott eukarióta expressziós vektorokba (pRC/RSV, 6.2.1 ábra; illetve pCDNA3, 6.2.2 ábra) építettük be. Mindkét vektor tartalmaz bakteriális (Amp^R), és eukarióta (Neo^R) szelektációs markert, valamint polilinkert, amelyet a pRc/RSV esetében RSV LTR, a pCDNA3 esetében pedig a citomegalovírus promóter, és a szarvasmarha növekedési hormon poliA addíciós szignálja fog közre.

Az egér idegspecifikus *c-src* cDNS klónját (pN1.8) Dr. Sántha Miklós kollégánk kérte el Prof. David Baltimore-tól egy korábbi munkához [913]. A *c-src* cDNS-t a pN1.8 plazmidból EcoRI / Klenow / XbaI fragmentumon vittük be a pRc/RSV HindIII / Klenow / Xba helyére. A rekombináns konstrukciókat SmaI, SacI és BglII enzimekkel történő emésztéssel ellenőriztük le. Így kaptuk a pRc/src konstrukciót (6.2.3 ábra).

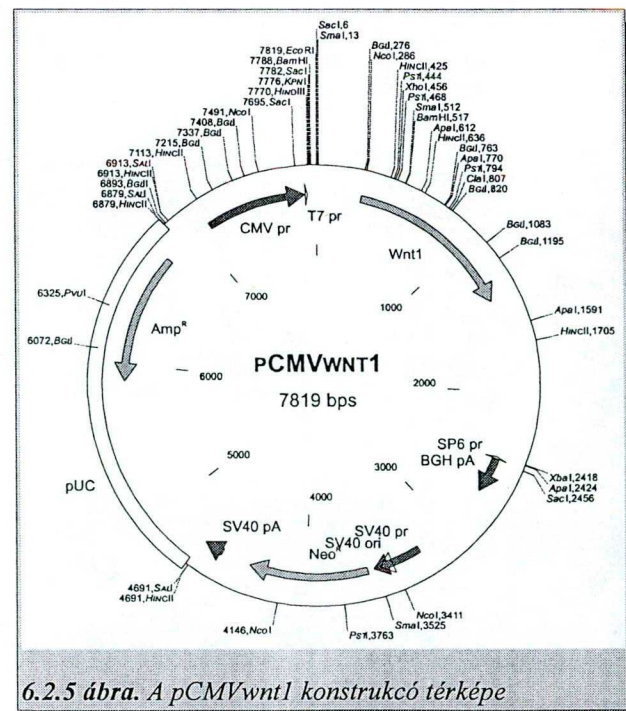
Az egér *c-jun* cDNS-ét az ATCC klóntárból kértük meg (pJAC.1; ATCC 63026). A cDNS-t EcoRI / Klenow fragmentumon vittük be a pRc/RSV feltöltött HindIII helyére. A rekombináns plazmidokat



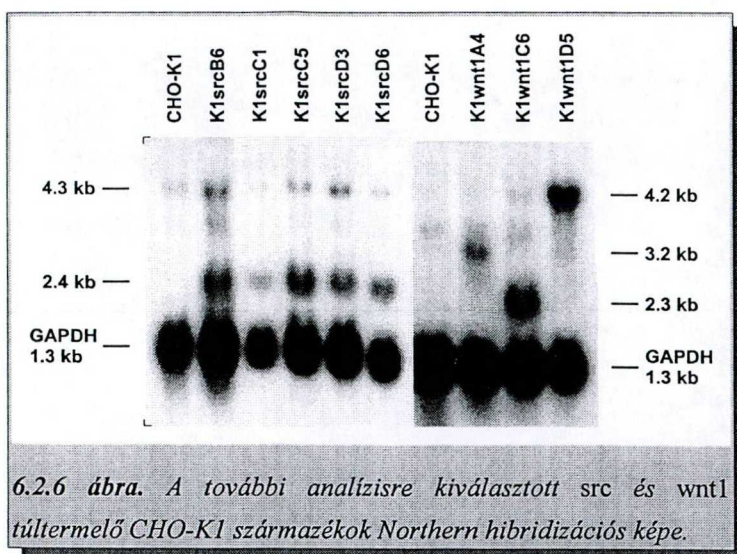
hordozó baktérium klónokat kolónia-hibridizációval választottuk ki, majd az inszert irányát PstI, SmaI, BglII és NcoI emésztésekkel ellenőriztük. Így kaptuk a pRc/jun konstrukciót (6.2.4 ábra).

Az egér *wnt1* cDNS klónja szintén az ATCC klóntárból származik (pMT70; ATCC 63013). A *wnt1* cDNS-t EcoRI / XbaI fragmentumon, irányítottan szubklónoztuk a pCDNA3 vektor EcoRI / XbaI helyére. A rekombináns klónokat HincII, BglIII, NcoI, ApaI, valamint XbaI / EcoRI kettős emésztéssel ellenőriztük. Így kaptuk a pCMVwnt1 klónt (6.2.5 ábra).

Ugyan mindkét vektoron rajta van az SV40 replikációs origó, amely biztosítja, hogy a



plazmid az eukarióta sejtben a kromoszómától függetlenül replikálódik, a stabil transzfektánsok előállításához a kromoszómális integráció előnyösebb. Mivel az integrációs esemény lineáris transzfektáló DNS-el sokkal gyakrabban bekövetkezik, ennek elősegítése érdekében a tisztított konstrukciókat a sejtbe való bevitel előtt BglII enzimmel - amely az onkogént meghajtó RSV LTR illetve CMV promóter előtt hasít - linearizáltuk. A CHO sejtek transzfe-



6.2.6 ábra. A további analízisre kiválasztott src és wnt1 túltermelő CHO-K1 származékok Northern hibridizációs képe.

óját kalcium foszfát koprecipitációs illetve elektroporációs módszerrel végeztük. Üres vektorral is transzfektáltunk sejteket, ezeket a kísérletek során kontrollként használtuk (K20neoA3 és K1neoA6). A transzfekeciót követően a G418 rezisztens túlélő sejtekből 24-24 db egyedi kolóniát izoláltunk. A 24 izolált klón sejtjeiből össz RNS-t preparáltunk, és a túltermelés mértékét Northern blott hibridizációval teszteltük. A transzfekeciós kísérleteket és a túltermelő klónok izolálását kétféle kínaihörcsög ovárium sejtvonallal (CHO-K1 és CHO-K20) is elvégeztük. Az előzetes szűrés alapján kiválasztott túltermelő CHO klónokat ezt követően Northern blott hibridizációval újból ellenőriztük. Ezen kísérletek megerősítették, hogy a választott klónok valóban túltermelők az adott onkogénre, valamint, hogy hosszabb tenyésztést követően is megőrzik onkogéntúltermelő képességüket. A CHO-K1 transzfektált származékok egy reprezentatív Northern blott hibridizációs képét mutatom be a 6.2.6 ábrán. A 4.3 kbp



6.2.7 ábra. A K1wnt1D5 klón morfológiája. Fáziskontraszt mikroszkópos felvétel, 10 X objektív



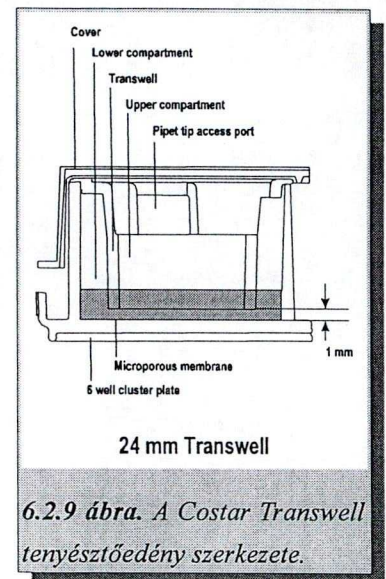
6.2.8 ábra. A reverz transzformált K1wnt1D5 klón morfológiája. Fáziskontraszt mikroszkópos felvétel, 10 X objektív

src mRNS az endogén, a 2.4 kbp nagyságú a bevitt transzgénről keletkezik. A különböző hosszúságú *wnt1* mRNS-eket valószínűleg a konstrukción levő három poliA addíciós szignál alternatív használata eredményezi. A három szignálból kettő a cDNS inszerten található és *in vivo* is alternatív módon használt, a harmadik az expressziós vektoron lévő BGH gén szignálja.

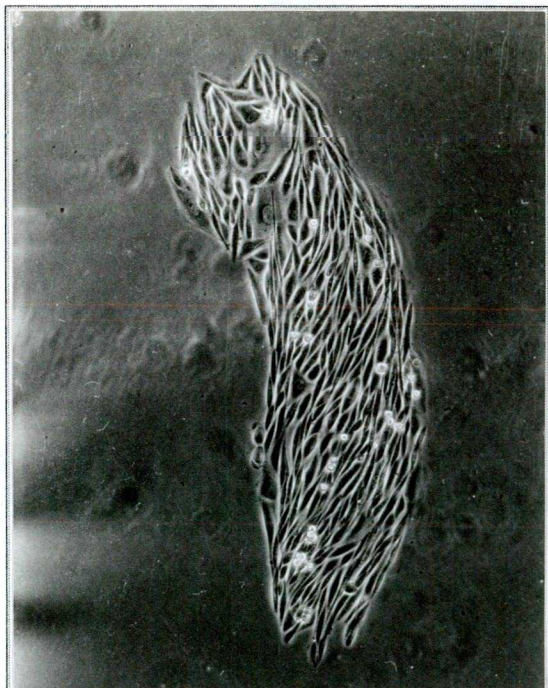
6.2.2. Az onkogének túltermeltetésének hatása a morfológiára és a reverz transzformálhatóságra

Az onkogének túltermeltetésének hatását a reverz transzformálhatóságra többféle citológiai módszerrel vizsgáltuk. Vizsgáltuk a sejtek megnyúlásának mértékét, a lágyagarban való növekedés képességének elvesztését és a ciklusidő megnövekedését. Összefoglalóan megállapítható, hogy a három különböző típusú onkogént (*c-src*, *c-jun*, *wnt1*) túltermelő sejtvonalak reverz transzformálhatósága a kontrollhoz képest nem különbözik.

A K1wnt1D5 *wnt1* transzformált klón morfológiája a többi vonaltól némiképpen eltért. A sejtek nagyobbak, sokkal inkább kiterültek, és inkább sokszög alakúak, mint megnyúltak voltak (6.2.7 ábra). Tudván azt, hogy a *wnt1* onkogén terméke egy extracelluláris növekedési faktor {1486}, és hogy PC12 feokromocitoma sejtekben morfológiai változásokat indukál {453}, megvizsgáltuk, hogy vajon a K1wnt1D5 vonal megváltozott hatása a szérumba kijutó faktor következtében jön-e létre. Costar *transwell* edényében (6.2.9 ábra) tenyésztettünk normál CHO-K1 és K1wnt1D5 sejteket egy kultúrában úgy, hogy a sejtek fizikailag el voltak választva, a médium és a benne levő faktorok átjárása



6.2.9 ábra. A Costar Transwell tenyésztőedény szerkezete.

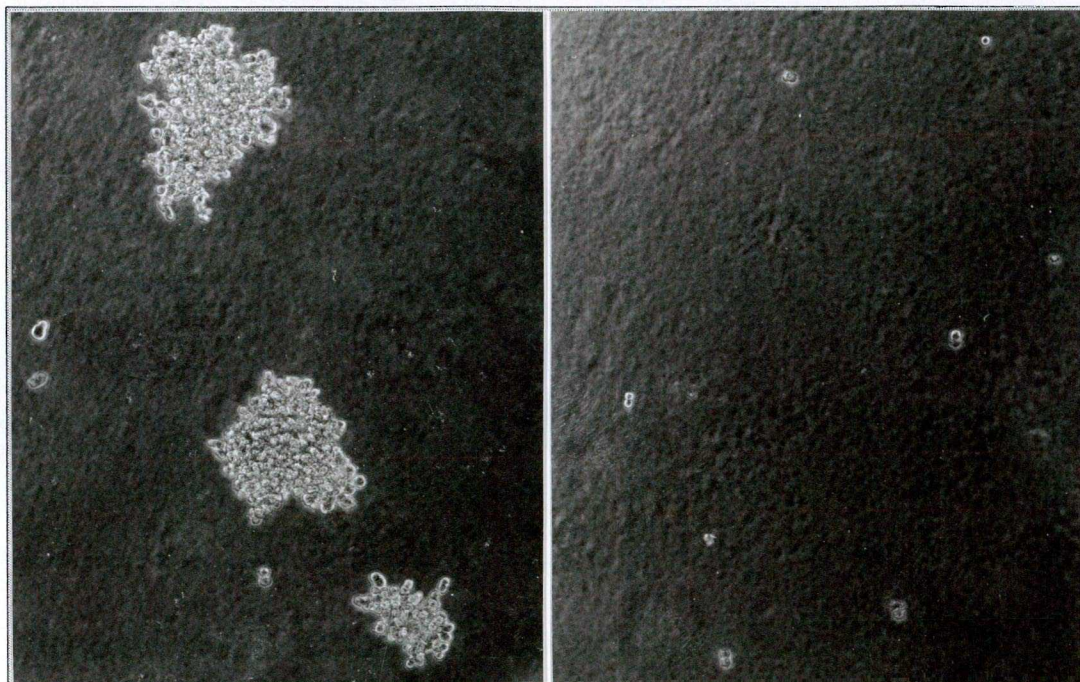


6.2.10 ábra. Egy reverz transzformált K20junA5 kolónia morfológiája. Fáziskontraszt mikroszkópos felvétel, 10 X objektív

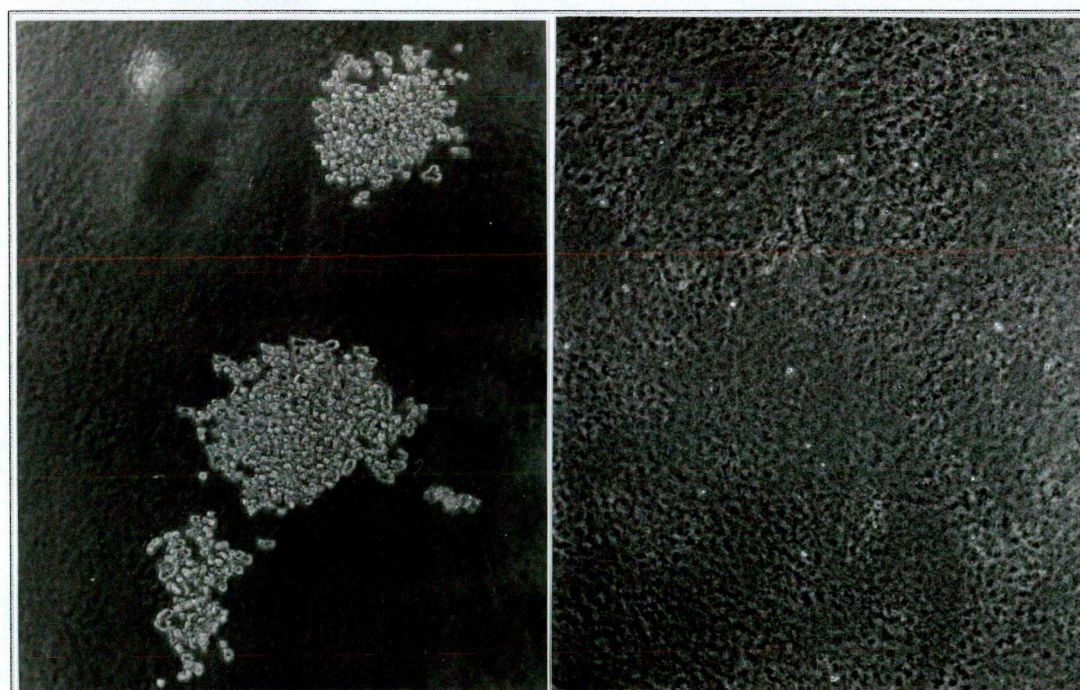


6.2.11 ábra. Egy reverz transzformált K20srcC3 kolónia morfológiája. Fáziskontraszt mikroszkópos felvétel, 10 X objektív

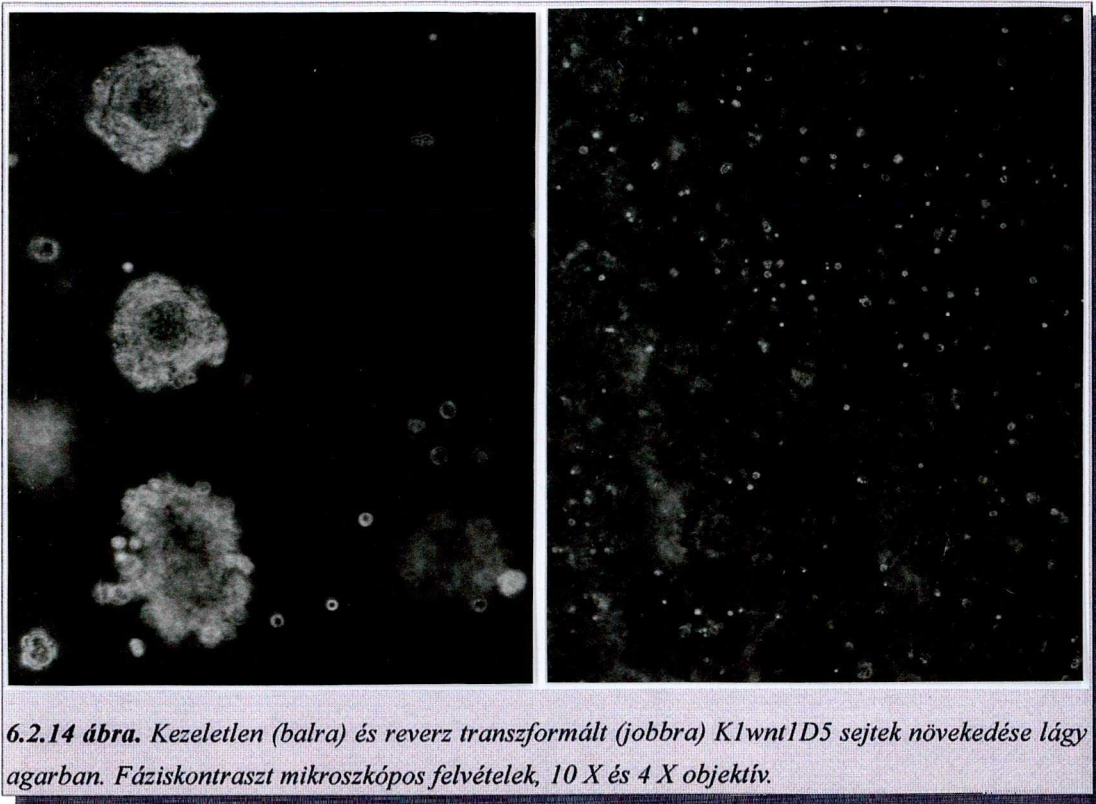
azonban a felső edényke 0.4 μM méretű pórusain biztosított volt. A CHO-K1 sejtek morfológiája azonban az együtt tenyésztés során nem változott meg, jelezve, hogy a K1wnt1D5 vonal morfológiájának változása más okra vezethető vissza. A poliploid sejtekre hasonlóan megnövekedett sejtméret, és lapított morfológia jellemző. A K1wnt1D5 modális kromoszómaszáma 42, tehát valószínű, hogy a morfológiai változás nem a *wnt1* onkogén, hanem a poliploiditás hatása. A többi *wnt1* transzfectánsnál, illetve a *c-jun* és *c-src* transzformált klónnál nem tapasztaltunk semmilyen morfológiai változást.



6.2.12 ábra. Kezeletlen (balra) és reverz transzformált (jobbra) K20srcC3 sejtek növekedése lágy agarban. Fáziskontraszt mikroszkópos felvételek, 10 X és 4 X objektív.



6.2.13 ábra. Kezeletlen (balra) és reverz transzformált (jobbra) K20junA5 sejtek növekedése lágy agarban. Fáziskontraszt mikroszkópos felvételek, 10 X és 4 X objektív.

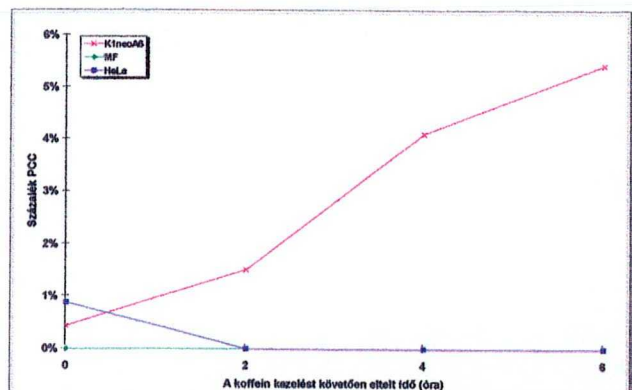


6.2.14 ábra. Kezeletlen (balra) és reverz transzformált (jobbra) K1wnt1D5 sejtek növekedése lágy agarban. Fáziskontraszt mikroszkópos felvételek, 10 X és 4 X objektív.

A három onkogén túltermeltetése hasonlóképpen nem befolyásolja a reverz transzformálthatóságra való hajlamot. A transzfektánsok reverz transzformációra adott morfológiai válasza a nem transzfektáns sejtekhez képest semmiben nem különbözik (6.2.8, 6.2.10 és 6.2.11 ábrák). Hasonlóan nem különböznek a transzfektáns és nem transzfektáns sejtek a lágyagarban való szaporodás képességében (6.2.12, 6.2.13 és 6.2.14 ábrák).

