

A hőrezisztencia és multidrog rezisztencia kialakulásának vizsgálata

Dr Univ. egyetemi fokozat PhD átminősítési tézisek

Hevér-Szabó Anna

Molekuláris biológus

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont

1997.



Ezúton szeretnék köszönetet mondani azoknak, akik segítették munkámat:

Dr Alföldi Lajosnak és Dr Raskó Istvánnak pályázataim támogatásáért,

Dr Venetianer Anikónak, a témavezetésért,

Dr Pírity Melindának, Carmen-Cristina Diaconunak, Suman Jainnak a közös munkáért,

Bálint Arankának, Lévai Tildának és Ugrainé Szathmári Margitnak a kiváló aszisztenciáért,

Truth Ferencnének odaadó munkájáért,

Tóthné Marikának és Borka Andrásnak a fotók és az ábrák elkészítéséért.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. A hő-sokk válasz	6
2.2. A termotolerancia	7
2.3. A hőrezisztencia	7
2.4. A multidrog rezisztencia	8
2.5. Az apoptózis	9
3. Tézisek	12
3.1. Hőrezisztens sejtek izolálása és jellemzése	12
3.1.1. Hőrezisztens sejtek izolálása, a hőrezisztencia tesztelése	12
3.1.2. Sejtmorfológia és májspecifikus funkciók	13
3.2. Hőrezisztens sejtek stresszválasza	14
3.2.1. Stresszválasz enyhe, 42°C-os hőkezelést követően	14
3.2.1.1. A fehérjeszintézis vizsgálata	14
3.2.1.2. mRNS szintézis vizsgálat 42°C-os hőkezelést követően	16
3.2.2. Stresszválasz erős, 45°C-os hőkezelést követően	17
3.2.2.1. A fehérjeszintézis vizsgálata	17
3.2.2.2. mRNS szintézis 45°C-os hőkezelést követően	17
3.2.3. Hőérzékeny riporterfehérje stabilitásának vizsgálata	18
3.3. Hőrezisztens sejtek drogrezisztenciája	19

3.4.. Drogrezisztens sejtek izolálása és jellemzése	20
3.4.1. A drogrezisztencia tesztelése	20
3.4.2. A hőrezisztencia tesztelése	22
3.4.3. A P-glikoprotein szint vizsgálata	22
3.5. Apoptózis indukciója drogszenzitív és drogrezisztens sejtekben	23
3.5.1. Az apoptózis meghatározása morfológiai jegyek alapján	23
3.5.1.1. Apoptózis indukciója kemoterápiás szerekkel	24
3.5.1.2. Apoptózis indukciója szérum megvonással	25
3.5.2. FACS analízis alkalmazása apoptózis kimutatására	25
4. A tézisek összefoglalása	28
5. Irodalomjegyzék	31

1. Bevezetés

A rákos megbetegedések gyógykezelése során gyakorta alkalmaznak kemoterápiát és besugárzást hipertermiás kezeléssel kombinálva, amely megnöveli az előzőek hatékonyságát (1., 2.). Sajnálatos módon, az egymást követő, ciklikusan alkalmazott hőkezelések folyamán a tumoros sejtek ellenállóvá válhatnak a következő kezeléssel szemben, s az így kialakult hőrezisztencia csökkentheti a kezelés hatékonyságát. Súlyos problémát jelent a rákterápiában a kemoterápiás szerekkel szemben kialakuló drogrezisztencia is. Gyakran egy adott kemoterápiás szer hatására kialakuló rezisztencia létrehozhat más, szerkezetében és hatásmechanizmusában eltérő drogokkal szembeni keresztrezisztenciát, amelyet multidrog rezisztenciának nevezünk. Ezen jelenségek, és a köztük húzóóó összefüggések vizsgálatát tűztük ki célul.