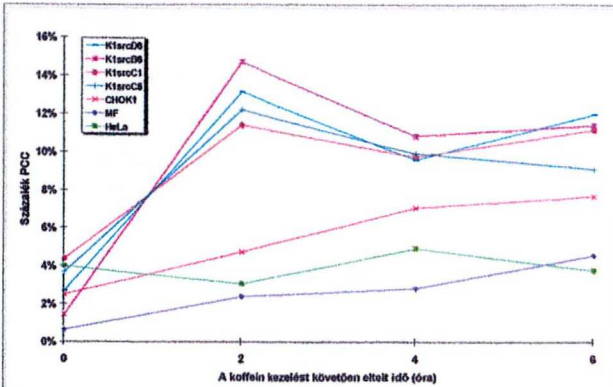
6.2.3. Az onkogének túltermeltetésének hatása az S fázisos ellenőrzőpont működésére

A CHO-K1 sejteket és az onkogén túltermelő származékokat a szokásos módon hidroxüreával blokkoltuk, majd koffein kezelést követően számoltuk a PCC-t mutató sejtek arányát. Kísérleteink során negatív kontrollnak (ami ebben az esetben alacsony számú PCC-t, de jól működő S fázisos ellenőrzőpontot jelent) HeLa sejtet (humán transzformált epitél), primér egér fibroblasztot, vagy immortalizált (de nem transzformált!) C113T3 egér fibroblasztot {487} használtunk. Ezen sejtek mindegyikében a keletkezett PCC-s sejtek aránya nagyon alacsony, míg a hibás S fázisos ellenőrzőpontú sejtekben magas (6.2.15 ábra). A válasz intenzitása kísérletről kísérletre eltérő, 15 % és akár 50 % között lehet, amelynek oka eddig még nem behatárolt mellékhatás. A PCC-s sejtek közé beleszámoltuk a látszólag normális metafázisos sejteket - hiszen ezek is valamilyen módon a hidroxürea blokk alól kiszabadultak,

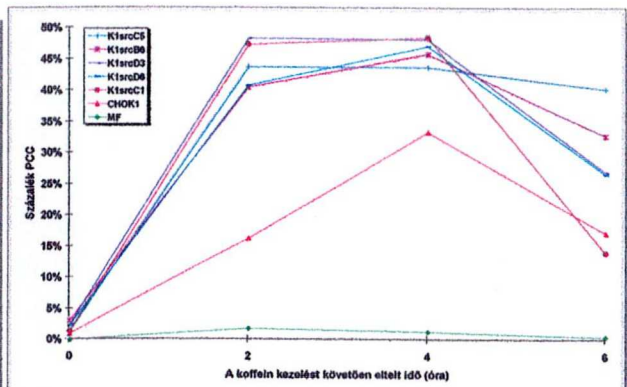


6.2.15 ábra. A kísérleteink során használt pozitív és negatív kontrollok korai kromoszómakondenzációjának mértéke (PCC #9 Szeged 110397, EthBr festés)

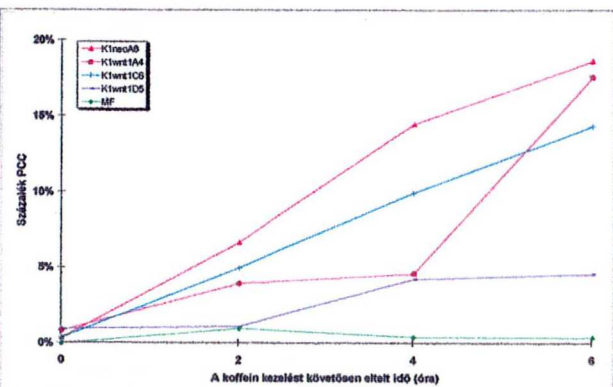
ezek azonban alacsony arányuk miatt semmiképpen nem okozhatták a PCC arány tapasztalt ingadozását. A negatív kontroll sejtek szintén mutattak néhány százalék PCC-t, a pozitív kontrollok azonban ekkor is sokkal intenzívebb választ adtak. Ezt minden bizonnyal az okozza, hogy az előszinkronizáció is és az S fázisos ellenőrzőpont is kissé "ereszt", nem 100 %-os hatásfokú.



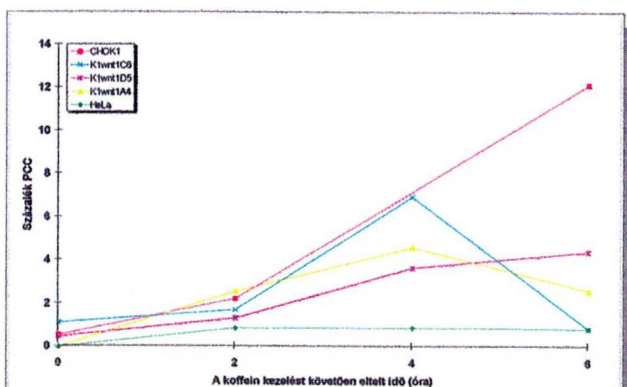
6.2.16 ábra. A src túltermelő CHO-K1 származékok korai kromoszómakondenzációjának mértéke (PCC #7, Szeged, 110397, EthBr festés)



6.2.17 ábra. A src túltermelő CHO-K1 származékok korai kromoszómakondenzációjának mértéke (PCC #12, Szeged, 150597, EthBr festés)



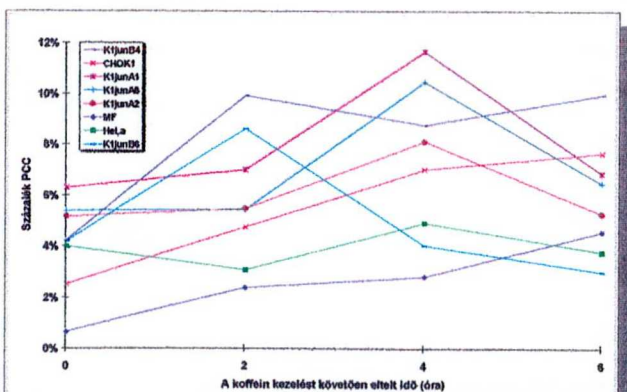
6.2.18 ábra. A wnt1 túltermelő CHO-K1 származékok korai kromoszómakondenzációjának mértéke (PCC #10, Szeged, 180397, EthBr festés)



6.2.19 ábra. A wnt1 túltermelő CHO-K1 származékok korai kromoszómakondenzációjának mértéke (PCC #3, Szeged, 121296, EthBr festés)

Kísérleti rendszerünkben leteszteltük az onkogén túltermelő vonalakat. A következő ábrákon néhány reprezentatív kísérletben mutatom be a különböző onkogéneket túltermelő sejtek hidroxürea blokkot követő koffein kezelésre adott választ.

A bemutatott ábrákból egyértelműen kiderül az elsőre meglepő, de irodalmi adatokkal jól alátámasztható eredmény: a src onkogén túltermeltetése fokozza a PCC-s sejtek számát, a malignus sejtekre jellemző hibás S fázisos ellenőrzőpont választ (6.2.16 és 6.2.17 ábrák),



6.2.20 ábra. A jun túltermelő CHO-K1 származékok korai kromoszómakondenzációjának mértéke (PCC #7, Szeged, 110397, EthBr festés)

míg a *wnt1* onkogéné csökkenti (6.2.18 és 6.2.19 ábrák). A *jun* onkogént túltermelő sejtekkel ilyen választ nem tudunk kimutatni, a kontrollhoz képest nem látszik különbség (6.2.20 ábra).

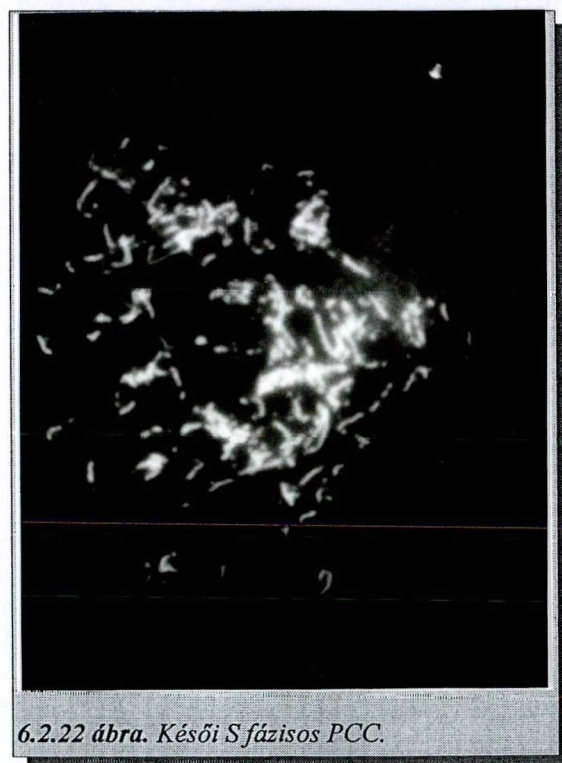
6.2.4. A *src* túltermeltetés S fázisos ellenőrzőpontot befolyásoló hatása további kérdéseket vet fel

A *src* túltermeltetés S fázisos ellenőrzőpontra gyakorolt érdekes hatását több irányból kívánjuk tovább vizsgálni: 1) Megfigyelhető-e különbség a *src* túltermelő klónok és a többi sejt között a spontán PCC kialakulásának arányában különböző drogok, vagy sugárzások hatására bekövetkező S vagy G₂ fázisos blokkot követően? 2) Van-e különbség a koffeinnel rokon de más támadáspontú vegyület, a pentoxifillin hatásában? 3) A *src* családba tartozó más fehérjék, illetve virális megfelelőik is mutatják-e az S fázisos ellenőrzőpont hibáját fokozó hatásukat? E kérdések megválaszolására vonatkozó kísérleteink részben a tervezés fázisában vannak még, egy részük viszont a korábbiakkal egyező eredményeket hozott.

Ismert, hogy a koffeinnel rokon vegyület, a pentoxifillin a korai kromoszómakondenzációt előidéző hatásában hasonlít a koffeinhez, azonban a PCC-be kényszerített sejtek aránya alacsonyabb, míg az

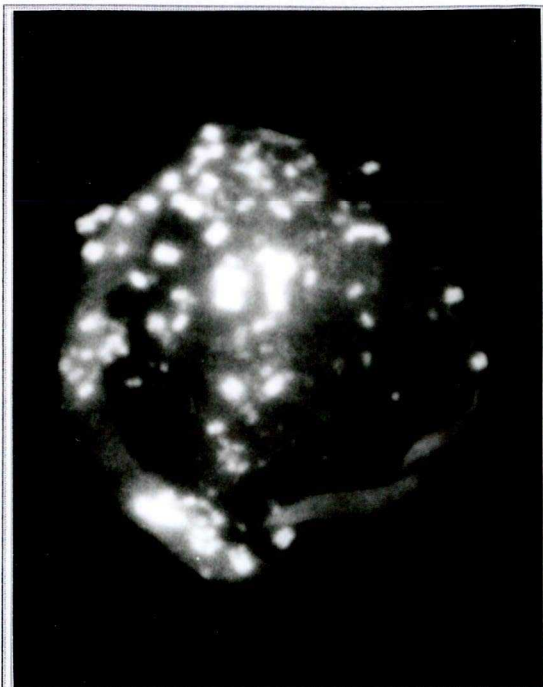


6.2.21 ábra. Korai S fázisos PCC.



6.2.22 ábra. Késői S fázisos PCC.

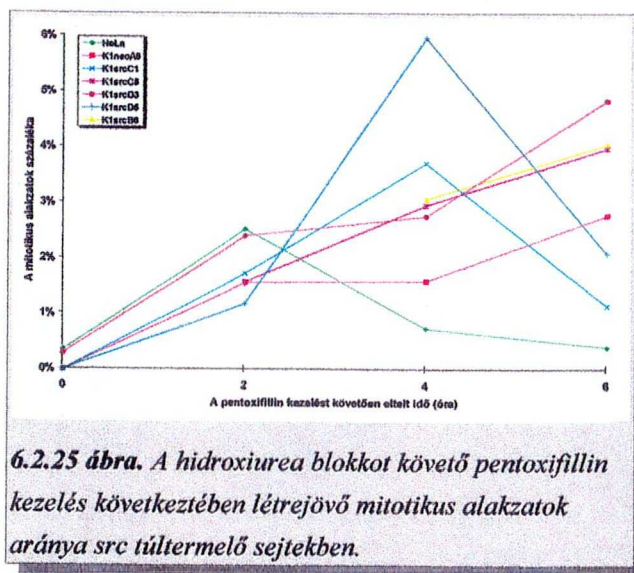
apoptotikus sejtek aránya magasabb. Egymással párhuzamos kísérletben előszinkronizáltunk három sorozat sejtet (a *src* túltermelő klónokat, pozitív illetve negatív kontrollt), majd két sorozatot blokkoltunk hidroxüreával, a harmadikat nem. A hidroxürea blokkolt sejtek közül az egyik sorozatot, valamint a nem blokkolt sejteket kezeltük pentoxifillinnel, majd számoltuk a létrejövő mitotikus alakzatokat. A sejtek között nagyon változatos volt a mitotikus alakzatok morfológiája, tökéletes metafázis, klasszikus PCC (6.2.21 és 6.2.22 ábrák), szétfragmentálódott apoptotikus kromatin (6.2.23 ábra), hibásan össze-vissza kapcsolódott kromoszómák (anafázisos hidak, 6.2.24 ábra) és posztmitotikus multimikronukleáció (6.2.26 ábra) ugyanúgy előfordultak. Mivel azonban ezek mindegyike az S fázisos blokkból való kilépésre utal, nem tettünk különbséget közöttük. A kép így sokkal bonyolultabbá vált, mindazonáltal egyértelmű, hogy a hidroxürea blokkot követő pentoxifillin kezelés a *src* túltermelő klónokban nagyobb



6.2.23 ábra. Apoptózis.



6.2.24 ábra. Anafázisos hid.

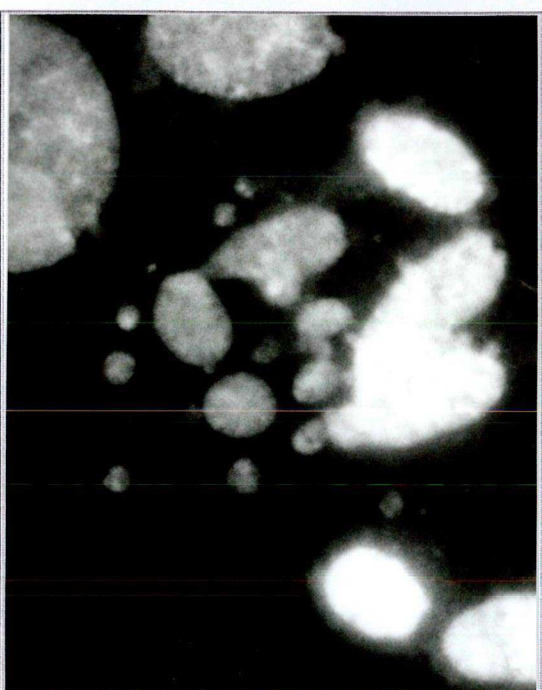


6.2.25 ábra. A hidroxürea blokkot követő pentoxifillin kezelés következtében létrejövő mitotikus alakzatok aránya *src* túltermelő sejtekben.

arányú mitotikus katasztrófát indukál, mint a kontroll K1neoA6-ban (6.2.25 ábra).

Ugyanebben a kísérletben megpróbáltuk összehasonlítani a spontán mitózisba lépő sejtek arányát, és azt kaptuk, hogy a *src* túltermelő sejtek sokkal nagyobb arányban lépnek ki a hidroxürea blokkból, koffein vagy pentoxifillin kezelés nélkül, mint a kontrollok (6.2.27 ábra). A hidroxürea blokk hatékonyságát tekintve már szembeötlő a különbség: míg a HeLa és a K1neoA6 egyáltalán nem mutat semmilyen kondenzációt, addig a *src* túltermelő klónokban ez az arány viszonylag magas. Különösen szembetűnő volt, hogy a megfigyelt kondenzált magok között jelentős számú igazi PCC-t lehetett megfigyelni.

A csak pentoxifillinnel kezelt csoport nagyrészt valódi metafázist, apoptózist illetve anafázisos



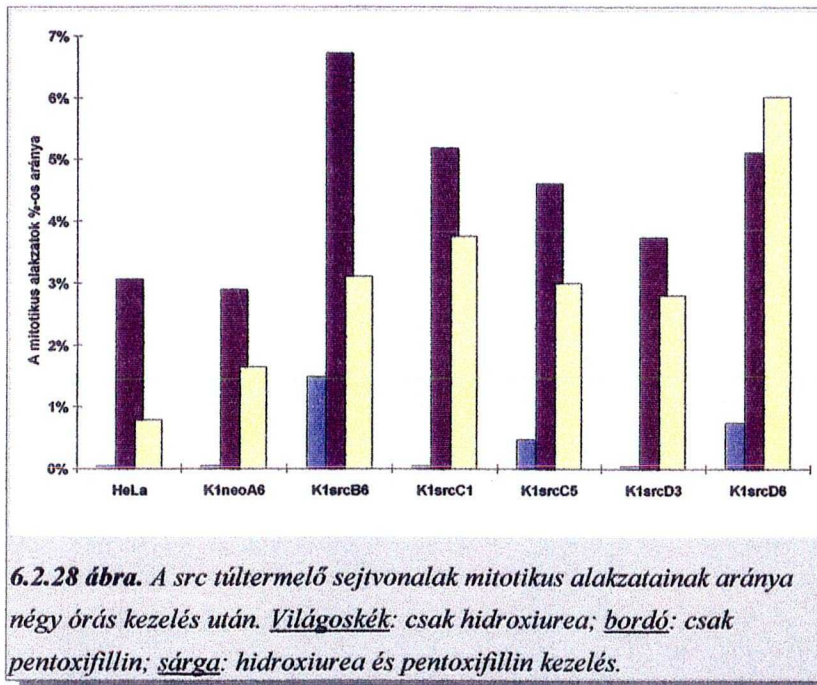
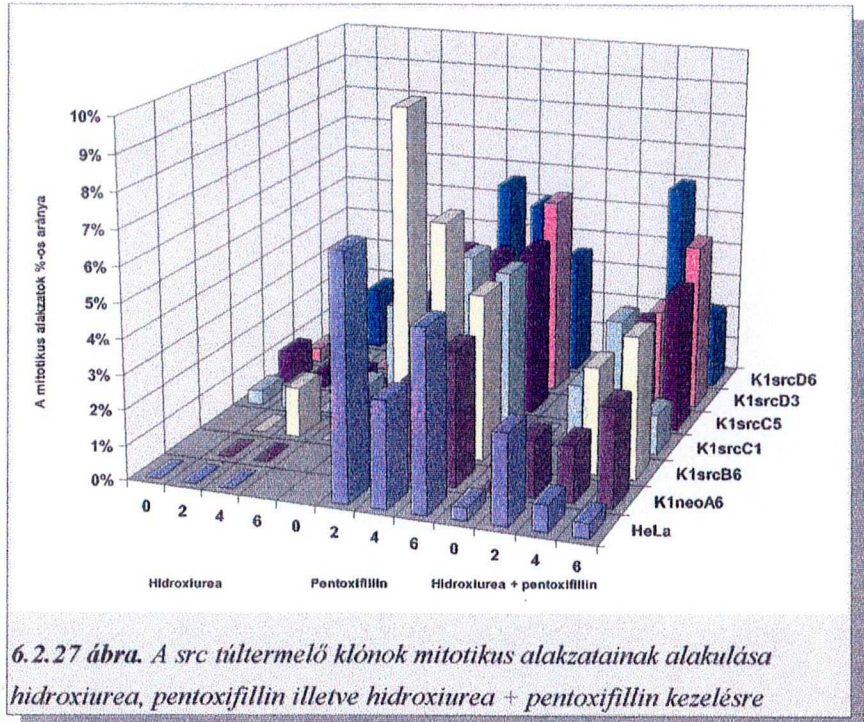
6.2.26 ábra. Multimikronukleáció.



hidakat mutatott, amit jól magyaráz az a tény, hogy a pentoxifillin sokkal nagyobb arányban okoz apoptózist, mint a koffein (Prof. C.S. Downes, személyes közlés). A mitotikus kormoszóma alakzatok száma itt is magasabb a *src* túltermelő klónokban, mint a kontrollokban.

Az ábra így meglehetősen bonyolult, de ha kiemeljük belőle a 4 órás kezelés adatait az előbbi megállapítások egyértelmű alátámasztást nyernek (6.2.28 ábra).

Hasonló kísérleteket elvégeztünk afidikolin és koffein kezeléssel, ezek kiértékelése még tart. A többi kísérleteink még csak a tervezés fázisában vannak. A fenti eredményeket a pp60^{src} fehérje sejtciklus ellenőrző pont szabályozásban játszott szerepének további bizonyításaként mutattam be.

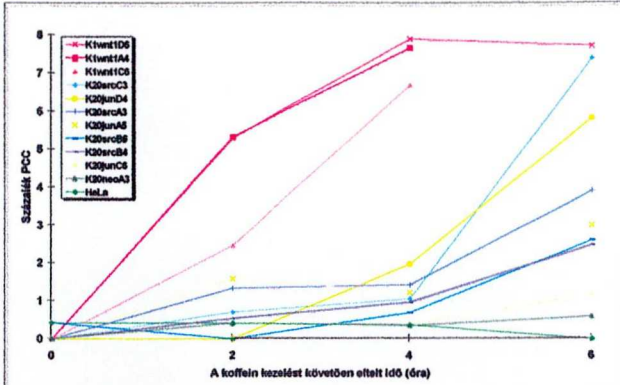


6.2.5. A CHO-K20 sejtvonal és származékai nem mutatják az S fázisos blokk és koffein kezelés okozta korai kromoszómakondenzációt

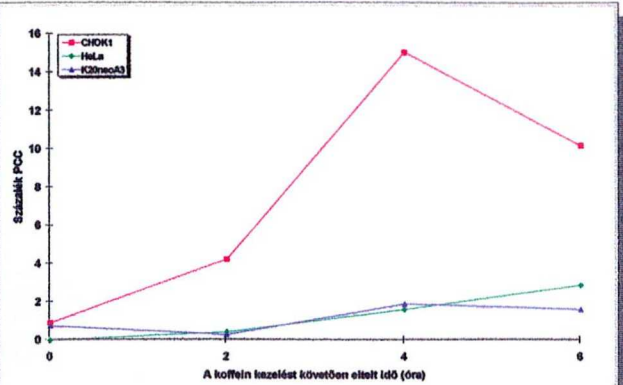
Egy véletlen felfedezés adta a kezünkbe az S fázisos ellenőrzőpont tanulmányozásának, és talán a működésében szereplő gének azonosításának újabb vizsgálati objektumát.

Az onkogén túltermelő klónok létrehozását szegedi laboratóriumunkban kezdtük el, ahol az eredeti CHO-K1-es sejtvonal {1272} egy, a 70-es évek közepén izolált szubklónját a CHO-K20-at használtuk, a CHO-K1-et nem. A *src* és *jun* túltermelő vonalakat Szegeden hoztuk létre. Prof. R.T. Johnson laboratóriumában, Cambridge-ben töltött négy hónapos tanulmányutam során építettem meg a pCMVwnt1

konstrukciót (6.2.5 ábra), és hoztam létre a túltermelő vonalakat az ott használt CHO-K1 vonalból. A meglepetés akkor ért bennünket, amikor az onkogéneket túltermelő vonalakat először leteszteltük (6.2.29 ábra). Ebben a kísérletben a kontrollnak használt K20neoA3 is a negatív kontroll HeLa-hoz hasonlított; az mindenesetre elsőre nyilvánvaló volt, hogy a CHO-K20 származékok a hidroxürea / koffein kezelésre nem válaszolnak az elvártak - a transzformált rágszálósejteknek - megfelelően. Egy másik kísérletben már a CHO-K1 és CHO-K20 sejtvonalat közvetlenül hasonlítottuk össze, az eredmény ugyanaz volt (6.2.30 ábra), a CHO-K20 vonalat hidroxürea / koffein kezeléssel nem lehet PCC-be kényszeríteni.

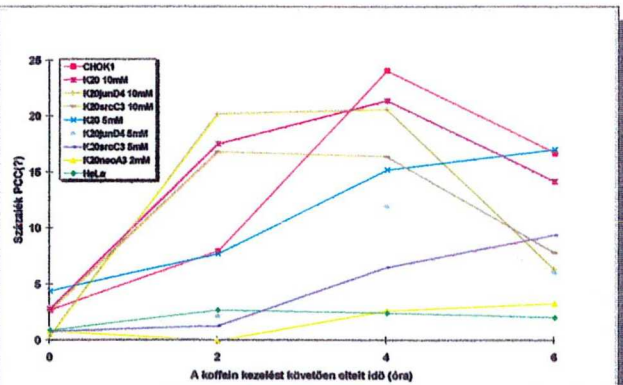


6.2.29 ábra. Az onkogén túltermelő különböző CHO származékok korai kromoszómakondenzációjának mértéke (PCC #2 Coleraine, 181196, kristályibolya festés)



6.2.30 ábra. A CHO-K20 sejtvonala korai kromoszómakondenzációjának mértéke nem különbözik a kontroll HeLa sejttől (PCC #6, Szeged, 310197, kristályibolya festés).

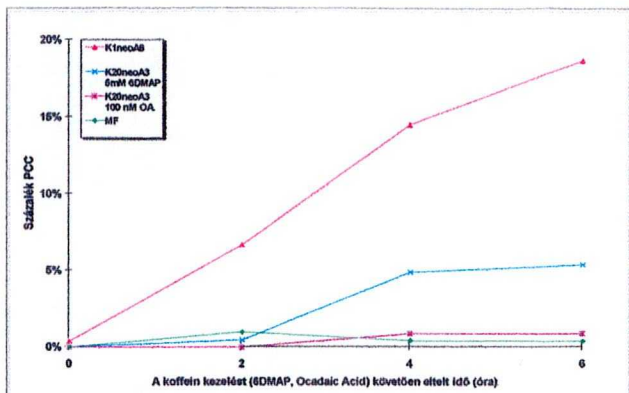
Megvizsgáltuk, vajon a CHO-K20 sejtek csökkent koffein érzékenysége-e az oka annak, hogy a hidroxürea blokkot követő koffein kezelés nem vált ki korai kromoszómakondenzációt. CHO-K20 származékokat blokkoltunk hidroxüreával mint rendesen, de a koffein koncentrációját a szokásos 2 mM-ról 5 illetve 10 mM-ra emeltük. A válasz egyértelmű, bár kiértékelése nehéz. A növekvő koffein koncentráció hatására a PCC-t mutató sejtek száma nagyon kis mértékben emelkedik, viszont a koffein toxikus hatása egyre inkább előtérbe kerül. Az apoptózis következtében fragmentálódott magi DNS elkülönítése



6.2.31 ábra. A CHO-K20 sejtek nagy koffein koncentrációra sem válaszolnak PCC-vel, az apoptózis ugyanakkor jelentősen megemelkedik (PCC #6, Szeged, 310197, EthBr festés)

a PCC-től kvalitatíve lehetséges, kvantitatív módon azonban igen nehéz. E kísérletek azt sugallják, hogy még emelkedett koffein koncentrációval sem lehet a CHO-K20 sejteknél PCC-t kiváltani (6.2.31 ábra).

A CHO-K20 sejtek koffein érzékenységét más kísérleti rendszerben is leteszteltük. A koffein a sejtek Röntgen vagy γ sugárzás hatására bekövetkező túlélését jelentősen lerontja. A sejtek túlélését a besugárzási dózis függvényében szemilogaritmikusan ábrázolva a túlélési görbe az alacsonyabb dózisoknál egy kis "vállat" mutat. A koffein kezelés ezt a vállat eltünteti, a túlélési görbe lineáris lesz {598}. Hasonló rendszerben a CHO-K1 és CHO-K20 sejtvonalak között nem mutatkozik különbség (6.2.33 ábra), ami

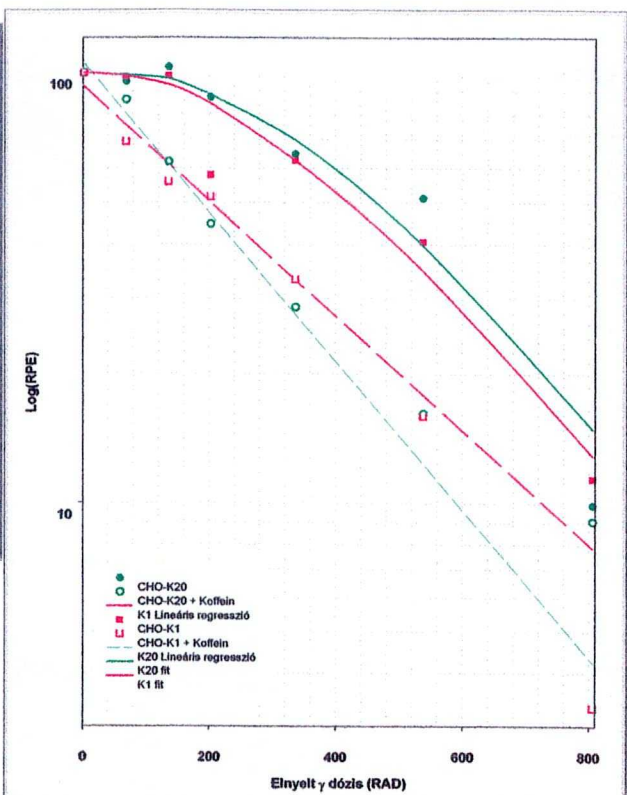


6.2.32 ábra. A CHO-K20 sejtek 6-dimetil-aminopurin és okadainsav kezeléssel sem kényszeríthetők PCC-be (PCC #10 Szeged, 180397, EthBr festés)

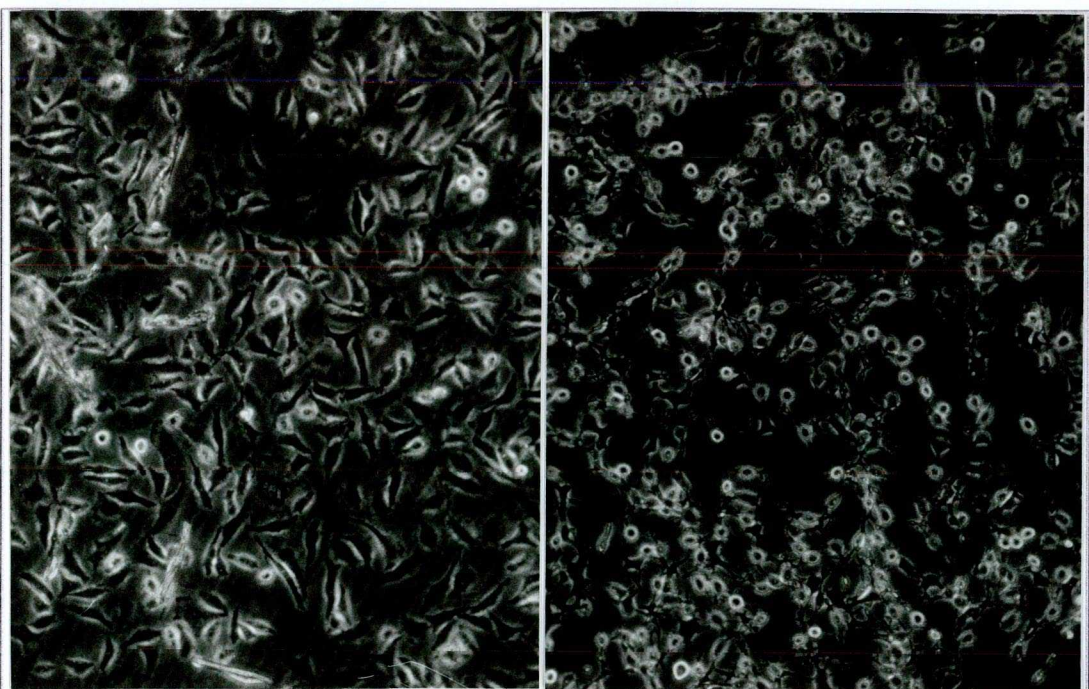
megerősíti, hogy a két sejt koffein érzékenysége - legalábbis a koffeinnek a γ sugárzás okozta károsodások túlélését befolyásoló hatását tekintve - nem különbözik.

A hosszantartó DNS szintézis gátlást követő korai kromoszómakondenzációt nem csak koffein kezeléssel lehet kiváltani, hanem 6-dimetil-aminopurinnal és a PP2A foszfatázgátló okadainsavval is. A CHO-K20 származékok válasza mindkét droggal történő kezelésre negatív volt (6.2.32 ábra), PCC-t nem mutattak.

A 6-dimetil-aminopurinnal végzett kísérletek még egy igen érdekes eredményt adtak. A kezelés következtében a CHO-K20 sejtek jellegzetes morfológiai változáson mennek keresztül, amely rendkívül



6.2.33 ábra. A CHO-K1 és CHO-K20 sejtvonalak γ túlélése koffein jelenlétében és anélkül.

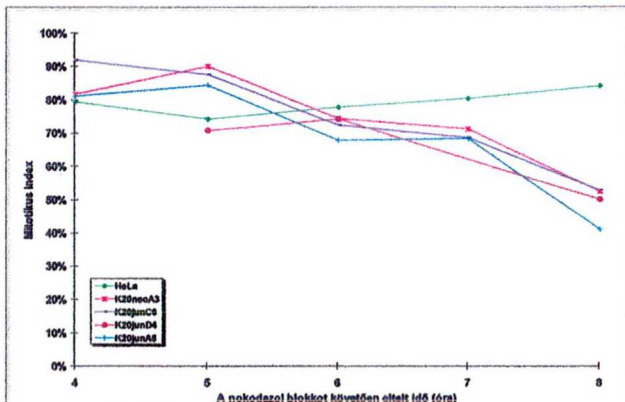


6.2.34 ábra. 6-dimetil-aminopurinnal kezelt CHOK20 sejtek a 0 időpontban (balra) és 2 órával a kezelés után. Fáziskontraszt mikroszkópos felvételek, 10 X objektív.

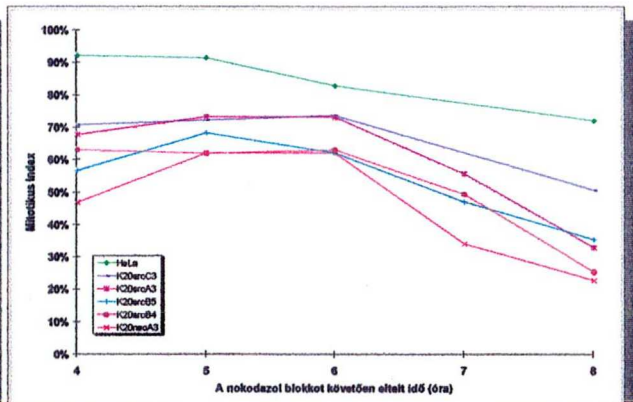
gyorsan kialakul. A kezelést követő 0 időpontban (amely a valóságban néhány perc és a drogok hozzáadását és a fotózás előkészítését jelenti) már sejthető a változás, a 2. órában azonban már teljesen nyilvánvaló (6.2.34 ábra). A 4. és 6. órában már nem látszik változás. A morfológiai változás okát jelenleg nem ismerjük, gyanítható, hogy a sejt pusztulásával van összefüggésben.

E kísérletek azt sugallják, hogy a CHO-K20 és CHO-K1 sejt S fázisos ellenőrzőpontjának működése jelentősen eltérő; a CHO-K20 sejtben a normál, vagy reverz transzformált sejtekre jellemző módon ez az ellenőrzőpont ép. Mivel a két sejt vonal között genetikailag csak meglehetősen kis különbség van - a CHO-K1 -hez képest a CHO-K20 -nak csak 20 kromoszómája van, ami egy kicsi, eddig nem karakterizált kromoszóma elvesztésének következménye - e sejt vonal segítségével lehetőség nyílik azon gének izolálására, amelyek az S fázisos ellenőrzőpont működésében szerepet játszanak. Kollaborációs partnereinkkel közösen el is kezdtük a két sejt közötti génexpressziós különbségek kimutatását szolgáló kísérleteket. *Representational difference analysis* kísérletekben Dr. Jayne Devlin olyan cDNS fragmentumokat izolált, amelyek csak az egyik sejtben vannak meg, a másiktól hiányzanak. Ezek további karakterizálása folyamatban van.

6.2.6. Az onkogének túltermelésének hatása az M fázisos ellenőrzőpont működésére



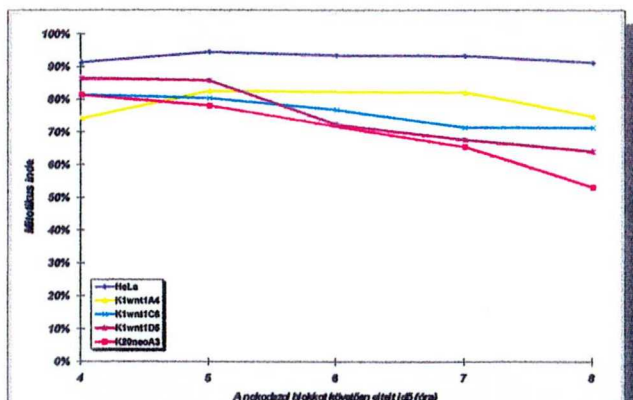
6.2.35 ábra. A *jun* túltermelő klónok mitotikus exit vizsgálata (#4, 961001)



6.2.36 ábra. A *src* túltermelő klónok mitotikus exit vizsgálata (#5, 961017)

A sejtciklus hosszan tartó blokkolása metafázisban a mikrotubulusok szerveződését befolyásoló ágensekkel (kolhicin, kolcemid, nocodazol, taxol, N₂O) egyes sejteknél abortív mitózishoz vezet: a sejtek az anafázis, telofázis és citokinézis kihagyásával kilépnek G₁ fázisba, miközben ploidiájuk megkétszereződik. Ez minden transzformált rágcélsejtre és néhány humán vonalra is jellemző {505}.

Az S fázisos ellenőrzőpont kísérletekhez hasonlóan megvizsgáltuk, hogy a három különböző típusú onkogén (*c-src*, *c-jun*, *wnt1*)



6.2.37 ábra. A *wnt1* túltermelő klónok mitotikus exit vizsgálata (#3, 960911)

túltermeltetésének, illetve a reverz transzformációnak van-e hatása az M fázisos ellenőrzőpont működésére. A válasz mindegyik esetben negatív (6.2.35, 6.2.36 és 6.2.37 ábrák), a három onkogén túltermeltetése a mitotikus ellenőrzőpont működésére nincs hatással.

6.3. A TRANSZFORMÁLT RÁGCSÁLÓSEJTEK SEJTCIKLUS ELLENŐRZŐPONTJAINAK HIBÁJÁT EGYES HUMÁN KROMOSZÓMÁK JELENLÉTE KOMPLEMENTÁLJA SZOMATIKUS SEJTHIBRIDEKBEN

Eddig láthattuk, hogy a sejtciklus ellenőrzőpontjainak hibája csaknem minden esetben a rágcsálósejtek sajátosága illetve a transzformált állapothoz kötődik. A szomatikus sejt genetika olyan eszközt ad kezünkbe, mellyel a vizsgált rágcsálósejtjeink "humanizálhatók": humán és kínaihőrcsőg, vagy egyéb más rágcsálósejt fúziójával olyan hibridsejtek állíthatók elő, amelyek a humán kromoszómaszerelvény egy, vagy néhány kromoszómáját stabilan hordozzák. Ezek a sejtek a humán genetikában és a humán genom project-ben is komoly segítséget jelentenek (*mapping panels*).

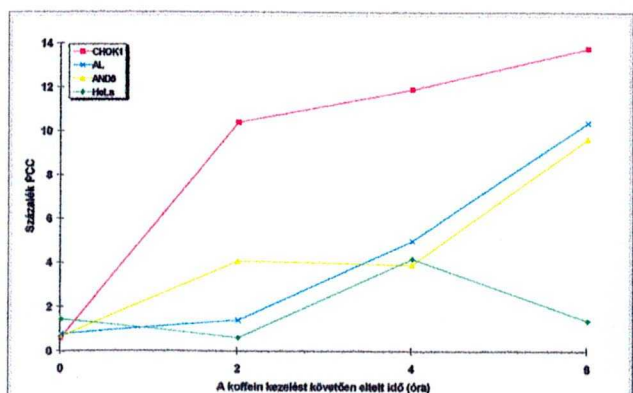
Kollaborációs partnerünk, Prof. C.S. Downes, és munkatársai a humán kromoszómaszerelvény paneljeit, több kromoszómát egyszerre hordozó hibridsejtet teszteltek le az S és M fázisos valamint a reiniciációs ellenőrző pont működésének épségére. Az átfedő panelek segítségével behatárolható volt az a humán kromoszóma, amely nagy valószínűséggel egy az adott ellenőrző pont működéséért felelős humán gént hordoz. A mitotikus ellenőrzőpontot komplementáló hibridsejtekben a 15-ös, az S fázisos ellenőrzőpont helyreállítását mutató sejtekben pedig a 11-es humán kromoszóma jelenléte volt közös.

A 11-es és 15-ös kromoszómát monoszómikusan hordozó CHO-K1 háttérű hibridek további tesztelését a szegedi laboratóriumban mi végeztük.

6.3.1. A 11-es kromoszómás monoszómikus hibridek S fázisos ellenőrzőpontja ép

A 11-es kromoszómás monoszómikus hibridsejtet a 70-es évek elején hozták létre (A_L {485, 868}), és hálás kísérleti objektuma volt a szomatikus sejt genetikának, mivel legalább két olyan sejt felszíni antigént (a_1 antigének) hordoz, amelyek jelenlétét monoklonális ellenanyag és komplement segítségével közvetlenül ki lehet mutatni. A két antigén a 11-es kromoszóma két karjára térképeződik. A sejt morfológiája is jelentősen eltér a CHO-K1 -től, növekedési paraméterei pedig rendkívüli mértékben megváltoztak. Szuszpenzióban, vagy lágyagarban ugyanis ez a sejt nem képes növekedni (Prof. C.S. Downes, személyes közlés), ami tumorszupresszor hatásra utal. A 11-es kromoszómára valóban térképeződik egy tumor szupresszor, a Wilm's tumor gén {1486}, ennek szerepét azonban még nem vizsgáltuk.

Az A_L sejtet hagyományosan hidroxüreával blokkolva és koffeinnel kezelve az nem mutatja a gyors, korai mitotikus kondenzációt (6.3.1 ábra). S fázisos ellenőrzőpontja tehát ép, ami annak bizonyítéka, hogy a 11-es kromoszómán olyan gén, vagy gének helyezkednek el, amelyek a CHO-K1 hibás ellenőrzőpontját komplementálják. A gén további térképezéséhez az A_L sejt vonal



6.3.1 ábra. Két 11-es kromoszómás hibridsejt korai kromoszómakondenzációja

11-es kromoszómán deléciós származékait kértük el Dr. Charles Waldren-től (Colorado State University, Fort Collins, Colorado). Mindkét sejt csak az egyik a_1 antigén jelenlétét mutatja; a 128-2B3 jelű klónból a 11-es kromoszóma p, a 901-11D jelűből pedig a q karja hiányzik.

Meglepetésre egyik deléciós származék sem mutatta az S fázisos ellenőrzőpont komplementációját, ami arra utal, hogy a 11-es kromoszómán legalább két gén van, ami az ellenőrzőpont működésében szerepet játszik, vagy arra befolyása van. Ez annál is inkább meglepő volt, mivel Cambridge-i kollaborációs partnereinknek az A_L sejtekkel kapott eredményei sem voltak konzekvenssek. Valószínűsítettük, hogy a sejtvonaltelnyesztése során valamilyen genetikai esemény, vagy kísérletezői hiba érthette az A_L vonalat, mert egy idő után nem úgy viselkedett, ahogy korábban. Ekkor felkerestük az összes régi fagyasztást, valamint további szubklónokat kértünk Dr. Charles Waldren-től. Az általa küldött AND6 elnevezésű vonal a 11-es kromoszómán neomicin rezisztencia markert hordozott {599}, ezáltal a sejtből való kiszegregálását meg lehet akadályozni.

Az A_L szubklónokkal, valamint a deléciós származékokkal ismét elvégezve a kísérleteket a korábbi eredmények megerősítést nyertek (6.3.2 ábra). Három A_L szubklón ($A_{L(J)}$: a Cambridgeben fellelhető legrégebbi fagyasztás; $A_{L(R)}$: egy állítólagos revertáns; AND6: a neomicin rezisztens származék) teljesen egybeeső görbét adott, míg a két deléciós származék, valamint az A_{L86} (Dr. Charles Waldren legrégebbi fagyasztása) valamivel magasabb százalékban mutatott PCC-s

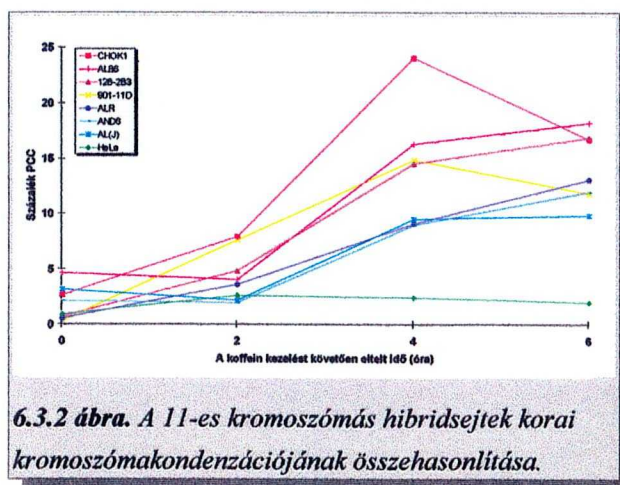
sejteket. Ez azonban még mindig elmaradt a kontroll CHO-K1 -től. Ezek az adatok ismét azt erősítik, hogy a 11-es kromoszómán legalább két gén van, amely az S fázisos ellenőrzőpontra hat, és ezek közül talán az egyiknek a működése az A_{L86} szubklónban kiesett.

Kollaborációs partnereinkkel közösen kezdeti lépéseket tettünk azon gének azonosítására, amelyek a 11-es kromoszómás sejtvonalakban az S fázisos ellenőrzőpont komplementációjáért felelősek. cDNS alapú *representational difference analysis* kísérletekben az AND6 és a CHO-K1 expressziós mintázatát hasonlítjuk össze. Választásunk azért esett az AND6-re, mert a benne expresszáldó *neo* gén pozitív kontrollként használható, másrészt ennek a sejtnek az S fázisos ellenőrzőpontja egészen bizonyosan stabil, olyannyira, hogy legalább 7 kísérletben használtuk kontrollnak.

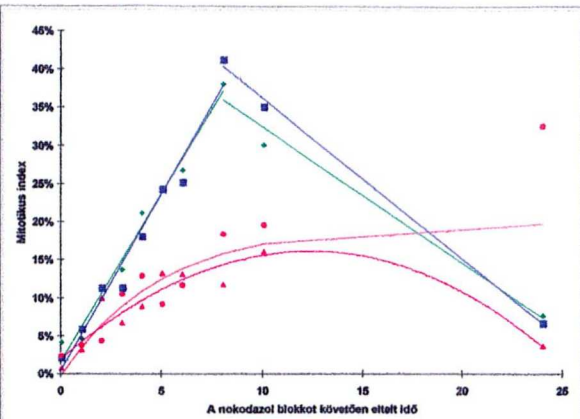
A CHO-K20 és CHO-K1 vonalak expressziós mintázatának összehasonlításával együtt ezeket a munkákat is Dr. Jayne Devlin végzi Coleraine-ben az általunk szintetizált cDNS-eken.