A korábbi években munkacsoportunk patkány hepatóma sejtvonalak stresszválaszát vizsgálta. A vizsgált sejtvonalak mind differenciációs állapotban, mind glukokortikoid érzékenységben eltértek egymástól és a hővel szembeni ellenállóképességük is különbözött. Kezdeti kísérleteink arra irányultak, hogy ez a hőtűró képességben jelentkező különbség összefüggésbe hozható-e a sejtek eltérő differenciációs fokával, illetve glukokortikoid érzékenységével. Megállapítottuk, hogy enyhe, 42°C-os hő-sokk kezelést követően valamennyi vizsgált sejtvonalkban indukálódott a fő hő-sokk fehérjék közül a hsp110, 100, 90, 70 és 60. A differenciált hepatóma sejtek fehérjeindukációs mintázata eltért a differenciálatlan sejtvonalakétól. Bár a glukokortikoid rezisztencia és a differenciációs állapot befolyásolta a hő-sokk gének expresszióját, ez nem mutatott korrelációt a sejtek hőtűró képességével (3., 4.).

A hőrezisztencia tanulmányozásának első fontos lépése olyan hőrezisztens sejtvonalak izolálása, amelyek sejttenyésztésben stabilan fenntarthatóak. Az

előzőekben jellemzett modellrendszer ehhez kiváló alapot biztosított és többszöri hőkezelést követő felnövesztéssel valóban sikerült hőrezisztens sejtvonalakat izolálnunk, amelyek rezisztenciájukat folyamatosan, kultúrában tartva is stabilan megőrizték további hőkezelés nélkül. A hőrezisztencia kialakulásának okait kutatva összehasonlítottuk a hőrezisztens és hőérzékeny sejtvonalak fehérjemintázatát különböző erősségű hőstresszre követően, illetve megvizsgáltuk a fehérjeindukció és az RNS szintézis dinamikáját is. Megállapításaink szerint a sejtvonalainkban kialakult hőrezisztenciáért nagy valószínűséggel a konstitutív hő-sokk fehérjék (hsp110, 90 és 70) megnövekedett szintézise tehető felelőssé.

Az izolált hőrezisztens sejtvonalaink kis mértékben spontán drogrezisztenciát mutattak. Ez további kutatásaink szempontjából meghatározó volt, mert így joggal remélhettük, hogy sejtvonalainkban a hőrezisztenciához hasonlóan drogrezisztencia is kialakítható. Ez colchicin szelekció segítségével sikerült is. Az így izolált colchicin rezisztens sejtvonalak drogrezisztenciája a hőrezisztensekéénél lényegesen nagyobb mértékű volt, és jelentős keresztrezisztenciát mutatott a többi általunk vizsgált droggal szemben is. Így, bár csak colchicinre szelektáltunk, a sejtvonalaink multidrog rezisztensekké váltak. Az elsődleges várakozások ellenére a drogrezisztens sejtvonalak nem mutattak hőrezisztenciát. Mint későbbi vizsgálataink megmutatták, a multidrogrezisztenciát nagy valószínűséggel a P-glikoprotein megnövekedett szintézise okozta, amely a hőrezisztens sejtekben is indukálódott kisebb mértékben, kiváltva azok spontán drogrezisztenciáját.

Új utat nyitna a rákterápiában a hő- és/vagy multidrog rezisztens tumorsejtek programozott sejthalálának célzott kiváltása. A programozott sejthalál, vagy más néven apoptózis mechanizmusának és szabályozásának pontosabb megismerése révén esetleg lehetőség nyílna az eddig sikertelenül kezelt megbetegedések gyógyítására.

Megvizsgálva hepatóma sejteink apoptózis indukálhatóságát, megállapítottuk, hogy sejtvonalainkban az apoptotikus apparátus ép, az apoptózis kemoterápiás szerekkel kiváltható. Az indukció mértéke sejtípusonként és drogonként különböző volt. Az apoptózist szérummegvonás segítségével is ki tudtuk váltani, ami azt sugallja, hogy sejteinkben többféle indukciós útvonal létezik. Az apoptózis indukációjának kiváltásához szükséges kondíciók meghatározása

lehetőséget teremt, hogy a későbbiekben az apoptózis szabályozásában szerepet játszó makromolekulák működését tanulmányozhassuk.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A hő-sokk válasz