6.3.2. A 15-ös kromoszómás monoszomikus hibridek mitotikus ellenőrzőpontja helyreállt

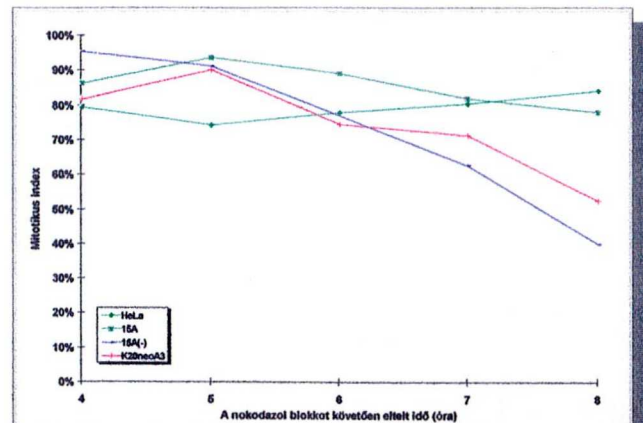
A 15A jelű monoszomikus hibrid sejtvonalt Tasset és mtsai állították elő, hogy a Prader-Willi szindróma genetikai térképezését megkönnyítsék {463}. Ez a sejt CHO-K1, míg egy másik, az A9+15 {683}, egér háttéren hordozza a 15-ös kromoszómát. Többféle módszerrel elvégzett vizsgálataink során a 15A vonalról egyértelműen bebizonyosodott, hogy mitotikus ellenőrzőpontja stabil.



6.3.2 ábra. A 11-es kromoszómás hibridsejtek korai kromoszómakondenzációjának összehasonlítása.



6.3.3 ábra. Ép és hibás mitotikus ellenőrzőponttal rendelkező sejtek mitotikus indexének alakulása 24 órás nokodazol kezelés során. Kék és zöld: két 15A szubklón; piros: CHO-K1; lila: 15(-) revertans vonal.



6.3.4 ábra. A 15A és a revertáns sejt vonalak mitotikus indexének alakulása egy másik módszerrel vizsgálva

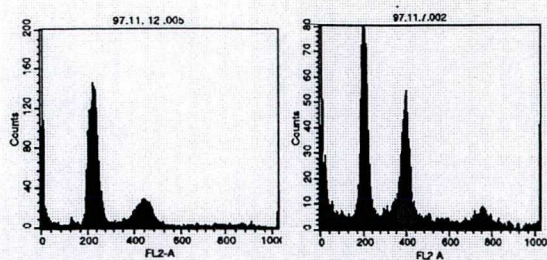
A 6.3.3-as ábrán látható kísérletben random sejt populációkat blokkoltunk nokodazollal. Az ép mitotikus ellenőrzőponttal rendelkező sejtek mintegy 8 óráig folyamatosan akkumulálódnak metafázisban, ezt követően azonban ők is kijönnek a blokkból. Mitotikus indexük karakterisztikus csúccsal jellemezhető. A hibás ellenőrzőpontú sejtek mitotikus indexében ez a jellegzetes csúcs nem mutatkozik. A sejtek csak mintegy 4 óráig blokkolhatók, ezt követően egy dinamikus egyensúlyi állapot mutatkozik, majd mintegy 8-10 óra múlva a mitotikus index lecsökken.

Egy másik fajta kísérleti elrendezésben 4 órás nokodazol blokkal előszinkronizált majd lerázott sejt populációt vizsgáltunk folytatódó nokodazol kezelés mellett. Az ép ellenőrzőpontú sejtek mitotikus indexe a vizsgált 8 óra folyamán csak minimálisan csökken le, míg a mitotikusan instabil sejteké mintegy 40-50 %-ra (6.3.4 ábra).

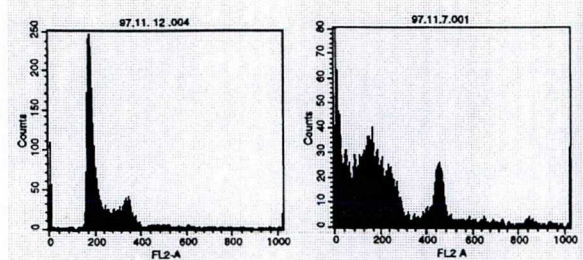
Hasonlóan jellegzetes különbségeket mutatnak az ép mitotikus ellenőrzőpontú és a mitotikusan instabil sejtek 72 órás kolcemid kezelést követően. Áramlási citometriával vizsgálva a 4C-nél nagyobb DNS tartalmú sejtek arányát a 6.3.6 - 6.3.9 ábrákon látható különbségek mutatkoznak. Az egyes ábrák baloldali paneljein a kezeletlen sejtek, a jobboldali panelokon a kolcemiddel 72 óra hosszat blokkolt sejtek hisztogramjai láthatók. A stabil sejtek (HeLa, primer egér fibroblaszt, 15A) a G₂/M fázisoknak megfelelő 4C DNS tartalmú csúcs dominanciáját mutatják (400 -as FL-2A értéknél). Az instabil sejteknél igen erőteljesen megjelenik a 8C DNS tartalmú csúcs, illetve, amennyiben a vízszintes tengely elég hosszú, a magasabb ploidiá fokoknak megfelelő csúcsok is. Érdeemes felfigyelni rá, hogy a primer egér fibroblaszt sejtek is mutatnak egy gyenge csúcsot 8C értéknél; ez jól korrelál a Kung és mtsai által közölt eredményekkel {505} (3.1.1 táblázat, 11. oldal). A HeLa sejtek kezelése során pedig igen nagy az apoptotikus sejtek aránya.

A többféle kísérleti elrendezésben kapott eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy a 15-ös humán kromoszóma olyan gént, vagy géneket hordoz, amelyek a mitotikus ellenőrzőpont transzformált rágszálósejtekre jellemző hibáját komplementálni képes(ek). Prof. C.S. Downes hasonló eredményekre jutott az A9+15 sejtrel is (személyes közlés).

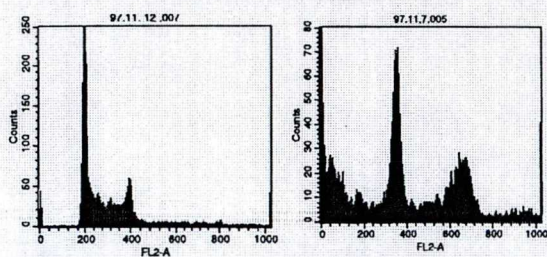
A 15-ös kromoszómára térképeződő mitotikus ellenőrzőpont gén igen nagy valószínűséggel a



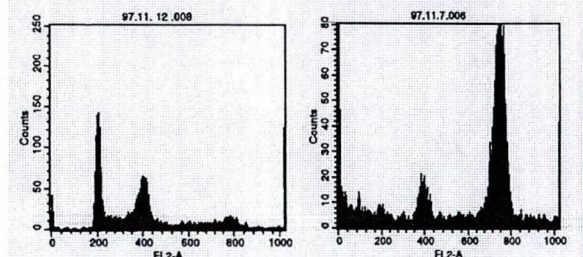
6.3.5 ábra. Primer egér fibroblaszt



6.3.6 ábra. HeLa



6.3.7 ábra. 15A



6.3.8 ábra. 15A(-) revertáns

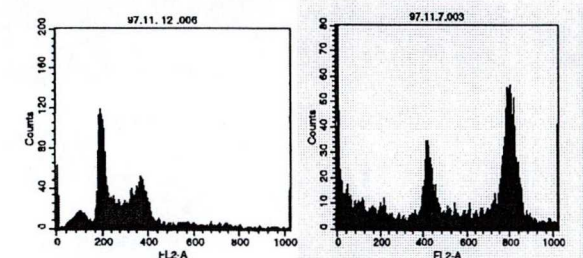
hBub1, amelyet nemrégiben klónoztak humán és egér sejtekből az élesztő Bub1-el mutatott homológiája alapján {705}. Mivel azonban élesztőben legalább hét, emlősökben pedig legalább nyolc, a mitotikus ellenőrzőpont ban részt vevő gént azonosítottak eddig (és a kétféle szervezetből származó gének sem minden esetben egymás megfelelői) jó esélyünk van arra, hogy a 15-ös kromoszómán más ellenőrzőpont gént is találjunk.

6.3.3. Kísérletek a mitotikus ellenőrzőpont helyreállításáért felelős, 15-ös kromoszómás gén izolálására

6.3.3.1. CHO SEJTEK TRANSZFEKCIÓJA 15-ÖS KROMOSZÓMA SPECIFIKUS λ GÉNKÖNYVTÁRRAL

A mitotikus ellenőrzőpont helyreállítását okozó 15-ös kromoszómás gén azonosítására a legkézenfekvőbb megoldásnak ígérkezett a mitotikusan instabil CHO sejtek 15-ös kromoszóma specifikus klóntárral való transzfekeciója, majd a stabil sejtek szelekciója. Munkánk kezdetekor nem találtunk 15-ös kromoszóma specifikus YAC, kozmid vagy BAC klóntárat, λ klóntárat viszont igen. Ennek nagy előnye az előbbiekkal szemben az, hogy egyszerűbb vele a munka, viszont igen nagy hátránya, hogy a λ fágok által hordozott fragment hossza limitált, bár ha a gén nem túl nagy, jó esély van rá, hogy egy λ inszertre reguláló elemeivel együtt ráfér.

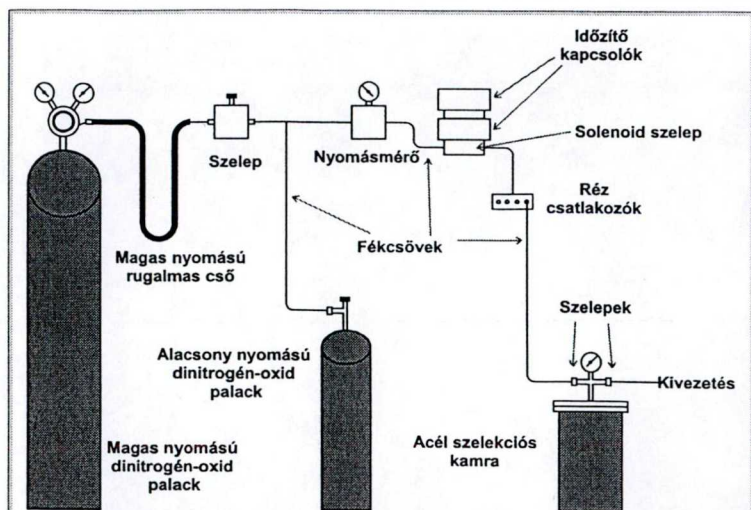
A 15-ös kromoszómára specifikus λ genomialis klóntárat (LL15NS01) az ATCC lerakatból szereztük be. A klóntárból lemezliátum módszerrel preparáltunk DNS-t és CHO-K1 sejteket transzfekektáltunk *neo* rezisztencia markert hordozó plazmid kotranszfekecióval, kalcium foszfát koprecipitációs módszerrel. A transzfekecióhoz 20 μ g λ és 2 μ g pRc/RSV DNS-t használtunk. A λ DNS és a plazmid DNS arányát úgy választottuk meg, hogy a rezisztens transzfekektánsok nagy valószínűséggel hordozzanak λ DNS-t is.



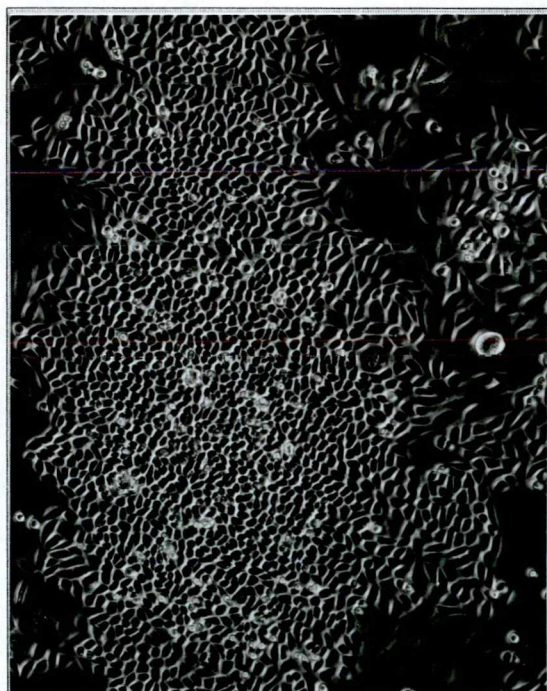
6.3.9 ábra. CHO-K1

A transzfecciót követő harmadik napon 400 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációjú G418 antibiotikummal szelektáltuk a sejteket, majd a rezisztens sejteket összetripszinezve *pooloztuk*. A mitotikus ellenőrzőpont épségére automatizált dinitrogén-oxidos szelekción kamrában szelektáltunk (6.3.10 ábra) {541}. A szelekció 8 órás blokk (80 PSI nyomású N_2O) és 4 órás szünet 10-szeri ismétlésével történt. A magas nyomású N_2O gáznak hasonló mikrotubulus destabilizáló hatása van, mint a kolcemidnek vagy nokodazolnak, hatásmechanizmusa azonban ismeretlen. A drogokkal szemben rendkívül nagy előnye, hogy a gáz óvatos kieresztésével könnyen revertálható, míg a drogokat a tápoldat cseréjével és a sejtek lemosásával lehet csak eltávolítani, ami a mitózishoz felkerekedett sejtek miatt különösen problematikus. A szelekció során így a magas nyomású kamrában a sejtek végig bent maradhatnak.

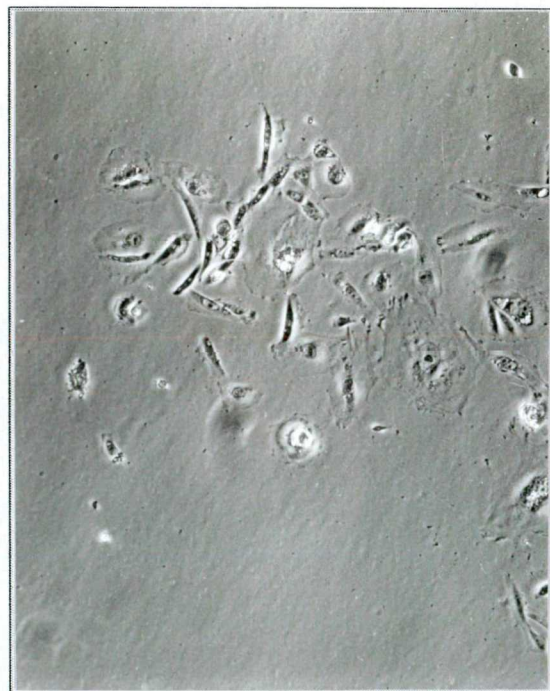
Az ép mitotikus ellenőrzőponttal rendelkező sejtek ciklusa a 8 órás N_2O kezelés alatt metafázisban leáll, az ezt követő 4 óra szünet alatt be tudják fejezni a mitózist, és újra tudják kezdeni a sejtciklust. A 10 szelekción ciklus után egészséges sejtpopulációt illetve kolóniákat kapunk (6.3.11 ábra). A mitotikusan



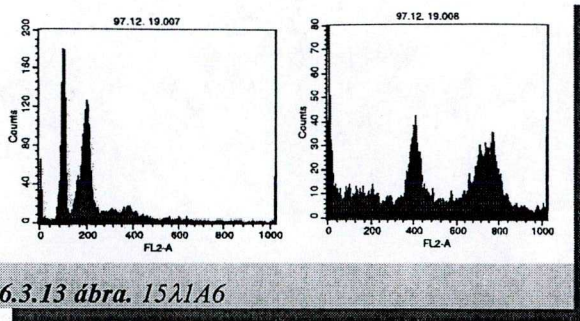
6.3.10 ábra. Az automatizált magasnyomású dinitrogén-oxidos szelekción rendszer felépítése {541}.



6.3.11 ábra. A dinitrogén-oxidos szelekciónból kikerült, 15A sejtek egészséges képet mutatnak. Fáziskontraszt mikroszkópos felvétel, 10 X objektív.



6.3.12 ábra. A dinitrogén-oxidos szelekciónból kikerült multimikronukleált, pusztuló CHO-K1 sejtek. Fáziskontraszt mikroszkópos felvétel, 10 X objektív.



6.3.13 ábra. 15 λ 1A6

instabil sejtek viszont 4 órás metafázisos blokk után abortív mitózissal - az anafázis, telofázis és citokinézis kihagyásával - kilépnek a blokkból, aminek az eredménye poliploid, multimikronukleált sejtekből álló populáció (6.3.12 ábra). Ezek a sejtek is lehetnek látszólag egészségesek, azonban tovább tenyésztve már nemigen képesek osztódni és előbb-utóbb elpusztulnak (6.3.14 ábra). A szelekció azonban nem 100 %-os, azok a sejtek, amelyeknek a ciklusa együtt "ketyeg" a szelekció ütemével, túlélhetnek.

Mivel a transzfekciót és a szelekciót Cambridge-i tanulmányutam végén csináltam, és nem maradt már idő klónok izolálására, a szelekciót túlélte sejteket összetripszinezve és lefagyasztva hoztam haza. A szegedi laboratóriumban nagy hígításban kilemezelve kolóniákat izoláltunk belőlük. Az izolált klónokat többféle módszerrel (5.3.4, 5.3.5 és 5.3.6) teszteltük a mitotikus ellenőrzőpont épségére. Az izolált 48 klónban az 5.3.4 és 5.3.5 módszerek szerint találtunk egy klónt, a 15 λ 1A6 jelűt, ami pozitívnak mutatkozott. Az áramlási citometriás (5.3.6) módszerrel azonban kiderült ennek fals pozitivitása (6.3.13 ábra).

Ekkor ismét leteszteltük az izolált 48 klónt az áramlási citometriás módszerrel is. 9 mitotikusan stabil klónt kaptunk. A 9 klónból ezután genomiális DNS-t preparáltunk, és Southern blotban visszaellenőriztük, hogy valóban tartalmaznak-e humán illetve λ fág DNS-t. Sajnos mind humán ALU, mind pedig λ próbával negatívnak bizonyultak. A mitotikus ellenőrzőpont helyreállítását okozó 15-ös kromoszómás gén izolálásának ezen útja sajnos kudarcot vallott.

6.3.3.2. A MITOTIKUS ELLENŐRZŐPONT GÉN FINOMABB TÉRKÉPEZÉSE RADIÁCIÓS HIBRIDSEJTEKKEL

A klóntár transzfekciójával vallott kudarc után a 15-ös kromoszómás gén finomabb térképezését kezdtük el radiációs hibridekkel. Ahhoz, hogy a radiációs hibridekben a 15-ös kromoszóma fragmentumainak jelenlétére szelektálni tudjunk, valamilyen rezisztencia markert kellett rávinnünk a 15-ös kromoszómára úgy, hogy a sejtpopuláció szintjén a *neo* gén inszerciói a kromoszómán többé-kevésbé egyenletesen legyenek elosztatva. Ehhez Waldren és mtsai. {599} módszerét használtuk, mely azon alapul, hogy humán repetitív szekvenciát hordozó DNS fragmentumok nagy feleslegben történő kotranszfekciója az integrációs esemény humán kromoszómán történő bekövetkeztének valószínűségét jelentősen mege-meli.

A transzfekcióhoz humán ALU *repeat*-et hordozó fragmentumot és a pRC/RSV vektorból (6.2.1 ábra)



6.3.14 ábra. A szelekciót látszólag egészségesen túlélő CHO-K1 sejtek sem képesek normálisan osztódni. Fáziskontraszt mikroszkópos felvétel, 10 X objektív

EcoRI és BamHI kettős emésztéssel kivágott *neo* kazettát használtuk. A transzfektáló DNS keverékben az ALU fragmentum 12-szeres moláris feleslegben volt jelen a *neo* kazettához képest, a DNS összmenyisége 5.5 µg volt. A DNS konstrukciókat elektroporációval juttattuk be a 15A sejtekbe. A G418 szelekciót a szokott módon, a második napon kezdtük meg. A túlélő G418 rezisztens sejteket ezután 1200 Rad γ sugárzásnak vetettük alá. Ilyen dózis mellett a kromoszómák összetöredeznek, és a sejtek elpusztulnak. A besugárzott sejteket ezután kétfelé osztottuk. Egyik felüket Sendai vírus mediált fúzióval CHO-K1 sejtekkel, másik felüket egy 6-tioguanin rezisztens CHO szubklón (T₄ {1513}) sejtjeivel fúzionáltattuk.

A fúzionáltatott CHO háttérű sejteket G418-ra, a T₄ háttérű sejteket pedig 6-tioguaninra és G418-ra szelektáltuk. A CHO hibridek közül elég sok, a T₄ hibridek közül viszont csak néhány rezisztens kolóniát kaptunk, ami arra utal, hogy a γ besugárzás során alkalmazott dózis alacsonyabb volt a sejtek elpusztításához szükségesnél (valószínűleg valamely metodikai hiba folytán nem kapták meg ténylegesen az 1200 Rad dózist). A CHO hibridekben a G418 rezisztens sejtek magas aránya a γ sugárzást túlélőkből adódhatott. Ezt erősíti meg a kettős rezisztens sejtek igen alacsony száma is.

Ezek a kísérletek jelenleg ebben a fázisban vannak, és a következőképpen fogjuk őket folytatni:

- A 15-ös kromoszómára irányított transzfekeciót Kpn *repeat*-tel is megismételjük.
- A G418 rezisztens sejteket magasabb γ dózissal sugarazzuk be, hogy biztos legyen a kromoszómák fragmentálódása és a sejtek pusztulása.
- A fúziós partner minden esetben a 6-tioguanin rezisztens T₄ lesz, mert ez lehetővé teszi az esetlegesen túlélő donor sejtek (6-tioguanin szenzitív) és a 15A-ból kromoszómát nem hordozó T₄ recipiensek együttes kisselektálását.
- A kettős rezisztens fúziós sejteket az automatizált dinitrogén-oxidos szelekciós rendszerben szelektáljuk a mitotikus ellenőrzőpont épségére.
- A mitotikusan stabil sejteket többféle módszerrel teszteljük
- A bizonyosan stabil sejteket ezután citológiaiilag vizsgáljuk tovább, hogy megállapítsuk a mitotikus ellenőrzőpont gén pozícióját.

7. Diszkusszió

A sejtciklus ellenőrzőpontoknak a rágszálósejtek malignus transzformációjával párhuzamosan történő elvesztése elég régen ismert tény, mint ahogy az is, hogy a transzformált humán sejtek nagy részének mitotikus ellenőrző pontjai épek (3.1.1 táblázat) {505}. Munkánk során a kínaihörccsög ováriumsejtek transzformált fenotípusából, és sejtciklus ellenőrzőpontjainak hibás voltából indultunk ki, és a szomatikus sejtgenetika eszközeivel próbáltuk a hibás ellenőrző pontok működését befolyásolni, valamint az abban részt vevő géneket azonosítani.

7.1. GÉNEXPRESSZIÓS KÜLÖNBSÉGEK TUMORIGENIKUS ÉS REVERZ TRANSZFORMÁLT CHO SEJTEK KÖZÖTT

A CHO sejtek transzformált fenotípusának dibutiril-ciklikus AMP és tesztoszteron kezelés hatására bekövetkező reverziója együtt jár legalább két - az S fázisos és a reiniciációs - ellenőrzőpont működésének helyreállításával. Úgy gondoljuk, hogy a sejtciklus ellenőrzőpont helyreállt működése a génexpresszió normál sejtekre jellemző visszaállásának következménye, ezért a tumorigenikus és reverz transzformált sejtek génexpressziójában mutatkozó különbségek feltárása elvezethet a sejtciklus ellenőrző pont gének azonosításához is.