Az élőlények az optimális környezeti tényezők megváltozását stresszként élik meg, és specifikus fehérjék, a stresszfehérjék, vagy gyakoribb nevükön hő-sokk fehérjék szintézisével válaszolnak (5.). Ezen hő-sokk fehérjéket az eukaryótákban monomerjeik molekulatömege alapján nagy fehérjecsaldókra osztották fel a HSP100; HSP90; HSP70; HSP60 fehérjecsaldókra, illetve a 15-30 kDa tömegű fehérjéket összefoglaló, úgynevezett kis molekulatömegű hő-sokk fehérjecsaldóra (2.). A különböző fajok azonos molekulatömegű hő-sokk fehérjéi között gyakran magas aminosav szekvencia homológiát találtak, amely arra utal, hogy a törzsfajlás során nagy mértékben konzerválódott a szekvencia (6.).

A hő-sokk fehérjék génjei általában multigén családokat alkotnak, melyeknek transzkripcióját az 5' végen található konszenzus szekvenciákhoz (heat shock element) (7., 8.) kötődő transzkripciós faktorok (HSF) szabályozzák (9.) más, nem hő-sokk függő promóter elemek mellett. Hő-sokk hatására ezen gének transzkripciója megnövekedik, és a gyors transzláció következtében a hő-sokk fehérjék mennyisége megemelkedik, ezzel párhuzamosan a nem hő-sokk fehérjék szintézise lecsökken (10.). A hő-sokk fehérjék közül az úgynevezett konstitutív hő-sokk fehérjék nem csak stresszkörülmények között expresszálódnak, hanem fontos szerepet töltenek be a sejtek életműködésében is, mint például a HSP70 család tagjai, amelyek a fehérjék membránokon való átjutásában segítenek, ATP-függő "unfoldase" funkciójuk révén biztosítva a fehérjék kitekert konformációját az átjutáskor (11.).

A legfontosabb, legáltalánosabb hő-sokk fehérje funkció feltehetőleg az, hogy megakadályozzák más fehérjék stressz okozta károsodását. Ezen védőfunkció miatt nevezik gyakran a hő-sokk fehérjéket molekuláris chaperonoknak

(gardedám) is (12.). A chaperonok szabályozzák a fehérjeláncok le- és feltekeredését, a fehérjealegységek szét- és összeszerelődését, illetve megakadályozzák, hogy hibás szerkezetű fehérjék alakuljanak ki (13.).

2. 2. A termotolerancia

Termotoleranciának nevezzük az élőlényekben az ismételt hőkezeléssel szemben kialakuló átmenetileg megnövekedett ellenálló képességet. A termotolerancia kialakulásához sok esetben megnövekedett hő-sokk fehérje expresszió társul (2.). Ilyenkor a hő-sokk fehérjék feltételezhetően a hő-sokk alatt károsodott fehérjék lebontásában játszhatnak szerepet, de mint molekuláris chaperonok is közrejátszhatnak a tolerancia kialakulásában, védőfunkciójuk révén. A termotolerancia a hőkezelés befejezését követően néhány napon belül, de gyakran sokkal gyorsabban megszűnik, nem átörökíthető tulajdonság.

2. 3. A hőrezisztencia

A hőrezisztencia ellentétben a termotoleranciával, nem átmeneti, hanem stabil, genetikailag örökíthető változás, amelynek kialakulásában szintén szerepet játszhatnak a hő-sokk fehérjék. A hőrezisztencia kialakulását a hsp27, hsp70 és hsp90 megemelkedett konstitutív szintjével (14., 15.,16.), illetve új hsp70 fehérje megjelenésével magyarázzák (17.). Bizonyos esetekben a hőrezisztencia a sejtmembránfluiditás megnövekedésével párhuzamosan alakul ki (18.). Maguk a hőrezisztens sejtek termotoleránssá tehetők, ami arra utal, hogy a két jelenség részben egymástól függetlenül is képes kialakulni, nem kapcsoltak (2.).

2. 4. A multidrog rezisztencia

A sejtekben az egyszerre több, különböző típusú és szerkezetű kemoterápiás szerrel szemben kialakult rezisztenciát multidrog rezisztenciának nevezzük (19.). Számos mechanizmust ismerünk az irodalomból, amelyek közrejátszhatnak a multidrog rezisztencia kialakításában, mint pl. az MRP (multidrug resistance-associated protein) megnövekedett szintje (20.), vagy a glutation-S-transzferáz izoenzimek megnövekedett expressziója (21.). Leggyakrabban azonban a P-glikoprotein megnövekedett szintézise mutatható ki a multidrog rezisztens sejtvonalakban (22.). A P-glikoprotein 170 kDa molekulatömegű membránfehérje, amely a humán sejtekben az MDR1 génről íródik át (19.), és egyes szerzők szerint a különböző szerkezetű és hatású drogok aspecifikus, ATP-függő kipumpálását végzi a sejtekből (23.), míg mások elgondolása szerint a P-glikoprotein flippáz mechanizmussal már a sejtmembránból eltávolítja a diffúzióval bejutott drogot (24.). Szerkezetét tekintve a P-glikoprotein az ABC- (ATP-binding cassette) transzportfehérjék családjába tartozik, két 43%-os homológiát mutató molekulafélből áll, amelyek 6-6 transzmembrán domént tartalmaznak, valamint egy-egy ATP-kötő domént (22.). A P-glikoprotein aminosav sorrendjében bekövetkező változások befolyásolhatják a különböző drogokkal szembeni affinitást, mint például egy colchicinre szelektált multidrog rezisztens sejtvonal (KB-C1) aminosavsorrendjében a 185. pozícióban levő glicin valinra való kicserélése a colchicin transzportját megnövelte, miközben a vinblasztin és actinomycin D kijutásának intenzitása lecsökkent (25.).

Megnövekedett P-glikoprotein szintézist nemcsak drogrezisztens humán tumoros sejtekből, hanem normális szövetekből, mint pl. vese, máj, is kimutattak, amely arra utal, hogy a szervezet méregtelenítő mechanizmusában is szerepet játszhat a P-glikoprotein (26.), sőt a gén promoter régiójának vizsgálata, amelyet riporter gén segítségével végeztek, azt mutatta, hogy a P-glikoprotein expressziója sejtspecifikusan szabályozott (27.). Az MDR1 gén mellett, hogy konstitutívan expresszálódhat, gyakran kemoterápiás szerekkel (colchicin, vincristin, doxorubicin) is indukálható. A megnövekedett mennyiségű P-glikoprotein okozta

multidrog rezisztencia fenotípust Ca^{2+} -csatorna blokkolók (verapamil, nifedipine), calmodulin inhibitorok gyakran képesek megszüntetni (19.).

2. 5. Az apoptózis

Az élőlények homeosztázisukat a sejtosztódás és a sejthalál közötti egyensúly megőrzésével tartják fenn. Míg a sejtosztódás szabályozásáról viszonylag sok adat áll rendelkezésünkre, a sejthalál vizsgálata csak az utóbbi években került az érdeklődés előterébe. A morfológiai és biokémiai jegyek alapján a sejthalál két alapvető típusát tudjuk elkülöníteni: a nekrozist és az apoptozist.

A nekrozis egyik első jele a mitokondriumok morfológiai változása, amelyet a plazmamembrán károsodása követ. Ez a sejt ozmotikus regulációjának a megszűnéséhez vezet, a sejt megduzzad, majd sejtlízis következik be. A kiáramló sejtanyag gyulladást indukál, amely a sejtörmelék eltávolítását eredményezi (28.).