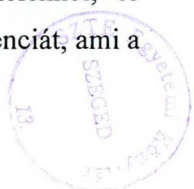
Munkánk során a kétféle transzformáltsági állapot közötti génexpressziós különbségeket részleges *differential display* módszerrel követtük. Nem törekedtünk arra, hogy olyan géneket azonosítsunk, melyek expressziója teljes mértékben represszálódik vagy indukálódik a reverz transzformáció során. Ezt annál is inkább nem várhatjuk, mivel a reverz transzformáció sejtciklus állapot függő, illetve a sejtpopuláció szintjén sohasem 100 %-os, mindig vannak a kultúrában olyan sejtek, amelyek a kezelésre nem reagálnak. Ezért az igen/nem válaszok helyett a statisztikailag szignifikáns változásokra koncentráltunk.

A részleges *differential display* során a lehetséges 80 5' primerből 17-et próbáltunk végig, és eddig az ígéretes cDNS fragmentumok mintegy 56 %-át teszteltük le Northern blott kísérletekben. Ha az eddig leírt 4 gén a reverz transzformáció során megváltozott expressziót mutató összes gén véletlenszerűen adódott reprezentánsa, az összes expressziót váltó gén számát mintegy 40-45 -re becsülhetjük. A korábban esetleg más sejtekből leírt génexpressziós változásokat még nem sikerült detektálnunk.

7.1.1. NADH-ubikinon-oxidoreduktáz 4-es lánc

A négy megváltozott expressziót mutató gén közül a NADH-ubikinon-oxidoreduktáz 4-es lánc génjének emelkedett kifejeződése várható következménye a reverz transzformációnak; a reverz transzformált sejtek anyagcseréje is a normál sejtekéhez hasonlít, amennyiben az aerob glükolízissel szemben az oxidatív foszforilációt részesítik előnyben {780}. A malignus transzformációval összefüggő mitokondriális génkifejeződés-beli változásokra mások is felfigyeltek {766, 762} (3.2.9 fejezet, 19. oldal).

Az R4A szekvencia, és az a mód ahogy izoláltuk, felkeltette Alan M. Diamond professzor (University of Illinois, Chicago) figyelmét. Ők CHO sejteket kezeltek nagyon alacsony dózisu szelénnel, és szubtraktiós hibridizaciós módszerrel kapták meg ugyanezt a gént, valamint egy másik szekvenciát, ami a



mitochondriális ATPáz kódolja. A szelén állatmodellekben hatékonyan bizonyult transzformált sejtek szaporodásának gátlásában (A.D.Diamond személyes közlése).

7.1.2. 40S riboszómális alegység S18-as fehérje

A 40S riboszómális alegység S18-as fehérjéjének csökkenése magyarázható a fehérjeszintézis általános intenzitáscsökkenésével, bár egyes riboszómális fehérjék jelentős szereppel bírnak a transláció malignus transzformációval is összefüggő szabályozásában. Korai trofoblasztokban, amelyek sok tulajdonságukban a transzformált sejtekre hasonlítanak, az S18 fehérje magas expresszióját mutatták ki {488}, hasonlóan egyes prosztatarák sejtekhez {1440}. Az S18-as fehérje reverz transzformáció során bekövetkező csökkenése jól egybevághat ezekkel az eredményekkel.

Egyes riboszómális fehérjék malignus transzformációval összefüggő expressziós változását mások is megfigyelték. Az MTA SZBK Genetikai Intézetében Kiss István és munkacsoportja egy tumorszuppresszorokra célzott szűrés során az *ecetmuslica* S21-as riboszómális fehérje génjének mutációját figyelték meg lárvális tumorokban {1514}. E fehérjék tumorigenezissel való kapcsolatára utalhat az is, hogy egyes kis riboszómális fehérjéknek szerepe van regulátorfehérjék translációjának szabályozásában.

7.1.3. Monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1)

A monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1) transzkript mennyiségének reverz transzformáció során bekövetkező csökkenése azonban meglepő. A makrofág infiltráció a gazdaszervezet tumor elleni védekezésének jelentős bástyája. Immunszuppresszált egerekbe oltott egyes humán tumorsejtek nagyobb, mások kisebb mennyiségű MCP-1-et szintetizálnak. A magasabb szinten expresszáló sejtekből növekedő tumort sokkal hamarabb elárasztják a makrofágok, és a tumornövekedés sebessége is sokkal alacsonyabb. A tumorban infiltrálódó makrofágok száma és a tumor mérete általában fordítottan aránylik egymáshoz {1498}. Hasonlóképpen, egyes glioblasztómákban a MCP-1 expressziójának szintje és a tumor-asszociált makrofágok mennyisége egymással arányban áll {1499}. Egyes rendkívül rosszindulatú tumorokban azonban az immunválaszt szuppresszáló makrofágok száma meghaladhatja a tumorsejtek számát, ezáltal nemhogy azok pusztulását okozzák, hanem a daganat méretének növeléséhez közvetve és közvetlenül is hozzájárulnak.

Mindezek alapján e kemokin génjének expresszióváltozása nehezen értelmezhető. Egy lehetséges, de mindenképpen vitatható magyarázat szerint, az MCP-1 jelenléte a tumorigenikus CHO-K1 sejtekben kifejezetten előnytelen, öngyilkos szignál *in vivo*, amivel azonban a szervezet védekezik transzformálódott sejtjei ellen. Mivel a sejt malignitása megszűnik a reverz transzformáció során az MCP-1 expressziója szükségtelenné válik.

7.1.4. p27^{BBP/eIF6}

Az R7A által reprezentált mRNS szint reverz transzformáció során bekövetkező változásának interpretációja azonban meglehetősen nehéz. Az mRNS terméke egy 27 kDa fehérje, amely legalább két, egymástól meglehetősen távol álló funkciót tölt be. A p27^{BBP/eIF6} fehérje homológjai rendkívül széles körben elterjedtek (humán, *Saccharomyces*, *Caenorhabditis*, *Arabidopsis*, *Methanococcus jannaschii*, *S.*

acidocalcarius, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *P. bomkoshii*, *Archaeoglobus fulgidus* Archaeobacteriumok) és igen erősen konzerváltak {1487}. A fehérje eukarióta sejtekben a nukleoluszban lokalizálódik, és a mitózis során a nukleolusz felbomlásával párhuzamosan jellegzetes eloszlása megváltozik. A 60S riboszómális alegység biogenezisében lehet életfontosságú szerepe, élesztő nullmutánsai életképtelenek. Ugyanakkor - azzal ellentétben mint először közölték {734} - nem funkcionál transzlációs iniciációs faktorként, hanem a szabad 60S riboszómális alegység citoplazmatikus *pool*-jának fenntartását biztosítja {1488}.

Evolúciósan konzervált funkciója mellett epiteliális eredetű sejtvonalakban egészen másféle funkcióra tett szert. A p27^{BBP/eIF6} fehérje a $\beta 4$ integrinek expresszálo sejtekben szorosan asszociálódik az intermediate filament citoskeletonnal, a hemidezmoszómákban pedig sajtcikkely szerű eloszlása tökéletesen fedésben van a $\beta 4$ integrinnel {1487}, melynek citoplazmatikus doménjével való szoros és specifikus kötődése alapján először klónozták {735}. Az epiteliális sejtekben talán az intermediate filament citoskeleton hemidezmoszómákhoz történő kapcsolásában lehet szerepe.

A kép ezzel még korántsem teljes, ugyanis megváltozott expresszióját leírták allergiás reakcióra stimulált masztocitákban is {1490, 1491}, ahol emelkedett expressziója a fehérjeszintézis emelkedésének előidézője, vagy következménye. Ez utóbbi megfigyelés ugyanakkor ellentétes azzal, hogy a 60S riboszómális alegység szabad formájának fenntartásában lenne szerepe, legalábbis masztocitákban. A reverz transzformáció során némiképp csökkenő fehérjeszintézis intenzitással ugyanakkor összeegyeztethető.

Sokkal jobban illik azonban a reverz transzformációról alkotott képbe, hogy a p27^{BBP/eIF6} fehérje szintjének emelkedése a dezmoszómák számának valamint működésük hatékonyságának reverz transzformáció során bekövetkező emelkedésével függene össze, hozzájárulva ezzel a sejt-sejt és sejt-mátrix közötti kapcsolatok helyreállításához, a kontakt gátlás visszaállításához {630, 617, 514}. Mi több, a *mec* fenotípusú BHK PyY sejtekben Bt₂cAMP kezelés során, a metabolikus kooperáció helyreállításával párhuzamosan egy 27.5 kDa fehérje mennyisége megemelkedik {616}, az azonban nem ismert, hogy ez azonos lenne-e a p27^{BBP/eIF6} fehérjével.

7.1.5. *Krit1*

A *krit1* mRNS szintjének emelkedése valószínűsíthetően nem csak következménye, hanem oka is a reverz transzformációnak. Erre vonatkozólag egyelőre csak irodalmi adatok állnak rendelkezésünkre, de már folyamatban van a teljes hosszúságú cDNS klón klóntárból való izolálása.

A *Krit1* fehérje C terminális doménje közvetítésével erős és specifikus interakcióba lép a *ras* családba tartozó *Krev1/Rap1a* GTPáz fehérjével. N terminális ankyrin ismétlődései más fehérjékkel való kölcsönhatásait is valószínűsítik. Az előbbieken kívül egy centrálisan elhelyezkedő transzmembrán domén jelenléte valószínűsíthető benne.. Szerkezetéből adódóan valószínűleg a *Krev1/Rap1a* fehérje lokalizációjáért felelős. A *Krev1/Rap1a* fehérje antagonizál a *v-Ki-ras* onkogénikus aktivitásával NIH/3T3 sejtekben {771}, a polióma nagy T antigénnel Rat-3 sejtekben {770}, a humán prosztaták {761} és hörcsög pankreatikus adenokarcinóma sejtek {772} transzformációjával, és etil-karbamát indukált tüdő adenómákkal transzgenikus egérben {765}, viszont hatástalan a *ras* transzformált HT1080, EJ30 és SW48 sejtekben {775}. A *Krev1/Rap1a* nem lép közvetlen kapcsolatba a p21^{ras} fehérjével,

lokalizációjuk is eltér: a Krev1/Rap1a az intracelluláris membránokban lokalizálódik, míg a p21^{ras} a plazmamembránban {760}. Hatása abban nyilvánul meg, hogy kompetál a p21^{ras} -al a GAP stimulator fehérjéhez {767}, a Ral-GDS {778, 776} és Raf1 {769, 776} *downstream* effektor fehérjékhez való kötődésben. A Krev1/Rap1a fehérjéről a fenti eredmények azt sugallják, hogy maga is tumorszupresszor, de erről a vélemények megoszlanak {700, 779}.

A reverz transzformáció eképp befolyásolhatja a p21^{ras} funkciókat CHO-K1 -ben azért, hogy megemelve a Krit1 fehérje mennyiségét az köti és aktiválja a Krev1/Rap1a fehérjét. A reverz transzformáció közvetlenül is hatással lehet a Krev1/Rap1a fehérjére, mert a PKA foszforilációs szubsztrátja és a foszforiláció következtében aktiválódik is {766}. A cAMP a Raf szignáltranszdukciós út p21^{ras} általi beindítását is gátolja {764}.

A *krit1* gén fluoreszcens *in situ* hibridizációval a 7q21-q22 régióba térképeződik, ami a 7q21-ből származó HTG szekvenciahomológia kísérletes megerősítése. 7-es kromoszómás monoszómiák és a 7q22-es régió deléciója karakterisztikus olyan rákos esetekben, ahol a Ras hiperaktív, vagy a *ras-GAP NFI* gén mutációt szenvedett. Ez arra utal, hogy a 7q22-es lókusztumor szupresszor gént hordoz {773}. Munkánk során mi mutattuk ki először, hogy a *krit1* gén expressziója megemelkedik reverz transzformáció során, ezzel jelezve, hogy a 7q22-es régióba térképeződő tumor szupresszor talán a *krit1* {1436}.

A reverz transzformációval párhuzamos génextpressziós változások felderítésével kapcsolatos munkánk azonban még csak leíró stádiumában van. Ok - okozati összefüggéseket egyelőre csak az irodalmi adatok ismeretében tehetünk. Ennek alapján a *krit1* gén terméke szerepel nagy valószínűséggel a transzformációs folyamatban illetve annak reverziójában kiváltóként, míg a több géntermék inkább következményként. A kérdésre kísérletes választ a teljes hosszúságú cDNS izolálásával és a sejtben való indukálható kifejeztetésével próbáljuk megadni.

7.2. ONKOGÉNEK TÚLTERMELTETÉSÉNEK HATÁSA A SEJTCIKLUS ELLENŐRZŐPONTOK MŰKÖDÉSÉRE

Ha a reverz transzformáció során a CHO sejtek morfológiáját és fiziológiáját a normális állapot felé eltolva a sejtciklus szabályozás jónéhány lépcsőjének működése helyreáll, várható, hogy "még transzformáltabbá" téve őket sejtciklusuk ellenőrző pontjait befolyásolni tudjuk. E kérdésre az onkogének három csoportját (szignál transzdukciós, transzkripciós faktor és extracelluláris növekedési faktor típusú {1486}) reprezentáló onkogén túltermeltetésével kerestünk választ.

A Jun túltermeltetése sem az S sem az M fázisos ellenőrzőpont működésére nem volt hatással. A *src* és *wnt1* onkogének viszont befolyásolták az S fázisos-t, az M fázisos ellenőrző pontot viszont nem.

A *src* kináz család fehérjeinek aktivitása szükséges a normál mitózishoz. Mind a Src mind a Fyn és Yes aktiválódik a G₂/M átmenet során. Specifikus antitesttel *in vivo* blokkolva mindhárom kináz aktivitását a sejtek mintegy 75 %-a G₂ fázisban blokkolódik. A funkció redundáns, a három kináz közül bármelyik aktivitása elegendő ellátásához {1438}. A pp60^{src} kináz a mitózis során a p34^{cdc2} foszforilációs szubsztrátja. A Csk által foszforilált, inaktív pp60^{src} a p34^{cdc2} általi foszforiláció következtében

aktiválódik {1437}. Ennek alapján tehát nem meglepő, hogy a Src deregulált expressziója a CHO sejtek egyébként is zilált S fázisos ellenőrző pontjának működését még tovább rontja. A hatás mechanizmusának felderítése és a benne szereplő faktorok azonosítása azonban jövőbeli kutatómunkáknak izgalmas útját jelöli ki.

A Wnt1 ellentétes hatása már inkább meglepő. A *wnt* géncsalád tagjai az egyedfejlődés számos aspektusában szerepet játszanak {1439}, és úgy tűnik, hogy a CHO sejtekben normálisan nem expresszáldó *wnt1* onkogén az S fázisos ellenőrzőpont integritását egy differenciáltabb állapot felé tolja el anélkül, hogy a sejtek morfológiáját befolyásolná. Tervezett kísérleteink itt is a hatás mechanizmusának felderítését szolgálják, legelőször arra vonatkozólag, hogy a CHO sejtek felszínén jelen van-e a Wnt1 receptora.

7.3. A CHO SEJTEK "HUMANIZÁLÁSA"

A transzformált rágcslósejtek és a humán sejtek sejtciklus ellenőrzőpont működéseinek összehasonlításából egyenesen adódik az a következtetés, hogy kell lennie a humán sejtekben olyan sejtciklus géneknek, amelyeket a tumoros elváltozás nem érint olyan mértékben, mint a rágcsló megfelelőjüket. A szomatikus sejtgenetika eszközeivel létrehozott monoszómikus hibridekben kimutattuk, hogy a 11-es kromoszóma jelenléte a CHO sejtek S fázisos, a 15-ös kromoszóma pedig az M fázisos ellenőrzőpont működését állítja helyre. Ezzel közelebb került a megfelelő humán gének izolálása.

A 15-ös kromoszómára specifikus λ genomiális klóntárral sajnos kudarcot vallottunk. Ennek többféle oka közül talán a legvalószínűbb az, hogy mitotikus ellenőrzőpont épségére kidolgozott tesztmódszereinkben a sejtek roppant érzékenyek apró hibákra. Ha nem megfelelően vannak tenyésztve a kísérlet előtt, a nokodazol blokkot követően lerázott sejtek sok beteg, felkerekedett - nem mitotikus - sejtet is tartalmaznak (5.3.4 fejezet 32. oldal). A 72 órás kolcemid blokk során nagyon sok mitotikusan instabil sejt ciklusa nem indul újra, 4C DNS tartalmuk miatt mitotikusan látszólag stabilak. Ez lehet toxikus hatás is, viszont lehet, hogy a reiniciációs ellenőrzőpont működésének eredménye (3.1.11 ábra), amelynek kísérletes megközelítése még várat magára.

Az onkogénekkal folytatott kísérleteink felhívják a figyelmet a 11-es kromoszómán elhelyezkedő Wilm's tumor gén esetleges szerepére is. Ezt a lehetséges szerepet még tovább valószínűsítik azok az eredmények, melyek szerint a 11-es kromoszómán legalább két, a kromoszóma két külön karján elhelyezkedő gén van, amely az S fázisos ellenőrzőpontot befolyásolja. Ezek egyike lehet maga a Wilm's tumor gén. Ez kísérletesen könnyen ellenőrizhető - és terveink között is szerepel - a gén tetraciklinnel vagy ekdizonnal indukálható expressziós klónjának transzfekciójával, és a transzfektánsok tesztelésével indukció mellett illetve -nélkül.

8. Összefoglalás

A rágsálósejtek malignus transzformációja és a sejtciklus szabályozás összefüggéseinek kutatása során végzett kísérleteink eredményeit a következőképpen foglalhatjuk össze:

1. Kimutattuk, hogy a tumorigenikus rágsálósejtek sejtciklus ellenőrzőpontjai közül legalább három a transzformációval párhuzamosan elveszik. A CHO sejtek kémiai reverz transzformációja során az S fázisos ellenőrzőpont és a reiniciációs ellenőrzőpont működése helyreáll, a mitotikus ellenőrzőpont azonban nem.
2. Feltételezve, hogy az elveszett ellenőrzőpontok reverz transzformáció során történő helyreállításában transzkripciós szabályozás is szerepet játszik, elkezdtük a tumorigenikus és reverz transzformált CHO sejtek génexpressziós különbségeinek összehasonlítását *differencial display* módszerrel. Részleges kísérleteink során kimutattuk, hogy a reverz transzformációval párhuzamosan a 40S riboszómális protein alegység S18-as fehérjét kódoló mRNS szintje csökken, valamint a mitokondriális NADH-ubiquinon oxidoreduktáz 4-es láncot, a monocita kemoattraktáns protein 1-et, az eukarióta iniciációs faktor 6 / p27^{BBP} -t, és a Krit1-et kódoló transzkriptumok mennyisége emelkedik {1436}.
3. A reverz transzformáció hatásával ellentétes változást reméltünk az onkogének három csoportját reprezentáló modell onkogének túltermeltetésétől. A *src* onkogén túltermeltetése valóban fokozta a hosszantartó DNS szintézis blokk és koffein kezelés hatására bekövetkező mitotikus katasztrófát. A koffeinnel nem kezelt, csak DNS szintézis blokk alatt tartott sejtekben a spontán keletkező PCC-k arányát is magasabbnak találtuk. A *wnt1* onkogén túltermeltetésével ugyanakkor az S fázisos ellenőrzőpontot olyan hatás éri, melynek következtében a mitotikus katasztrófát mutató sejtek aránya alacsonyabbá válik. A *jun* onkogén az S fázisos ellenőrzőpontra nincs hatással. A mitotikus ellenőrzőpontot és a reverz transzformálhatóságot azonban egyik onkogén deregulált kifejeztetése sem befolyásolja.
4. Humán / kínaihőrcsög szomatikus sejt hibridekkel sikerült az S és M fázisos ellenőrzőpontok működésében szerepet játszó géneket térképeznünk a 11-es (S) és a 15-ös (M) humán kromoszómákra. A 11-es kromoszómáról kimutattuk, hogy legalább két, az ellentétes karokon elhelyezkedő génről lehet szó, amelyek közül az egyik feltehetően a Wilm's tumor tumorszupresszor. A 15-ös kromoszómán elhelyezkedő gén finomabb térképezéséhez radiációs hibridek előállítását kezdtük el. Észak-írországi kollaborációs partnereinkkel közösen elkezdtük a 11-es kromoszómán elhelyezkedő gén molekuláris módszerekkel történő izolálását.

9. Idézet irodalom

- {140} Genetics Computer Group. (1991) Program Manual for the GCG Package, Version 7. 575 Science Drive. Madison, Wisconsin, USA 53711.
- {176} Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
- {263} Downes, C.S., Clarke, D.J., Mullinger, A.M. *et al.* (1994) *Nature*. **372(6505)**: 467-470.
- {324} Kao, F.-T. and Puck, T.T. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **60**: 1275-1281.
- {325} Puck, T.T., Waldren, C.A., Hsie, A.W. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **69**: 1943-1947.
- {345} Biedler, J.L. and Spengler, B.A. (1994) *Cancer Metastasis Rev.* **13**: 191-207.
- {355} Tigyi, G., Dyer, D.L., Miledi, R. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**: 1908-1912.
- {357} Haag, M.M., Krystosek, A., Arenson, E. *et al.* (1994) *Cancer Invest.* **12(1)**: 33-45.
- {360} Puck, T.T. and Krystosek, A. (1993) *Adv. Cancer Res.* **62**: 125-151.
- {362} Sadhu, D.N. and Ramos, K.S. (1993) *Experientia*. **49**: 567-570.
- {366} Trepel, J.B., Colamonici, O.R., Kelly, K. *et al.* (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2644-2648.
- {367} Downes, C.S., Musk, S.R.R., Watson, J.V. *et al.* (1990) *J. Cell Biol.* **110(6)**: 1855-1859.
- {368} Steinmann, K.E., Belinsky, G.S., Lee, D. *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**: 6843-6847.
- {369} Hsie, A.W. and Puck, T.T. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **68(2)**: 358-361.
- {386} Liang, P., Zhu, W., Zhang, X. *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**: 5763-5764.
- {392} Liang, P., Averboukh, L., Pardee, A.B. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**: 3269-3275.
- {394} Muratoglu, S., Bachrati, C., Malpeli, M. *et al.* (1995) *Eur. J. Cell Biol.* **68(4)**: 411-418.
- {437} Murray, A.W. (1995) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**: 5-11.
- {450} Lisitsyn, N., Lisitsyn, N., Wigler, M. (1993) *Science*. **259**: 946-951.
- {451} Milhaud, P.G., Davies, P.J.A., Pastan, I.H. *et al.* (1980) *Biochim. Biophys. Acta*. **630**: 476-484.
- {452} Schreiner, C., Fisher, M., Hussein, S. *et al.* (1991) *Cancer Res.* **51**: 1738-1740.
- {453} Shackelford, G.M., Willert, K., Wang, J. *et al.* (1993) *Neuron*. **11**: 865-875.
- {454} Rajaraman, R. and Faulkner, G. (1984) *Exp. Cell Res.* **154**: 342-356.
- {456} Ashall, F., Sullivan, N., Puck, T.T. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**: 3908-3912.
- {458} Felder, C.C., Ma, A.L., Conklin, B.R. (1989) *FEBS Lett.* **245(1,2)**: 75-79.
- {459} Sterner, J.M. and Leary, J.F. (1989) *Cell Biophys.* **15**: 159-171.
- {463} Tasset, D.M., Hartz, J.A., Kao, F.-T. (1988) *Am. J. Hum. Genet.* **42(6)**: 854-866.
- {464} Puck, T.T., Bartholdi, M., Krystosek, A. *et al.* (1991) *Somat. Cell Mol. Genet.* **17(5)**: 489-503.
- {472} Bunn, P.A., Dienhart, D.G., Chan, D.C. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 2162-2166.
- {473} Puck, T.T., Erikson, R.L., Meek, W.D. *et al.* (1981) *J. Cell. Physiol.* **107**: 399-412.
- {475} Miranti, C. and Puck, T.T. (1990) *Somat. Cell Mol. Genet.* **16(1)**: 67-78.
- {476} Gabrielson, E.G., Scoggin, C., Puck, T.T. (1982) *Exp. Cell Res.* **142**: 63-68.
- {477} Krystosek, A. and Puck, T.T. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 6560-6564.
- {478} Tagliaferri, P., Katsaros, D., Clair, T. *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* **263(1)**: 409-416.
- {479} Clair, T., Ally, S., Tagliaferri, P. *et al.* (1987) *FEBS Lett.* **224(2)**: 377-384.
- {485} Puck, T.T., Wuthier, P., Jones, C. *et al.* (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **68**: 3102-3106.
- {486} Elliott, G.C. and Johnson, R.T. (1983) *J. Cell Sci.* **60**: 267-288.