Míg a nekrozist főként patológiás sejthalálnak tartják, amelyet akut sejsérülés idéz elő, addig az apoptózis nemcsak sérülés, vagy fizikai, kémia behatás következtében jön létre, hanem "természetes", vagy genetikailag programozott sejthalálnak is nevezik, amelynek fontos szerepe van az egyedfejlődés során is (29.). Az apoptózis morfológiai jegyek alapján is elkülöníthető a nekrozistól. Az apoptózis folyamatának főbb lépései:

- A szöveti kötetékben levő sejtek elvesztik kapcsolatukat a szomszédos sejtekkel, és megszűnnek a speciális plazmamembrán struktúrák (mikrovillusok).
- Ezzel párhuzamosan a sejt citoplazmájának térfogata csökken, ami feltehetően az intracelluláris folyadék és ionok kiáramlása következtében jön létre (30.).
- A citoplazmában hólyagocskák képződnek (zeiosis).
- Az intracelluláris Ca^{2+} szint megemelkedik (31., 32.). A Ca^{2+} ionok szerepe nem igazán tisztázott az apoptózis menetében, egyes szerzők aktivátor (33.), míg mások inhibitor funkciót tulajdonítanak neki (34.).

- Az apoptózis folyamatában szintén a korai események közé tartozik a kromatin fragmentálódása, amelynek során a DNS internukleosómális hasítása révén 180-200 bázispár hosszúságú fragmentek jönnek létre (DNS ladder) (35.).

- A citoplazmában az endoplazmás retikulum ciszternái megduzzadnak és vezikulát formálnak, amelyek a plazmamembránnal fuzionálva juttatják tartalmukat az extracelluláris térbe (36.).

- A kromatin teljesen széttöredezik és különálló gömböket formál, majd teljesen szétesik a sejt és apoptótikus testek jönnek létre, amelyek maganyagot és citoplazmát egyaránt tartalmazhatnak.

Az apoptótikus testeket a szomszédos nem apoptótizáló sejtek kebelezik be, anélkül, hogy gyulladás alakulna ki (37.). Az apoptótikus testek felismerésében szignálként szolgálhat több más molekula mellett, a felszínükön megjelenő glykán csoport, esetleg más, a normál sejt esetében védett, vagy rejtett cukormolekula részlet, illetve a foszfátidilszerin is (38., 39.).

Az apoptózis indukciója a különböző típusú sejtek esetében eltérő lehet. A hormon, illetve növekedési faktor függő sejteknél, szöveteknél a faktorok megvonása, illetve hozzáadása (40.) kiválthatja az apoptózis indukcióját. Tumor sejteknél spontán is kialakulhat, vagy a gyógykezelés során, a rákterápiában használatos drogok is indukálhatják az apoptózist (35., 41.). Ezek mellett számos olyan kondíció található, amely kiváltja az adott sejtekben a programozott sejthalált, például hipotermia, hipertermia, sugárzás, toxinok (42., 35., 43.).

Meg kell említenünk az immunrendszeren belül megfigyelt, úgynevezett sejtmediált apoptózist, amely esetben az apoptózist indukáló változásokat egy másik sejttel való kölcsönhatás váltja ki (44.).

Az apoptózis szabályozásában fontos szerepet játszanak az onkogének. Az egyik legjobban jellemzett ilyen gén az emlős sejtekben megnyilvánuló bcl-2 proto-onkogén. A bcl-2 a különböző stimulusokkal kiváltott sejthalállal szemben megvédi az eltérő típusú sejteket, feltételezhetően a reaktív oxigén gyökök gátlásával (45, 46., 47.). A bcl-2 egy népes multigén család tagja, amelynek tagjai közül a bcl-xL hasonlóan mint a bcl-2, sejthalál inhibitor, míg a bcl-xS az előző kettővel szemben antagonistá hatást mutat (48.). A Bad és Bak fehérjék indukálják, siettetik a sejtek halálát, míg a Bcl-2-vel magas szekvencia homológiát mutató Bcl-w a sejtek túlélésében játszik szerepet. A Bcl-2 család tagjai képesek egymás hatását

regulálni, valamint kölcsönhatásba lépnek egyéb, a családon kívüli fehérjékkel, mint például az R-ras, amely a Bcl-2-vel antagonista hatású (49.).

Az onkogéneken kívül számos más fehérje is szabályozza az apoptózis folyamatát. Ezek közül a p53 tumor szupresszor gén terméke kulcsfontosságú szerepet tölt be. A p53 a humán tumorokban az egyik leggyakrabban mutációt szenvedett gén, visszajuttatása a transzformált sejtekbe növekedésgátlást, vagy apoptózist indukál, sejttípustól, illetve a sejt fiziológiás állapotától függően (50., 51.). Indukcióját kiválthatja többek között a DNS károsodása, kemoterápiás ágensek, vagy a c-myc proto-onkogén magas szintje. Szekvencia specifikus DNS-kötő aktivitása révén transzkripciós faktorként hathat, aktiválhatja más, egyéb gének transzkripcióját, illetve represszálni és képes azon gének transzkripcióját, amelyeknek hiányzik a promotereből a p53-responsív elem. A sejtciklus gátlását is feltehetően más gének, mint pl. p21 (sejtciklus- függő kináz inhibitor) aktiválásával váltja ki. Az apoptózis kiváltása során is transzkripciós faktorként hathat, aktiválhatja az apoptózist indukáló, úgynevezett halál géneket, mint például a bax gént, vagy represszálni a túlélést segítő, apoptózis inhibitor géneket, mint például a már említett bcl-2 gént (52.).

Az eddigiekhez hasonlóan az interleukin-1 β -konvertáló enzimes család (ICE) tagjai szintén fontos szerepet töltenek be az apoptózis szabályozásában. Az ICE család tagjai (ICE, NEDD-2, TX, Mch-2) cisztein proteázok, amelyek apoptózis indukálására képesek. Az enzimeknek több szubsztrátját is azonosították, mint például a magmembránban elhelyezkedő lamint, amelynek hasítása a korai apoptotikus események közé tartozik (52.).

Szintén az apoptózis indukálásában játszanak szerepet a Fas antigén és a TNFR1 ligandjuk megkötésekor. Ezek a fehérjék úgynevezett halál domént tartalmaznak a citoplazmatikus régiójukban, ezt a konzervált szekvencia részletet teszik felelőssé az apoptózis szignálért. Számos fehérjében azonosították a halál domént (FADD, TRADD, RIP, FAF-1), ezek a fehérjék valóban résztvesznek az apoptózis indukációjában (52.).

Ezidáig számos apoptózist reguláló elemet azonosítottak, és mai tudásunk alapján úgy tűnik, hogy az apoptózis szabályozása sejt-specifikus módon történik, de a szabályozás alapvető elemei valószínűleg univerzálisak.