- {487} Elliott, G.C. and Johnson, R.T. (1985) *Mutation Res.* **145**: 185-194.
- {488} Chassin, D., Benifla, J.L., Delattre, C. *et al.* (1994) *Cancer Res.* **54**: 5217-5223.
- {489} Giacotti, F.G. and Ruoslahti, E. (1990) *Cell.* **60**: 849-859.
- {496} Su, Z.Z., Austin, V.N., Zimmer, S.G. *et al.* (1993) *Oncogene.* **8**: 1211-1219.
- {502} Estival, A., Robberecht, P., Fanjul, M. *et al.* (1996) *Biochem.J.* **315**: 619-624.
- {505} Kung, A.L., Sherwood, S.W., Schimke, R.T. (1990) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **87(24)**: 9553-9557.
- {506} Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd edn. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY.
- {510} Johnson, G.S., Friedman, R.M., Pastan, I.H. (1971) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **68(2)**: 425-429.
- {511} Gottesman, M.M., LeCam, A., Bukowski, M. *et al.* (1980) *Somat.Cell Genet.* **6(1)**: 45-61.
- {514} Wiener, E.C. and Loewenstein, W.R. (1983) *Nature.* **305**: 433-435.
- {515} Costa, M. (1978) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **81(3)**: 832-840.
- {516} Meloni, M., Perra, M., Costa, M. (1980) *Exp.Cell Res.* **126**: 465-469.
- {519} Wells, J.N. and Hardman, J.G. (1977) *Adv.Cyclic Nucleotide Res.* **8**: 119-143.
- {525} Wicks, W.D. (1969) *J.Biol.Chem.* **244(14)**: 3941-3950.
- {526} Beale, E.G., Hartley, J.L., Granner, D.K. (1982) *J.Biol.Chem.* **257(4)**: 2022-2028.
- {527} Chrapkiewicz, N.B., Beale, E.G., Granner, D.K. (1982) *J.Biol.Chem.* **257(23)**: 14428-14432.
- {529} Ernest, M.J. and Feigelson, P. (1978) *J.Biol.Chem.* **253(2)**: 319-322.
- {530} Firestone, G.L. and Heath, E.C. (1981) *J.Biol.Chem.* **256(3)**: 1396-1403.
- {531} Derda, D., Miles, M.F., Schweppe, J.S. *et al.* (1980) *J.Biol.Chem.* **255(23)**: 11112-11121.
- {532} Hsie, A.W., Jones, J., Puck, T.T. (1971) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **68(7)**: 1648-1652.
- {533} Nielson, S.E. and Puck, T.T. (1980) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **77(2)**: 985-989.
- {534} Kao, F.-T. and Puck, T.T. (1967) *Genetics.* **55(3)**: 513-524.
- {535} LeCam, A., Gottesman, M.M., Pastan, I.H. (1980) *J.Biol.Chem.* **255(17)**: 8103-8108.
- {536} Lichti, U. and Gottesman, M.M. (1982) *J.Cell.Physiol.* **113**: 433-439.
- {537} Ham, R.G. (1965) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **53**: 288-293.
- {538} Liang, P. and Pardee, A.B. (1992) *Science.* **257**: 967-971.
- {541} Downes, C.S., Unwin, D.M., Northfield, R.G.W. *et al.* (1987) *Anal.Biochem.* **165**: 56-58.
- {548} Tagliaferri, P., Clair, T., DeBortoli, M.E. *et al.* (1985) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **130(3)**: 1193-1200.
- {549} Puck, T.T., Krystosek, A., Chan, D.C. (1990) *Somat.Cell Mol.Genet.* **16(3)**: 257-265.
- {550} Puck, T.T. and Krystosek, A. (1992) *Int.Rev.Cytol.* **132**: 75-108.
- {553} Porter, K.R., Puck, T.T., Hsie, A.W. *et al.* (1974) *Cell.* **2**: 145-162.
- {554} Chan, D.C., Goate, A., Puck, T.T. (1989) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **86**: 2747-2751.
- {555} Schonberg, S., Patterson, D., Puck, T.T. (1983) *Exp.Cell Res.* **145**: 57-62.
- {556} Ashall, F. and Puck, T.T. (1984) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **81**: 5145-5149.
- {557} Beale, E.G., Katzen, C.S., Granner, D.K. (1981) *Biochemistry.* **20**: 4878-4883.
- {558} Tortora, G., Clair, T., Katsaros, D. *et al.* (1989) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **86**: 2849-2852.
- {560} Katsaros, D., Tortora, G., Tagliaferri, P. *et al.* (1987) *FEBS Lett.* **223(1)**: 97-103.
- {567} Kao, F.-T. and Puck, T.T. (1969) *J.Cell Physiol.* **74(3)**: 245-258.

- {568} Hartwell, L.H. and Weinert, T.A. (1989) *Science*. **246**: 629-634.
- {587} Green, H., Todaro, G.J., Goldberg, B. (1966) *Nature*. **209**: 916-917.
- {592} Abercrombie, M., Heaysman, J.E.M., Pegrum, S.M. (1970) *Exp.Cell Res.* **60**: 437-444.
- {593} Goldman, R.D. and Follett, E.A.C. (1969) *Exp.Cell Res.* **57**: 263-276.
- {594} Porter, K.R., Prescott, D., Frye, J. (1973) *J.Cell Biol.* **57**: 815-836.
- {595} Goldman, R.D. (1971) *J.Cell Biol.* **51**: 752-762.
- {597} Porter, K.R., Todaro, G.J., Fonte, V. (1973) *J.Cell Biol.* **59**: 633-642.
- {598} Waldren, C.A. and Raskó, I. (1978) *Radiation Research*. **73**: 95-110.
- {599} Waldren, C.A., Braaton, M., Vannais, D. *et al.* (1992) *Somat.Cell Mol.Genet.* **18(5)**: 417-422.
- {600} Johnson, G.S., Morgan, W.D., Pastan, I.H. (1972) *Nature*. **235**: 54-56.
- {602} Szabó, G., Damjanovich, S., Sümegi, J. *et al.* (1987) *Exp.Cell Res.* **169**: 158-168.
- {606} Huebner, K., Linnenbach, A., Weidner, S. *et al.* (1981) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **78(8)**: 5071-5075.
- {607} Law, M.L., Gao, J., Puck, T.T. (1989) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **86**: 8472-8476.
- {609} Krystosek, A. and Puck, T.T. (1989) *J.Cell Biol.* **109**: 231a
- {610} Puck, T.T. (1977) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **74(10)**: 4491-4495.
- {612} Hooper, M.L. and Parry, J.E. (1980) *Exp.Cell Res.* **128**: 461-466.
- {614} O'Neill, J.P., Schröder, C.H., Riddle, J.C. *et al.* (1976) *Exp.Cell Res.* **97**: 213-217.
- {616} Wright, E.D. and Marsden, H. (1976) *Exp.Cell Res.* **103**: 93-97.
- {617} Wright, E.D., Slack, C., Goldfarb, P.S.G. *et al.* (1976) *Exp.Cell Res.* **103**: 79-91.
- {625} Puck, T.T. (1984) *Adv.Viral Oncol.* **4**: 197-216.
- {626} Birckbichler, P.J., Orr, G.R., Conway, E. *et al.* (1977) *Cancer Res.* **37**: 1340-1344.
- {627} Guerrant, R.L., Brunton, L.L., Schnaitman, T.C. *et al.* (1974) *Infect.Immunity*. **10(2)**: 320-327.
- {630} Wright, E.D., Goldfarb, P.S.G., Subak-Sharpe, J.H. (1976) *Exp.Cell Res.* **103**: 63-77.
- {648} Steinberg, R.A. (1980) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **77(2)**: 910-914.
- {649} Patterson, D. and Waldren, C.A. (1973) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **50**: 566-572.
- {651} Lewis, E.J., Harrington, C.A., Chikaraishi, D.M. (1987) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **84**: 3550-3554.
- {654} Montminy, M.R., Sevarino, K.A., Wagner, J.A. *et al.* (1986) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **83**: 6682-6686.
- {656} Munnich, A., Marie, J., Reach, G. *et al.* (1984) *J.Biol.Chem.* **259**: 10228-10231.
- {665} Tjio, J.H. and Puck, T.T. (1958) *J.Exp.Med.* **108**: 259-268.
- {666} Bloom, G.S. and Lockwood, A.H. (1980) *J.Supramol.Struct.* **14**: 241-254.
- {667} LeCam, A., Nicholas, J.C., Singh, T.J. *et al.* (1981) *J.Biol.Chem.* **256(2)**: 933-941.
- {668} Hsie, A.W. and Waldren, C.A. (1970) *J.Cell Biol.* **47**: 92a
- {673} Woodhead, J.L., Fallon, R., Figueiredo, H., Langdale, J. and Malcolm, A.D.B. (1986) Alternative methods for gene diagnosis. *in* Human genetic diseases. A practical approach 1st. edn. *ed.* Davies, K.E. Ch. 4. pp.51-64. Oxford. IRL Press Limited. Practical Approach Series. Series eds. Rickwood, D. and Hames, B.D.
- {678} Masui, Y. and Markert, C.L. (1971) *Exp.Zool.* **177**: 129-145.
- {679} Rao, P.N. and Johnson, R.T. (1970) *Nature*. **225(5228)**: 159-164.
- {680} Johnson, R.T. and Rao, P.N. (1970) *Nature*. **226**: 717-722.

- {681} Downes, C.S., Tommasino, M., Bachrati, C. *et al.* (1998) *J.Cell Sci.* **In Press**.
- {682} Morgan, D.O. (1995) *Nature*. **374**: 131-134.
- {683} Ning, Y., Lovell, M., Taylor, L. *et al.* (1992) *Cytogenet.Cell Genet.* **60(1)**: 79-80.
- {699} Serebriiskii, I., Estojak, J., Sonoda, G. *et al.* (1997) *Oncogene*. **15(9)**: 1043-1049.
- {700} Bos, J.L., Franke, B., M'Rabet, L. *et al.* (1997) *FEBS Lett.* **410(1)**: 59-62.
- {701} Kondoh, N., Noda, M., Fisher, R.J. *et al.* (1996) *Biochim.Biophys.Acta.* **1313(1)**: 41-46.
- {705} Cahill, D.P., Lengauer, C., Yu, J. *et al.* (1998) *Nature*. **392(6673)**: 300-303.
- {734} Si, K., Chaudhuri, J., Chevesich, J. *et al.* (1997) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **94(26)**: 14285-14290.
- {735} Biffo, S., Sanvito, F., Costa, S. *et al.* (1997) *J.Biol.Chem.* **272(48)**: 30314-30321.
- {753} Miele, G., MacRae, L., McBride, D. *et al.* (1998) *BioTechniques*. **25(1)**: 138-144.
- {760} Beranger, F., Goud, B., Tavitian, A. *et al.* (1991) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **88(5)**: 1606-1610.
- {761} Burney, T.L., Rockove, S., Eiseman, J.L. *et al.* (1994) *Prostate*. **25(4)**: 177-188.
- {762} Capuano, F., Guerrieri, F., Papa, S. (1997) *J.Bioenerg.Biomembr.* **29(4)**: 379-384.
- {763} Clark, E.A. and Brugge, J.S. (1995) *Science*. **268(5208)**: 233-239.
- {764} Cook, S.J. and McCormick, F. (1993) *Science*. **262(5136)**: 1069-1072.
- {765} Damak, S., Harnboonsong, Y., George, P.M. *et al.* (1996) *Mol.Carcinog.* **17(2)**: 84-91.
- {766} Faure Vigny, H., Heddi, A., Giraud, S. *et al.* (1996) *Mol.Carcinog.* **16(3)**: 165-172.
- {767} Frech, M., John, J., Pizon, V. *et al.* (1990) *Science*. **249(4965)**: 169-171.
- {769} Hu, C.D., Kariya Ki, Kotani, G. *et al.* (1997) *J.Biol.Chem.* **272(18)**: 11702-11705.
- {770} Jelinek, M.A. and Hassell, J.A. (1992) *Oncogene*. **7(9)**: 1687-1698.
- {771} Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T. *et al.* (1989) *Cell*. **56(1)**: 77-84.
- {772} Leach, S.D., Berger, D.H., Davidson, B.S. *et al.* (1998) *Pancreas*. **16(4)**: 491-498.
- {773} Luna-Fineman, S., Shannon, K.M., Lange, B.J. (1995) *Blood*. **85(8)**: 1985-1999.
- {775} Sato, K.Y., Polakis, P.G., Haubruck, H. *et al.* (1994) *Cancer Res.* **54(2)**: 552-559.
- {776} Shirouzu, M., Morinaka, K., Koyama, S. *et al.* (1998) *J.Biol.Chem.* **273(13)**: 7737-7742.
- {778} Urano, T., Emkey, R., Feig, L.A. (1996) *EMBO J.* **15(4)**: 810-816.
- {779} Young, J., Searle, J., Stitz, R. *et al.* (1992) *Cancer Res.* **52(2)**: 285-289.
- {780} Warburg, O., Poesner, K., Negelein, E. (1924) *Biochem.Z.* **152**: 309-344.
- {846} Bachrati, C., Downes, C.S., Raskó, I. (1996) *Mol. Biol. Cell.* **7(SS)**: 1002
- {868} Kao, F.-T., Jones, C., Puck, T.T. (1976) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **73(1)**: 193-197.
- {913} Raskó, I., Georgieva, M., Farkas, G. *et al.* (1993) *Somat.Cell Mol.Genet.* **19(3)**: 245-255.
- {1003} Volpe, J.J. (1979) *J.Biol.Chem.* **254**: 2568-2571.
- {1004} Volpe, J.J. and Obert, K.A. (1981) *J.Biol.Chem.* **256**: 2016-2021.
- {1022} Puck, T.T. (1979) *Somat.Cell Genet.* **5(6)**: 973-990.
- {1025} Storrie, B. (1973) *J.Cell Biol.* **59(2 Pt 1)**: 471-479.
- {1026} Meek, W.D. (1982) *Mol.Cell.Biol.* **2(7)**: 863-874.
- {1039} Plantefaber, L.C. and Hynes, R.O. (1989) *Cell*. **56(2)**: 281-290.
- {1041} Murdoch, G.H. and Rosenfeld, M.G. (1982) *Science*. **218(4579)**: 1315-1317.
- {1068} Weinert, T. (1998) *Cell*. **94(5)**: 555-558.
- {1085} Cho-Chung, Y.S. (1980) *J.Cyclic.Nucleotide.Res.* **6(3)**: 163-177.

- {1093} Earle, W.R., Schilling, E.L., Stark, T.H. *et al.* (1943) *J.Natl.Cancer Inst.* **4**: 165
- {1102} Imada, M., Imada, S., Weiss, D. (1980) *Biochim.Biophys.Acta.* **632(1)**: 47-57.
- {1107} Willingham, M.C. and Pastan, I.H. (1974) *J.Cell Biol.* **63(1)**: 288-294.
- {1108} Van Veen, J., Noonan, K.D., Roberts, R.M. (1976) *Exp.Cell Res.* **103(2)**: 405-413.
- {1110} Bürk, R.R. (1968) *Nature.* **219**: 1272-1275.
- {1116} Masui, H., Reid, L.M., Glans, C. (1978) *Exp.Cell Res.* **117(1)**: 219-230.
- {1118} Deaven, L.L. and Petersen, D.F. (1973) *Chromosoma.* **41(2)**: 129-144.
- {1120} Costa, M., Gerner, E.W., Russell, D.H. (1976) *Biochim.Biophys.Acta.* **425(2)**: 246-255.
- {1121} Costa, M., Gerner, E.W., Russell, D.H. (1976) *J.Biol.Chem.* **251(11)**: 3313-3319.
- {1124} Johnson, E.M. and Allfrey, V.G. (1972) *Arch.Biochem.Biophys.* **152(2)**: 786-794.
- {1206} Sheppard, J.R. (1972) *Nat.New Biol.* **236(61)**: 14-16.
- {1207} Sheppard, J.R. (1971) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **68(6)**: 1316-1320.
- {1237} Jakab, K., Gárdián, G., Endreffy, E. *et al.* (1999) *Eur.Neurol.* **41(2)**: 107-110.
- {1270} Furmanski, P., Silverman, D.J., Lubin, M. (1971) *Nature.* **233(5319)**: 413-415.
- {1272} Kao, F., Chasin, L., Puck, T.T. (1969) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **64(4)**: 1284-1291.
- {1273} Cho-Chung, Y.S. and Gullino, P.M. (1974) *Science.* **183(120)**: 87-88.
- {1274} Bodwin, J.S., Clair, T., Cho-Chung, Y.S. (1978) *Cancer Res.* **38(10)**: 3410-3413.
- {1275} Huang, F.L. and Cho-Chung, Y.S. (1982) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **107(1)**: 411-415.
- {1292} Pollack, R., Osborn, M., Weber, K. (1975) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **72(3)**: 994-998.
- {1321} Ash, J.F., Vogt, P.K., Singer, S.J. (1976) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **73(10)**: 3603-3607.
- {1332} Edelman, G.M. and Yahara, I. (1976) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **73(6)**: 2047-2051.
- {1333} Erikson, R.L., Collett, M.S., Erikson, E. *et al.* (1979) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **76(12)**: 6260-6264.
- {1335} Hynes, R.O. and Destree, A.T. (1978) *Cell.* **13(1)**: 151-163.
- {1336} Kanje, M., Walum, E., Edstrom, A. (1979) *Z.Mikrosk.Anat.Forsch.* **93(3)**: 487-496.
- {1337} McClain, D.A., Maness, P.F., Edelman, G.M. (1978) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **75(6)**: 2750-2754.
- {1338} Osborn, M. and Weber, K. (1975) *J.Virol.* **15(3)**: 636-644.
- {1341} Vollet, J.J., Brugge, J.S., Noonan, C.A. *et al.* (1977) *Exp.Cell Res.* **105(1)**: 119-126.
- {1342} Wang, E. and Goldberg, A.R. (1976) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **73(11)**: 4065-4069.
- {1348} Gudewicz, T.M., Morhenn, V.B., Kellems, R.E. (1981) *J.Cell Physiol.* **108(1)**: 1-8.
- {1356} Roberts, R.M., Walker, A., Cetorelli, J.J. (1973) *Nat.New Biol.* **244(133)**: 86-89.
- {1359} Sudo, T. and Onodera, K. (1975) *Exp.Cell Res.* **91(1)**: 191-199.
- {1400} Coffino, P., Gray, J.W., Tomkins, G.M. (1975) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **72(3)**: 878-882.
- {1413} Kellems, R.E., Morhenn, V.B., Pfendt, E.A. *et al.* (1979) *J.Biol.Chem.* **254(2)**: 309-318.
- {1430} Puck, T.T., Cieciora, S.J., Robinson, A. (1958) *J.Exp.Med.* **108**: 945-956.
- {1436} Bachrati, C., Downes, C.S., Raskó, I. (1999) *Eur.J.Cell Biol.* **78**: 561-566.
- {1437} Stover, D.R., Liebetanz, J., Lydon, N.B. (1994) *J.Biol.Chem.* **269(43)**: 26885-26889.
- {1438} Roche, S., Fumagalli, S., Courtneidge, S.A. (1995) *Science.* **269(5230)**: 1567-1569.
- {1439} Adamson, M.C., Dennis, C., Delaney, S. *et al.* (1994) *Genomics.* **24(1)**: 9-13.
- {1440} Vaarala, M.H., Porvari, K.S., Kyllonen, A.P. *et al.* (1998) *Int.J.Cancer.* **78(1)**: 27-32.

- {1481} Augusti-Tocco, G. and Sato, G. (1969) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **64(1)**: 311-315.
- {1482} Schubert, D., Humphreys, S., Baroni, C. *et al.* (1969) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **64(1)**: 316-323.
- {1486} Hesketh, R. (1997) The oncogene and tumour suppressor gene factsbook. 2nd edn. *Factsbook Series*. Academic Press. San Diego, London.
- {1487} Sanvito, F., Piatti, S., Villa, A. *et al.* (1999) *J.Cell Biol.* **144(5)**: 823-838.
- {1488} Si, K. and Maitra, U. (1999) *Mol.Cell.Biol.* **19(2)**: 1416-1426.
- {1490} Cho, S.H., Cho, J.J., Kim, I.S. *et al.* (1998) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **252(1)**: 123-127.
- {1491} Cho, J.J., Vliagoftis, H., Rumsaeng, V. *et al.* (1998) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **242(1)**: 226-230.
- {1492} Deák, F., Piecha, D., Bachrati, C. *et al.* (1997) *J.Biol.Chem.* **272(14)**: 9268-9274.
- {1494} Alföldi, L. and Bachrati, C. (1993) *FEMS Microbiol.Rev.* **12(4)**: 315-324.
- {1496} Lee, S.W., Tomasetto, C., Sager, R. (1991) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **88(7)**: 2825-2829.
- {1497} Welsh, J., Chada, K., Dalal, S.S. *et al.* (1992) *Nucl.Acids Res.* **20(19)**: 4965-4970.
- {1498} Zhang, L., Khayat, A., Cheng, H. *et al.* (1997) *Lab.Invest.* **76(4)**: 579-590.
- {1499} Leung, S.Y., Wong, M.P., Chung, L.P. *et al.* (1997) *Acta Neuropathol.(Berl)*. **93(5)**: 518-527.
- {1500} Bachrati, C., Dozin, B., Cancedda, R. *et al.* (1994) *Cell Biol. Int.* **18** 587
- {1501} Muratoglu, S., Bachrati, C., Deák, F. *et al.* (1994) *Cell Biol. Int.* **18** 439
- {1502} Kiss-Tóth, E., Unk, I., Bachrati, C. *et al.* (1994) *J. Cell Biochem. Supplement* **18C** 48
- {1503} Bachrati, C., Downes, C.S., Raskó, I. (1996) *Cell Biol. Int.* **20** 227
- {1505} Bachrati, C., Somodi, Z., Endreffy, E. *et al.* (1998) *Ann.Hum.Genet.* **62(6)**: 511-520.
- {1506} Boddy, M.N., Furnari, B., Mondesert, O. *et al.* (1998) *Science*. **280(5365)**: 909-912.
- {1507} Ghosh, S., Schroeter, D., Paweletz, N. (1996) *Exp.Cell Res.* **227(1)**: 165-169.
- {1508} Alexandru, G., Zachariae, W., Schleiffer, A. *et al.* (1999) *EMBO J.* **18(10)**: 2707-2721.
- {1512} Bachrati, C.Z., Pocsai, G., Raskó, I. (1999) *Laryngoscope.* **109(6)**: 1011-1015.
- {1513} Raskó, I., Péter, S.L., Dallmann, L. *et al.* (1978) *Exp.Cell Res.* **113(2)**: 339-343.
- {1514} Török, I., Herrmann-Horle, D., Kiss, I. *et al.* (1999) *Mol.Cell.Biol.* **19(3)**: 2308-2321.
- {1515} Murray, A.W. and Kirschner, M.W. (1989) *Science*. **246(4930)**: 614-621.
- {1516} Nurse, P. (1994) *Cell.* **79(4)**: 547-550.
- {1517} Poon, R.Y.C., Jiang, W., Toyoshima, H. *et al.* (1996) *J.Biol.Chem.* **271(22)**: 13283-13291.
- {1518} Barth, H., Hoffmann, I., Kinzel, V. (1996) *Cancer Res.* **56(10)**: 2268-2272.
- {1519} O'Connell, M.J., Raleigh, J.M., Verkade, H.M. *et al.* (1997) *EMBO J.* **16(3)**: 545-554.
- {1520} Rhind, N., Furnari, B., Russell, P. (1997) *Genes Dev.* **11(4)**: 504-511.
- {1521} Jin, P., Gu, Y., Morgan, D.O. (1996) *J.Cell Biol.* **134(4)**: 963-970.
- {1522} Kao, G.D., McKenna, W.G., Maity, A. *et al.* (1997) *Cancer Res.* **57(4)**: 753-758.
- {1523} Yamashita, K., Yasuda, H., Pines, J. *et al.* (1990) *EMBO J.* **9(13)**: 4331-4338.
- {1524} Taylor, S.J., Anafi, M., Pawson, T. *et al.* (1995) *J.Biol.Chem.* **270(17)**: 10120-10124.

Függelék

10. Publikációs lista

10.1. KÖZLEMÉNYEK

- {1494} Alföldi,L., Bachrati,Cs. (1993) Genetic experiments with model populations: Fallacies in genetic analysis performed from samples of recombinants selected for two markers. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 315-324.
- {1500} Bachrati,Cs., Dozin,B., Cancedda,R. and Kiss,I. (1994) Expression of cartilage specific link protein and cartilage matrix protein genes in differentiating chondrocytes. *Cell Biol. Int.* **18**: 587. **Absztrakt.**
- {1501} Muratoglu,S., Bachrati,Cs., Deák,F., Kiss,I. (1994) Analysis of cartilage specific transcripts during chondrogenesis. *Cell Biol. Int.* **18**: 439. **Absztrakt.**
- {1502} Kiss-Tóth,E., Unk,I., Bachrati,Cs., Czibula,Á. (1994) Regulation of the bovine leukemia virus basal transcription. *J. Cell. Biochem. Supplement 18C*: 48. **Absztrakt.**
- {394} Muratoglu,S., Bachrati,Cs., Malpeli,M., Szabó,P., Neri,M., Dozin,B., Deák,F., Cancedda,R., Kiss,I. (1995) Expression of the cartilage matrix protein gene at different chondrocyte developmental stages. *Eur. J. Cell Biol.* **68**: 411-418.
- {1503} Bachrati,C.Z., Downes,C.S., Raskó,I. (1996) Cell cycle related differences of gene expression in malignant and reverse transformed CHO cells. *Cell Biol. Int.* **20**: 227. **Absztrakt.**
- {1504} Czibula,Á., Gerencsér,Á., Bachrati,C., Borda,S., Johnson,R.T., Raskó,I. (1996) Changes of DNA repair during *in vitro* cellular differentiation. *Cell Biol. Int.* **20**: 220. **Absztrakt.**
- {846} Bachrati, C.; Downes, C. S.and Raskó, I.(1996) Transformation state related alterations of gene expression in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Biol. Cell* **7**: 1002 **Absztrakt.**
- {1492} Deák,F., Piecha,D., Bachrati,C., Paulson,M., Kiss,I. (1997) Primary structure and expression of matrilin-2, the closest relative of cartilage matrix protein within the von Willebrand factor type A-like module superfamily. *J. Biol. Chem.* **272**: 9268-9274.
- {1505} Bachrati, C.Z., Somodi, Z., Endreffy, E., Kalmár, T., Raskó, I. (1998) Carrier detection by microsatellite analysis of Duchenne/Becker muscular dystrophy in Hungarian families. *Ann. Hum. Genet.* **62(6)**: 511-520.
- {1237} Jakab, K.; Gárdián, G.; Endreffy, E.; Kalmár, T.; Bachrati, C.; Vécsei, L., Raskó, I. (1999) Analysis of CAG Repeat Expansion in Huntington's Disease Gene (IT 15) in a Hungarian Population. *Eur. Neurol.* **41(2)**: 107-110.
- {681} Downes, C. S.; Tommasino, M.; Bachrati, C.; Cutts, T. J. R.; Devlin, S. J.; Watson, J. V.; Raskó, I.and Johnson, R. T. (1999) Slippage of cell cycle control in S-phase arrest accompanies rodent cell transformation and is opposed by purine deoxyribonucleosides. *J. Cell Sci.* **In Press**
- {1436} Csanád Z. Bachrati, C. Stephen Downes, and István Raskó (1999) Chemical Reverse Transformation of CHO-K1 Cells Induces Changes in Expression of Genes Not Previously Characterised as Transformation-Related. *Eur. J. Cell Biol.* **78**: 561-566.
- {1512} Bachrati, C.Z., Pocsai, G and Raskó, I. (1999) RET/PTC fusion gene products in patients suffering from thyroid carcinomas. *Laryngoscope* **109**: 1011-1015.

10.2. POSZTEREK

- Kiss-Tóth,E., Czibula,Á., Bachrati,Cs., Unk,I.: The 67 bp long sequence in the bovine leukemia virus LTR-R region enhances the transcriptional activity of the virus promoter independently to p34 tax. 1st International Conference of the Hungarian Biochemical Society; Debrecen, Hungary, 29 August - 1 September 1993.
- Bachrati,Cs., Deák,F., Kiss,I.: Computer analysis of the von Willebrand factor type A-like modules: sequence comparison, secondary structure prediction, and evolution. International workshop on "Extracellular protein modules: Sequence, structure, function and evolution"; Margaretorp, Sweden, 24-28 September 1994.
- Bachrati,Cs., Dozin,B., Malpeli,M., Neri,M., Kiss,I., Cancedda,R.: Expression of chicken CMP and LP genes. 2nd European Conference on Cartilage & Bone: Molecular and Cellular Mechanisms of Cartilage and Bone Remodelling; Giens, France, 1-6 October 1994.
- Mórocz,M., Czibula,Á., Bachrati,Cs., Raskó,I.: Gyors, egyszerű módszer génspecifikus DNS reparáció vizsgálatára sejtenyészeten. A Magyar Genetikusok Egyesülete III. Konferenciája; Debrecen, 1994 december 8-9.
- Neri,M., Dozin,B., Bachrati,Cs., Kiss,I., Cancedda,R.: Extracellular matrix proteins in developing cartilage: link protein, cartilage matrix protein and Ch21. 8th IIGB Meeting: Evolution and Development; Capri (NA) Italy, 7-10 October 1995.
- Czibula,Á., Gerencsér,Á., Bachrati,C., Borda,S., Margison,G.P., Rafferty,J., Johnson,R.T., Raskó,Í.: Changes of DNA repair during *in vitro* cellular differentiation. Workshop on Processing of DNA Damage: Molecular Mechanisms and Biological Effects. Noordwijkerhout, The Netherlands, 20-25 April, 1996.
- Raskó,I. Czibula,Á., Borda,S., Bachrati,C., Gerencsér,Á., Margison,G.P., Johnson,R.T.: Changes of DNA repair during *in vitro* cellular differentiation. 7th IMP Spring Conference "Chromosomes". Vienna, Austria, 23-25 May, 1996.
- Bachrati,C.Z., Downes,C.S., Raskó,I.: Malignus transzformáció függő génexpressziós változások kínai hörcsög ovárium sejtekben. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 2. Munkaértekezlete. Lillafüred, 1997. május 13-16.
- Somodi, Zs., Bachrati, Cs., Endreffy, E., Kalmár, T., László, A., Raskó, I.: Mikroszatellita polimorfizmusok a Duchenne- és Becker muscularis dystrophia carrier diagnosztikájában. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 2. Munkaértekezlete. Lillafüred, 1997. május 13-16.
- Pálmai-Pallag Tímea, Bachrati Csanád, C. Stephen Downes, Raskó István: Mitotikus ellenőrzőpont vizsgálatok normál és malignusan transzformált emlőssejtekben. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 3. Munkaértekezlete. Sárospatak, 1998. május 11-14.

10.3. ELŐADÁSOK

- Bachrati,Cs.,** Deák,F., Kiss,I.: A csirke porc kapcsolófehérje gén szabályozásának analízise. II. Genetikai Kongresszus; Szeged, 1994 augusztus 29-30.
- Bachrati,Cs.,** Deák,F., Kiss,I.: A von Willebrand faktor 'A' modul számítógépes analízise: szekvencia-összehasonlítás, másodlagos szerkezet becslés, evolúciós modell. A Magyar Genetikusok Egyesülete III. Konferenciája; Debrecen, 1994 december 8-9.
- Bachrati,Cs.,** Downes,C.S., Raskó,I.: Sejtciklus ellenőrző-pont kontroll és a malignus transzformáció. Fiatal Magyar Kutató Gyermekgyógyászok 2. Kongresszusa. Szeged, 1996. március 22-23.
- Bachrati,Cs.,** Downes,C.S., Raskó,I.: Sejtciklus ellenőrző-pont kontroll és a malignus transzformáció. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 1. Munkaértekezlete. Seregélyes, 1996. április 16-18.
- Gerencsér,Á., Czibula,Á., **Bachrati,Cs.,** Borda,S., Johnson,R.T., **Raskó,I.:** DNS reparáció változások *in vitro* sejtdifferenciálódás során. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 1. Munkaértekezlete. Seregélyes, 1996. április 16-18.
- Raskó,I.,** Czibula,Á., Borda,S., **Bachrati,Cs.,** Gerencsér,Á., Margison,G.P., Johnson,R.T.: Changes of DNA repair during *in vitro* cellular differentiation. DNA Repair Network Workshop; Smolenice Castle, Slovakia, 29 April - 1 May, 1996.
- Bachrati,C.Z.:** Transformation dependent changes of gene expression in CHO cells. International Cell Research Organization Symposium on Modern Aspects of Cell Biology, Szeged, Hungary 22 July 1996.
- Pálmai-Pallag Tímea, Bachrati Csanád, C. Stephen Downes, Raskó István:** Mitotikus ellenőrzőpont vizsgálatok normál és malignusan transzformált emlősejteken. VI Sejt és Fejlődésbiológiai Napok. Szeged, 1998 január 18-21.
- Bachrati C.Z.,** Downes C.S., Raskó I. Az S-fázisos ellenőrzőpont a rágcsálósejtek transzformálódása során elvész. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 3. Munkaértekezlete. Sárospatak, 1998. május 11-14.
- Bachrati Csanád, Somodi Zs., Endreffy E., Kalmár T., László A., Raskó I.:** Mikroszatellita polimorfizmusok a Duchenne- és Becker muscularis dystrophia carrier diagnosztikájában. Magyar humángenetikusok konferenciája. Szeged, 1998. október 18-21.
- Kalmár Tibor, Gyömbér Zs., Bachrati Cs., Raskó I.:** Populációgenetikai tanulságok a mitokondriális DNS D-Loop szekvenciáinak vizsgálata kapcsán. Magyar humángenetikusok konferenciája. Szeged, 1998. október 18-21.
- Bachrati Csanád, Somodi Zsolt, Endreffy Emőke, Kalmár Tibor, Raskó István:** Mikroszatellita polimorfizmusok a Duchenne- és Becker muscularis dystrophia carrier diagnosztikájában. IV. Magyar Genetikai Kongresszus. Siófok, 1999. április 11- 14.
- Kalmár Tibor, Bachrati Csanád, Raskó István:** Humán populációgenetikai vizsgálatok honfoglaláskori leleteken. A Magyar Humángenetikai Társaság II. Kongresszusa. Pécs, 1999. augusztus 25-28.

11. Summary

11.1. INTRODUCTION

Control of the eukaryote cell cycle is normally exerted through a series of checkpoints, passage through which permits one phase to begin only after the previous one is complete. Checkpoint controls thus prevent cells from entering mitosis before completing replication, leaving mitosis without karyokinesis, or reinitiating replication without mitosis {568, 1515}. These controls interact with DNA damage-responsive checkpoints. Passage through checkpoints is controlled by the activity of cyclin-dependent protein kinases {1516, 437}. Entry into mitosis from G_2 depends on $p34^{cdc2}$ kinase, which from S-phase is bound to the regulatory cyclin A, and later in the cycle binds cyclin B, which is synthesised at the end of S phase and in G_2 . The functioning of both cyclins A and B is necessary for mitotic entry in somatic cells.

Checkpoint regulation of the entry into mitosis is not entirely understood. The $p34^{cdc2}$ kinase is potentially regulatable by the availability of cyclins, by kinase inhibitory proteins, and by activatory and inhibitory phosphorylation. Inhibitory phosphorylation of $p34^{cdc2}$ is a major factor in delaying mitosis through checkpoint controls {1517, 1518, 1519, 1520}, but this is not the only effective system {1521}; cyclin B synthesis may also be involved {1522}.

Chemical agents, as well as mutations, can subvert checkpoint control. Mitotic condensation can occur even in cells that have been prevented from completing replication, by DNA synthesis inhibitors or DNA damage, in response to caffeine or the protein kinase inhibitors 2-aminopurine and 6-dimethylaminopurine {368} or the protein phosphatase inhibitor okadaic acid {1523}. Caffeine usually restores the normal timing of late cell cycle events, and allows chromosome condensation to be attempted irrespective of replication at what would be the normal time of mitosis, were it not for the block to replication of DNA {367}. Caffeine and similar agents are however able to produce rapid, truly premature condensation of incompletely replicated chromosomes, but only in lines such as CHO-K1 or BHK-21 cells, and only after synchrony by prolonged replication arrest {367}; and never in all the cells of a given population.

A different cycle checkpoint slippage, allowing cells arrested in metaphase by microtubule antagonists to escape into interphase without mitotic division, has been shown by Kung *et al.* {505} to be characteristic of transformed rodent cells of whatever species, but absent in immortalised rodent cells and in transformed human cells (with two exceptions: adenovirus-transformed 293 kidney cells, and SV40-transformed AT5BIVA ataxia telangiectasia fibroblasts). It is not certain whether this checkpoint slippage is related to the slippage in S-phase arrest described above.

Activators of cyclic AMP-dependent kinase cause several lines of cultured oncogenically transformed cells to undergo both morphological and physiological reversal of the transformed phenotype. This phenomenon was first described by Hsie and Puck as reverse transformation of tumorigenic CHO-K1 cells by dibutyryl cyclic AMP (Bt_2cAMP) potentiated by testosterone {369}. Although CHO-K1 cells have been very widely used in somatic cell genetics, the molecular basis of their transformed phenotype and the reversal of it remains largely unexplained.

Similar reverse transformation has been observed in several other cell types, mostly of rodent origin,

in response to compounds with similar pharmacological targets. The essential features of reverse transformation {360} are: a major cytoskeletal reorganisation producing elongated, aligned cells; loss of the intensive ruffling and blebbing of the cell surface typical of transformed cells; reacquisition of anchorage-dependent, contact-inhibited growth; increased intercellular communication through electrically coupled gap junctions; and an increase in population doubling time, with a decrease in saturation density.

The molecular basis of these profound morphological and behavioural changes are only partly understood. The enzyme activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase {519}, ornithine decarboxylase {515, 516, 536}, and transglutaminase {451} increase. Bt_2cAMP treatment causes transcriptional activation of genes encoding for phosphoenolpyruvate carboxykinase in liver {526} and H4-II-E cells {527}, hepatic tyrosine aminotransferase {529} and alkaline phosphatase in mouse L-cells {530}, lactic dehydrogenase in C6 glioma cells {531}, as well as ornithine decarboxylase, cyclic nucleotide phosphodiesterase, and some structural proteins: collagen {369}, fibronectin {534, 459}, and an actin homologue {475} in CHO-K1 cells. Concurrently, nuclear DNA becomes more accessible to DNase I digestion {357, 456, 464, 477}. These data taken together indicate that several genes regain their susceptibility to normal regulation during reverse transformation. These documented changes in activity are not, however, sufficient to explain the whole phenomenon of reverse transformation. It seems logical that genes more obviously causally related to the oncogenic process would be affected.

11.2. THE AIM OF THESE STUDIES

Using chemical treatment and cytogenetic methods the characteristics of the transformed CHO cell line can be altered: it can be reverse transformed by treatment with Bt_2cAMP and testosterone; in human / hamster somatic cell hybrids the expression of certain human genes may correct the rodent phenotype; the transformed rodent phenotype can be enhanced by the overexpression of certain oncogenes. Based on these scheme the aim of our work was the following:

1. Isolation and characterisation of CHO genes, the expression of which may be responsible for its malignant transformation and alterations of cell cycle regulation.
2. Test, if reverse transformation have effect on the function of the synthetic and mitotic checkpoint.
3. Check, if cell cycle checkpoint regulation of CHO cells is modifiable by the overexpression of certain oncogenes. Does it affect the morphology or the susceptibility for reverse transformation?
4. Isolation of monosomic human/hamster somatic hybrid cell lines that show the restoration of the S and M phase checkpoints.

11.3. RESULTS AND DISCUSSION

11.3.1. Identification of genes the expression of which changes parallel to reverse transformation

We have searched by differential display for genes that show altered expression in reverse transformation. Differential display is a sensitive technique in which cDNA obtained from cells in different states is amplified using modified oligo(dT) 3' primers and arbitrary 5' primers, and changes in kinds of levels of expression are visualised by electrophoresis of amplified products {538}. Altered expression of display fragments, and their cloned and sequenced derivatives, is confirmed by Northern blotting. Differential display of cDNA fragments generated a set of 69 cDNA bands that differed significantly in intensity between CHO-K1 and reverse-transformed CHO-K1. We amplified 39 of these and used them as probes in Northern blots against mRNA of tumorigenic and reverse-transformed CHO-K1. Eight of these bands proved to contain cDNA fragments which, on amplification, correspond to mRNAs that were significantly changed in expression upon reverse transformation. We have then re-tested, as probes in differential Northern blots, cloned products of the reamplified cDNAs. Four of the eight were still positive after cloning.

Three of the differentially transcribed cloned DNA fragments were identified, when sequenced, as elements of previously sequenced genes with known function. These can be interpreted as being transformation-related, though not necessarily causative of transformation.

The **K7C3** sequence (Figure 6.1.13) is homologous to part of the rat ribosomal protein S18 gene (EMBL accession no. X57529). The abundance of transcript containing K7C3 is substantially reduced on reverse transformation. This reduction may be explicable in terms of a lessened need for protein synthesis. In an earlier screen for preferential overexpression of genes in early trophoblasts (which share several growth features with tumours), the ribosomal protein S18 gene was identified as overexpressed {488} similarly to prostate cancer cell lines and tissues {1440}.

The **R4A** sequence (Figure 6.1.15) is homologous to the N-terminal region of a rat mitochondrial electron transport protein, NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4 (Swissprot accession no. P05508). Transcripts containing R4A increase in abundance; this increase is also easily interpretable. Reverse-transformed cells should resemble normal untransformed cells in a preference for aerobic oxidative phosphorylation, rather than glycolysis. It is probable that some other mitochondrial genes will also be found to be more transcriptionally active in reverse-transformed cells; there is evidence for a general decrease in transcription of genes with mitochondrial products in transformed cells {766, 762}.

The level of transcript containing **R7A** also increases parallel to reverse transformation. Its sequence (Figure 6.1.19) is 73 % identical on the nucleotide level with a human sequence which has been reported to encode a protein, p27^{BBP/eIF6}, with at least two very distinct functions. Interpretation of transcriptional enhancement of this sequence therefore is quite puzzling, it may well be a cause as well as an effect of reverse transformation. p27^{BBP/eIF6} was shown to be an evolutionarily conserved factor that plays a role in maintaining the steady state level of free 60S ribosomal subunits {1488, 1488}. Accordingly, due to the decreased rate of protein synthesis its enhanced expression would be required to maintain the increased pool of free 60S ribosomal subunits. This is contradictory, however, to the increased level of p27^{BBP/eIF6}

during mast cell induction, where elevated level of protein synthesis should occur {1490, 1491}. In cells of epithelial origin it acquired another function: in hemidesmosomes it is colocalised and makes strong and specific interaction with the cytoplasmic domain of $\beta 4$ integrin. It is also associated with the intermediate filament cytoskeleton {735, 1487}, suggesting a coupling role between the intermediate filaments and hemidesmosomes. We believe that an increase in a hemidesmosomal integrin-binding protein which has cytoplasmic and nuclear connections could well contribute to many of the morphological and behavioural changes observed in reverse-transformed CHO-K1 cells. Other integrin-binding proteins are also known to be involved in intercellular signalling, gene expression and mitotic progression {763}.

The fourth differentially transcribed cloned cDNA fragment, **K7C2**, was identified, by sequencing (Figure 6.1.22), as element of a known gene which may be causative in oncogenesis. The level of the corresponding transcript also increases on reverse transformation. It has a 83.5 % homology to the 3' end of a human DNA sequence, mapping to 7q21-q22, which has recently been identified as a gene encoding Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein detected by interaction trapping as binding to the Ras-family GTPase Krev-1/rap1a through its C-terminal domain. It also has a central transmembrane domain, and is expected to interact with other unknown partners by its N-terminal ankyrin repeats {699}. It is therefore a very plausible candidate for a regulator or localiser of the Krev-1/rap1a protein. Krev-1/rap1a, in turn, behaves as an antagonist of p21^{ras} in several but not all Ras transformed cells. Krev-1/rap1a protein, being located in intracellular membranes while p21^{ras} is in the plasma membrane {760}, does not interact directly with p21^{ras}, rather, it competes with p21^{ras} for binding to the GAP stimulatory protein {767} and the downstream effectors Ral-GDS {778, 776} and Raf1 {769, 776}. Though loss of heterozygosity at the Krev-1 locus is a rare oncogenic event {779}, it seems likely that Krit1 functions may be important: Serebriiskii *et al.* {699} showed that Krit1 cDNA maps by FISH to human chromosome 7q21-22. They noted that chromosome 7 monosomies and 7q22 deletions are characteristic oncogenic events in cells in which Ras is hyperactivated or the Ras-GAP NF1 gene is mutated, so that the 7q22 locus should contain a tumour suppressor gene {773}. Our report is the first of Krit1 expression being enhanced in parallel with reverse transformation.

11.3.2. *At least two known cell cycle checkpoint functions correlate with rodent origin and transformed status*

Reverse transformed CHO-K1 cells become refractory to rapid caffeine-induced chromosome condensation. We argued that, if oncogenic transformation removes S-phase checkpoint integrity and chemical detransformation restores it, overexpression of oncogenes might affect the response to caffeine after S-phase arrest. Of the proto-oncogenes tested, two clearly do modify the response of CHO-K1 cells: overexpression of *c-src* enhances premature condensation, and *wnt1* delays or suppresses it. Neither have any perceptible effect on CHO-K1 morphology. As would be expected, not all proto-oncogenes are effective: CHO-K1 overexpressing *c-jun* show no change in their caffeine response.

The modulation of caffeine-induced condensation by *c-src* is not surprising: pp60^{src} is a target of mitotic p34^{cdc2} {1437}, the *src* family of kinases are known to be required for entry into mitosis {1438}, and the predominant substrate of overexpressed *c-src* is a mitotically phosphorylated RNA-binding

protein, Sam68 {1524}. The opposite effect of *wnt1* is less expected; the *wnt* gene family are implicated in various aspects of developmental control {1439}, and expression of *wnt1* (normally silent in CHO) appears to shift S-phase checkpoint integrity, though not morphology, towards a more differentiated state.

Primary rodent cells, immortalised 3T3 and the majority of transformed human cells show proper functionality of the mitotic checkpoint, while all the transformed rodent lines show its defect. It has also been shown in our work, that the overexpression of *c-src*, *wnt1* and *c-jun* oncogenes have no effect on the integrity of the mitotic checkpoint. Unlike in the case of the S phase checkpoint, we were unable to show any effect of reverse transformation on mitotic checkpoint.

11.3.3. Chromosome 11 and 15 restores the deficiency of the S phase and mitotic checkpoints in somatic hybrid cells

Human and transformed rodent cells show significant differences in checkpoint control as it was shown by our work {681} and by others {367, 505}. We argued, therefore, if the presence of certain human chromosomes in transformed rodent / human somatic cell hybrids is capable of restoring any of the deficiencies, characteristic to transformed rodent cells.

We have tested several transformed rodent / human somatic cell hybrid lines containing sets of human chromosomes. Lines that showed the restoration of S phase checkpoint all contained chromosome 11, while the single chromosome, that was common in the mitotically stable hybrid cells, was chromosome 15. These results were further supported by the monosomic derivatives A_L (Chr 11) and 15A (Chr 15). From the works carried out with radiation hybrid derivatives of A_L that contained either the p or q arms of chromosome 11 it appears certain, that there are at least two genes affecting the S phase checkpoint and the two genes are mapped on the two different arms of chromosome 11.

We made efforts to map and clone the gene responsible for the restoration of the mitotic checkpoint on chromosome 15. Transfection of CHO cells with chromosome 15 specific λ library failed to result in a mitotically stable derivative, therefore further gene mapping with radiation hybrids is in progress.

11.4. REFERENCES

For the list of references please refer to chapter 9 on page 75.

12. Összefoglalás

12.1. ELMÉLETI ÁTTEKINTÉS

A sejt osztódása során sejtciklus ellenőrző pontok biztosítják, hogy a sejt a ciklus egymásutáni állapotain, lépések kihagyása nélkül, kizárólag a megfelelő sorrendben haladjon végig. Az ellenőrző pontok létét biztosító, főként szabályozó szerepű kinázok és foszfatázok köré szerveződő molekuláris mechanizmusok jelenleg még csak részlegesen ismertek, kölcsönhatásaik ismert onkogénnel és tumor szupresszorokkal pedig szinte teljesen felderítetlenek. A magasabbrendű eukarióta sejtek malignus transzformációjában a celluláris protoonkogének domináns onkogénné válása, illetve a tumorszupresszorok funkcióvesztéses mutációja mellett a sejtciklus ellenőrzőpontok elvesztése is jelentős szerepet játszik. A transzformált rágszálósejtekben kimutatható egyes sejtciklus ellenőrzőpontok működésének kiesése, míg a megfelelő normál rágszálósejtekben, illetve a transzformált humán sejtekben ezek a funkciók épek.

A sejtciklus ellenőrzőpontokhoz kapcsolódó szabályozási mechanizmusok végső effektor molekulái a ciklin dependens protein kinázok {1516, 437}. A G_2 fázisból mitózisba történő belépést a $p34^{cdc2}$ kináz aktivitásának megemelkedése indítja be. A $p34^{cdc2}$ az S fázis során a ciklin A, míg a ciklus későbbi fázisaiban a ciklin B regulátor alegységgel kapcsolódik. Ez utóbbi ciklin az S fázis végén illetve a G_2 fázisban szintetizálódik. Szomatikus sejtekben mindkét ciklin működése szükséges a mitózisba való belépéshez. A $p34^{cdc2}$ kináz regulációja négy szinten valósul meg: regulátor ciklin alegységek kötődése általi aktivációval; aktiváló és inaktíváló foszforilációval valamint inhibitor fehérjék kötődése következtében kialakuló gátlással. A sejtciklus ellenőrzőpontok által közvetített szignál a mitózis gátlását elsősorban a $p34^{cdc2}$ inhibitor foszforilációján keresztül feje ki {1517, 1518, 1519, 1520}, bár más, közvetett mechanizmusok is szerepelhetnek {1521}, például a ciklin B szintézis szabályozásán keresztül {1522}. Az egyes sejtciklus ellenőrzőpontok működésében részt vevő fehérjék és a szabályozás összefüggései azonban jórészt felderítetlenek.

Maligنانus transzformált rágszálósejteket a cAMP metabolizmust befolyásoló kémiai ágensekkel kezelve a transzformált fenotípus morfológiai, fiziológiai és biokémiai reverziója váltható ki, amely a drogok elvonása után eltűnik, tehát reverzibilis. A jelenséget Hsie és Puck írta le 1971-ben a laboratóriumukban előzőleg izolált CHO-K1 kínai hörcsög ovárium sejt vonal dibutiril-ciklikus-AMP (Bt_2cAMP) és tesztoszteron kezelésre bekövetkező reverz transzformációjaként {369}. Azóta számos más sejt vonal reverz transzformálásával is sikerrel próbálkoztak {473, 476, 454, 479, 366, 478, 458, 472, 345, 357, 355, 502}, hozzájárulva a cAMP dependens protein kináz rendszer, a malignus transzformáció és sejt differenciáció közötti összefüggések felderítéséhez.

A reverz transzformáció jellegzetes változásai: a citoskeleton jelentős reorganizációja következtében a sejtek megnyúlnak és egymás mellé rendeződnek; a sejt felszín intenzív mozgásai megszűnnek; a sejtek csak valamilyen aljzathoz tapadva képesek osztódni, szuszpenzióban, lágyagarban nem; a sejt osztódás sejt denzitás függő gátlása visszatér; a sejtek közötti kommunikáció intenzívebbé válik elsősorban a *gap junction*-ok számának emelkedése következtében; a sejtek ciklusideje megnyúlik; a telítési sejt sűrűség lecsökken.

A jelentős morfológiai és fiziológiai változások molekuláris háttere még eléggé feltáratlan, és

nagyrészt más rendszerekből kapott adatok interpretációján alapul. Bt_2cAMP kezelés hatására a ciklikus nukleotid foszfodiészteráz (PDE) {519}, az ornitin dekarboxiláz {515, 516, 536} és transzglutamináz {451} enzimaktivitása emelkedik. Májban {526} és H4-II-E sejtekben {527} a foszfoenol-piruvát karboxikináz, a máj tirozin aminotranszferáz {529}, egér L sejtekben az alkalikus foszfatáz {530}, C6 glióma sejtekben a laktát dehidrogenáz {531}, CHO sejtekben az ornitin dekarboxiláz, a PDE, az I-es típusú kollagén {369}, a fibronectin {534, 459} és az aktin {475} génjének transzkripcionális aktiválását írták le. Ezzel párhuzamosan a nukleáris DNS érzékenyebbé válik a DNáz I emésztésre {357, 456, 464, 477}. Ezen enzim- és génaktivitás változások azonban nem elégegesek a reverz transzformációt kísérő jelenségek magyarázatához, a malignus transzformációval közvetlen kapcsolatba hozható aktivitás változások mindenképpen várhatók.

12.2. CÉLKITŪZÉSEK

Az irodalmi adatok és kollaborációs partnereink személyes közlése alapján kirajzolódott egy általános kép, amely a malignusan transzformált rágsálósejtek, a transzformált humán sejtek és a normál sejtek tulajdonságai közti különbségeket vázolja fel:

1. A normál humán és normál rágsálósejtek (primer fibroblasztok, vagy akár immortalizált fibroblasztok) sejtciklus ellenőrző pontjai épek, a sejtek válasza a vizsgált technikákkal teljesen normálisnak tekinthető.
2. A legtöbb transzformált humán sejt sejtciklus ellenőrző pontjai épek. Egy-egy ellenőrzőpont vonatkozásában azonban lehetnek kivételek, például egyes vastagbél karcinóma sejtek mitotikus ellenőrzőpontjának defektusa kromoszomális instabilitást okoz {705}.
3. A legtöbb transzformált rágsálósejt sejtciklus ellenőrzőpontjai hibásak. Egy-egy sejtvonal azonban egyes ellenőrzőpontok helyes működését mutatja.

Citogenetikai módszerekkel a transzformált kínai hörcsög ovárium sejt tulajdonságai megváltoztathatók: kémiai ágensekkel reverz transzformálható; egyes tulajdonságai "humanizálhatók": szomatikus CHO/humán hibridsejtben a jelenlévő humán kromoszómák komplementálhatják a vizsgált sejtciklus ellenőrzőpont defektusát; egyes domináns onkogének túltermeltetésével pedig a transzformált fenotípust fokozni tudjuk. Ezen séma alapján a dolgozatomban felvázolt kísérletek a következő kérdésekre kerestek választ:

1. Melyek lehetnek azok az onkogének, tumor szupresszorok vagy sejtciklus szabályozó faktorok, amelyek megváltozott működése a CHO sejtek transzformációját, sejtciklus szabályozásának megváltozását okozta?
2. A CHO sejtek reverz transzformáltatása hogyan befolyásolja az S és M fázisos ellenőrzőpont működését?
3. Lehet-e befolyásolni a CHO sejtek sejtciklus ellenőrzőpont szabályozásának sajátosságait egyes onkogének túltermeltetésével? Befolyásolja-e a túltermeltetés a reverz transzformáció képességét és a morfológiát?
4. Lehet-e olyan CHO/humán szomatikus hibridsejtet találni, amelyben az S és M fázisos ellenőrzőpontok működése helyreállt?

12.3. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- **Rekombináns DNS módszerek** (Restriktációs emésztések, gélelektroforézis, ligálás, *E. coli* transzformálása plazmiddal, plazmid preparálás, λ fág DNS preparálás, genomiális DNS preparálása sejt kultúra sejtjeiből, RNS preparálás sejt kultúra sejtjeiből, Southern blott, Northern blott, DNS radioaktív jelölése, hibridizáció, kolónia hibridizáció)
- Sejttenyésztés
- Kromoszómapreparálás
- Mitotikus ellenőrzőpont vizsgálat négyféle különböző módszerrel
- CHO sejtek transzfecciója elektroporálással
- S fázisos ellenőrzőpont vizsgálat
- Sejttenyésztés lágyagarban
- Szomatikus sejt fúziós hibridek előállítása
- Génexpressziós mintázatok összehasonlítása *Differential Display*-el
- Számítógépes szekvencia analízis

12.4. EREDMÉNYEK

12.4.1. A reverz transzformáció hatásai a génexpresszióra

2, 3, 8 és 15 napig reverz transzformáltatott; újratranszformált; csak Bt_2cAMP -al kezelt; csak tesztoszteronnal kezelt; valamint kezeletlen kontroll CHO-K20 sejtekből származó minták Northern blott vizsgálatában sikerült kimutatnunk a *c-jun* és a *c-src* onkogének kifejeződését, azonban ezek expressziója a reverz transzformáció során nem változott. *v-sis*, *v-ERB-B* és *wnt1* próbákkal nem sikerült expressziót detektálnunk.

A reverz transzformáció során bekövetkező génexpressziós mintázatbeli változások kimutatásához a Northern blott hibridizációs kísérletek nem bizonyultak elég hatékonynak. Az irodalomban erre többféle módszert írtak le, ezek közül a mi rendszerünkre a *differential display* {538, 392} látszott a legkönnyebben alkalmazhatónak. Részleges *differential display* kísérletsorozatunk 69 az intenzitásban, és ezzel a génexpresszióban változást mutató cDNS fragmentumot eredményezett. Ezekből 39-et ellenőriztünk Northern blott hibridizációban; kezeletlen, csak tesztoszteron kezelt, csak Bt_2cAMP kezelt és teljesen reverz transzformált RNS mintákon. Ezekből 8 bizonyult olyan cDNS fajtának, amelyek expressziós változást mutató mRNS fajtákat detektálnak. A cDNS fragmentumokat Northern blott-ban újból leellenőrizve 4 klónozott fragment detektált szignifikáns expresszióváltozást mutató RNS fajtát.

A K7C3 szekvencia a patkány 40S riboszómális alegység S18 jelű fehérjéjével mutat homológiát (EMBL accession no. X57529). A detektált mRNS mennyisége jelentősen lecsökken a reverz transzformáció során. E csökkenés a fehérjeszintézis általános intenzitáscsökkenésével magyarázható. Korai trofoblasztokban, amelyek sok tulajdonságukban a transzformált sejtekre hasonlítanak, az S18 fehérje magas expresszióját mutatták ki {488}, hasonlóan egyes prosztatarák sejtekhez {1440}.

Az R4A jelű klón egy patkány mitokondriális fehérje, a NADH-ubiquinon oxidoreduktáz 4-es lánc N terminális régiójával homológ (Swissprot accession no. P05508). Expressziójának emelkedése várható következménye a reverz transzformációnak; a reverz transzformált sejtek anyagcseréje is a normál

sejtekéhez hasonlít, amennyiben a glükolízissel szemben az oxidatív foszforilációt részesítik előnyben {780, 766, 762}.

Az R7A klón 73 %-os homológiát mutat a p27^{BBP/eIF6} fehérjét kódoló cDNS szekvenciával. mRNS-ének szintje a reverz transzformáció során megemelkedik. A p27^{BBP/eIF6} fehérje meglepő módon két, egymástól meglehetősen távolálló funkciót lát el. Evolúciósan konzervált funkciója a szabad 60S riboszómális alegység *steady state* szintjének fenntartása {1488, 1488}. Feladata ennek megfelelően, a reverz transzformáció során tapasztalható alacsonyabb intenzitású fehérjeszintézis következtében megemelkedett mennyiségű szabad 60S riboszómális alegység megkötése lenne. Ennek azonban komolyan ellentmond, hogy a hízósejtek indukciója során is megemelkedik a szintje, mely folyamat viszont a fehérjeszintézis intenzitásának emelkedésével jár {1490, 1491}. Epiteiális eredetű sejtvonalakban a p27^{BBP/eIF6} fehérje erős és specifikus kölcsönhatásba lép a $\beta 4$ integrin citoplazmatikus alegységével, és az intermediate filament citoskeletonnal {735, 1487}, ami az intermediate filament citoskeleton és a hemidezmoszómák közötti kapcsolatok létrehozásában játszott szerepére utal. Úgy gondoljuk, hogy egy hemidezmoszómális integrin kötő fehérje, amelynek citoplazmatikus és magi jelenlétét is leírták, a reverz transzformáció számos jelenségéhez aktívan hozzájárulhat.

A K7C2 cDNS fragmentum a humán 7-es kromoszóma 7q21-q22 -es régiójába eső, 130 kbp -os szekvenciában mutatott homológiát. Erre a régióra több *expressed sequence tag* (EST) is térképeződik, amelyek segítségével egy feltételezett gén kódoló szekvenciáit lehetett összeállítani. A teljes cDNS szekvenciát nemrég közzétették, az a *ras* családba tartozó Krev-1/rap1a GTPáz fehérje interakciós partnerét, a Krit1-et kódolja {699}. A Krev-1/rap1a fehérjéről az irodalom valószínűsíti, hogy maga is tumor szupresszor, bár az egyes vélemények eltérnek {496, 699, 700, 701, 760, 761, 765, 767, 770, 771, 772, 779}. A Krit1 viszont olyan citológiai régióba esik, amelyről kimutatták hogy valószínűleg tumor szupresszor gént hordoz {773}. Itt kapott eredményeink az első bizonyítékai annak, hogy a 7q21-q22 régióba eső tumor szupresszor gén a Krit1 {1436}.

12.4.2. A reverz transzformáció hatásai a sejtciklus ellenőrzőpontjaira

Izoleucin éheztetéssel késői G₁ fázisra előszinkronizált sejteket blokkoltunk S fázisban hidroxürea, vagy afidikolin kezeléssel legalább 18 óra hosszan. Ez a kezelés egyes sejtek sejtciklusát a G₂-nek megfelelő állapotra állítja be, holott a DNS szintézis blokkolása miatt a replikáció nem játszódhatott le. A maradék sejtciklus kontroll ezt követően koffein kezeléssel könnyen tönkretelhető, a sejtek korai kromoszómakondenzációba kezdenek, végzetes következményekkel {367}. Az S fázisos ellenőrzőpont ezen hibája csak transzformált rágsálósejtekben (BHK-21, CHO, 10a2b) jelenik meg, a normál rágsálósejtekben (pl. primer fibroblasztok, 3T3), illetve az összes vizsgált humán sejtben (293, AT5BIVA, HeLa) működése normális. A reverz transzformációval párhuzamosan az S fázisos ellenőrzőpont integritása helyreáll.

A sejtciklus hosszan tartó blokkolása metafázisban a mikrotubulusok szerveződését befolyásoló ágensekkel (kolhicin, kolcemid, nokodazol, taxol, N₂O) egyes sejteknél abortív mitózishoz vezet: a sejtek az anafázis, telofázis és citokinézis kihagyásával kilépnek G₁ fázisba, miközben ploidiáfokuk megkétszereződik. Ez minden transzformált rágsálósejtre és néhány humán vonalra is jellemző {505}. Az S fázisos ellenőrzőpont kísérletekhez hasonlóan megvizsgáltuk, hogy a reverz transzformációnak van-

e hatása az M fázisos ellenőrzőpont működésére. Ilyen hatást azonban kimutatni nem tudtunk.

12.4.3. *Onkogének túltermeltetésének hatásai a sejtciklus ellenőrzőpontjaira*

12.4.3.1. *ONKOGÉN TÚLTERMELTETÉSRE ALKALMAS EXPRESSZIÓS PLAZMIDKONSTRUKCIÓK ÉPÍTÉSE, ÉS STABIL TÚLTERMELŐ SEJTVONALAK LÉTREHOZÁSA*

A Northern blot kísérletek eredményeit alapul véve túltermeltetésre három onkogént választottunk, melyek az onkogének három különböző csoportját: szignál transzdukciós faktorok (*c-src*), transzkripciós faktorok (*c-jun*), valamint extracelluláris szignál faktorok (*wnt1*) képviselik. A három onkogén végig-transzlálható cDNS-eit eukarióta expressziós vektorba építettük. A konstrukciókkal CHO sejteket elektroporáltunk, és szelekció után egyedi kolóniákat izoláltunk. Az izolált klónok túltermelésének mértékét Northern blot hibridizációval teszteltük, és a leginkább túltermelővel dolgoztunk tovább. Ezek a sejtek hosszabb tenyésztést követően is stabilan megőrzik onkogéntúltermelő képességüket.

12.4.3.2. *AZ ONKOGÉNEK TÚLTERMELTETÉSÉNEK HATÁSA A REVERZ TRANSZFORMÁLHATÓSÁGRA*

Az onkogének túltermeltetésének hatását a reverz transzformálhatóságra többféle citológiai módszerrel vizsgáltuk. Vizsgáltuk a sejtek megnyúlásának mértékét, a lágyagarban való növekedés képességének elvesztését és a ciklusidő megnövekedését. Összefoglalóan megállapítható, hogy a három különböző típusú onkogént (*c-src*, *c-jun*, *wnt1*) túltermelő sejtvonal a kontrollhoz képest nem mutat különbséget a reverz transzformáló kezelésre adott válaszban.

12.4.3.3. *A REVERZ TRANSZFORMÁCIÓ ÉS AZ ONKOGÉNEK TÚLTERMELTETÉSÉNEK HATÁSA AZ S ÉS M FÁZISOS ELLENŐRZŐPONT MŰKÖDÉSÉRE*

A reverz transzformáció hatásával ellentétes változást reméltünk az onkogének három csoportját reprezentáló modell onkogének túltermeltetésétől. A *src* onkogén túltermeltetése valóban fokozta a hosszantartó DNS szintézis blokk és koffein kezelés hatására bekövetkező mitotikus katasztrófát. A koffeinnel nem kezelt, csak DNS szintézis blokk alatt tartott sejtekben is magasabb a spontán mitotikus katasztrófát mutató sejtek aránya. A *wnt1* onkogén túltermeltetésével ugyanakkor az S fázisos ellenőrzőpontot olyan hatás éri, melynek következtében a mitotikus katasztrófát mutató sejtek aránya alacsonyabbá válik. A *jun* onkogén az S fázisos ellenőrzőpontra nincs hatással. A *c-src* koffein indukálta korai kromoszómakondenzációt moduláló hatása nem meglepő: a pp60^{src} a p34^{cdc2} mitotikus kináz foszforilációs targetje {1437}; a *src* család kinázairól tudott, hogy a mitózisba való belépéshez szükségesek {1438}. A *wnt1* ellentétes hatása már inkább meglepő. A *wnt* géncsalád tagjai az egyedfejlődés számos aspektusában szerepet játszanak {1439}, és úgy tűnik, hogy a CHO sejtekben normálisan nem expresszálódó *wnt1* az S fázisos ellenőrzőpont integritását egy differenciáltabb állapot felé tolja el anélkül, hogy a sejtek morfológiáját befolyásolná. A mitotikus ellenőrzőpont működésére egyik onkogén deregulált kifejeztetése sem volt hatással.

12.4.4. A transzformált rágcélsejtek sejtciklus ellenőrzőpontjainak hibáját egyes humán kromoszómák jelenléte komplementálja szomatikus sejthibridekben

Humán / kínaihőrcsög szomatikus sejt hibridekkel sikerült az S és M fázisos ellenőrzőpontok működésében szerepet játszó géneket térképezni a 11-es (S) és a 15-ös (M) humán kromoszómákra. A 11-es kromoszómáról kimutattuk, hogy legalább két, az ellentétes karokon elhelyezkedő génről lehet szó, amelyek közül az egyik feltehetően a Wilm's tumor tumorszupresszor. A 15-ös kromoszómán elhelyezkedő gén finomabb térképezéséhez radiációs hibridek előállítását kezdtük el. Észak-írországi kollaborációs partnereinkkel közösen elkezdtük a 11-es kromoszómán elhelyezkedő gén molekuláris módszerekkel történő izolálását.

12.5. IDÉZETT IRODALOM

Az irodalmi hivatkozások listáját lásd a 9 fejezetben a 75. oldalon.