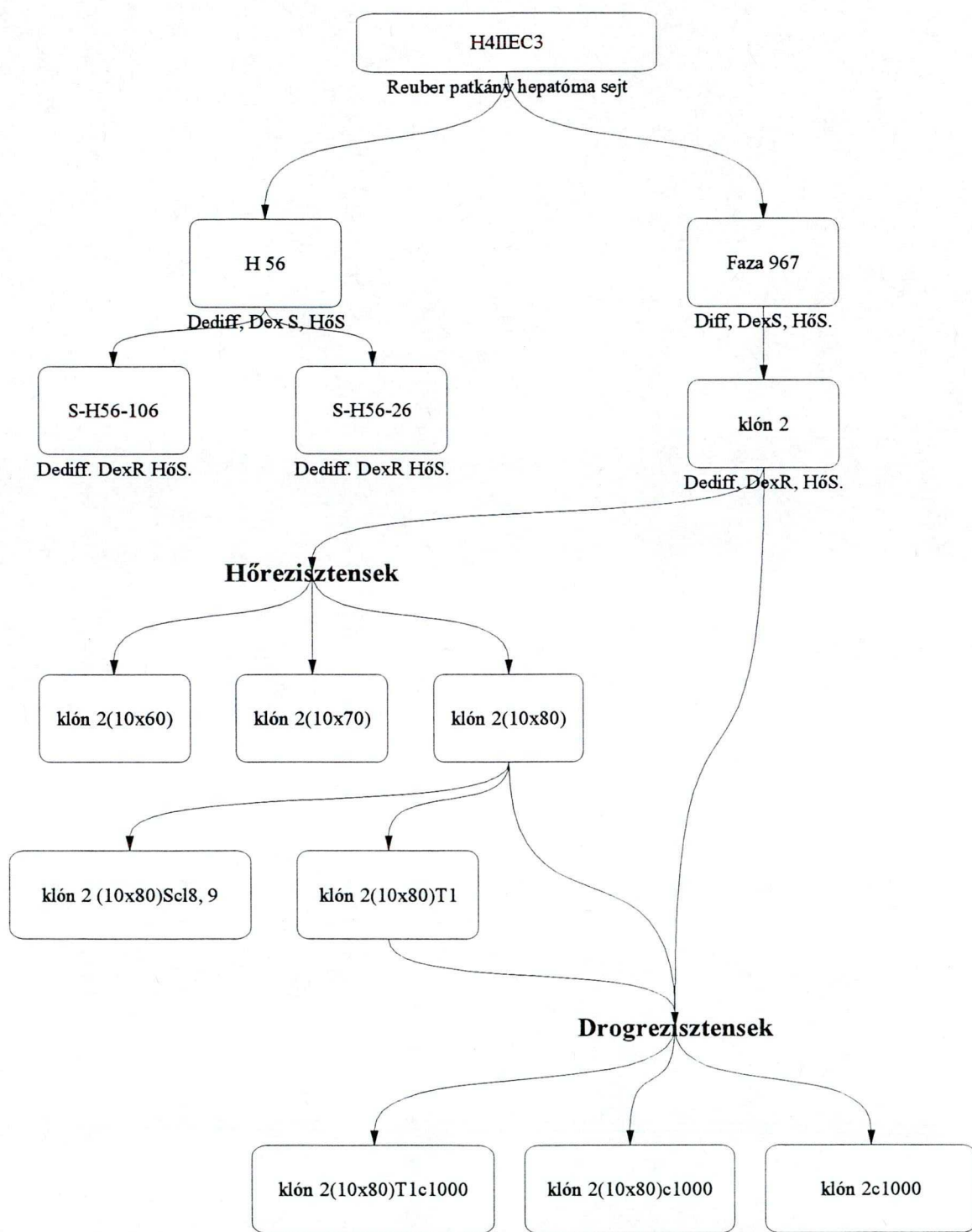
3. Tézisek

3. 1. Hőrezisztens sejtek izolálása és jellemzése

3. 1. 1. Hőrezisztens sejtek izolálása, a hőrezisztencia tesztelése

A már korábban hőérzékenység szempontjából jellemzett setjeink (3., 4.) közül a hőrezisztens izoláláshoz a H56, S-H56-26, S-H56-106, Faza 967 és klón 2 sejt vonalakat választottuk ki. Ezek a sejt vonalak nemcsak hőérzékenységben, hanem differenciációs állapotban, dexametazon érzékenységben is eltértek egymástól (1. ábra). Az izolálás során a sejteket különböző ideig tartó (60, 70, 80 perces), 45°C-os hőkezelésnek vetettük alá, ezt követően a túlélőket felnevesztettük. Ezt az eljárást 10 cikluson keresztül ismételtük. A hőkezelésekkel párhuzamosan vizsgáltuk a sejtek viabilitását Tripán-kék festési eljárással. A Tripán-kék festés során a hőkezelést követően tripszinezéssel eltávolítottuk a sejteket a Petri-csészék aljáról és PBS pufferes mosást követően a sejteket Tripán-kék oldattal (4:1 arányban 0.14% Tripán-kék és 4.25% NaCl) festettük 4 percen keresztül, ezt követően megszámláltuk a hőkezelést túlélő sejteket és az elpusztultakat, amelyeket a bejutó festék kékre színezett. A sejtek viabilitását a túlélők kontrollhoz viszonyított százalékában fejeztük ki.

A sejtek viabilitása a hőkezelési ciklusok előrehaladtával a hosszabb ideig kezelt sejt vonalaknál nőtt meg leginkább. Az sorozatkezelések végén a kevert populációkból szubklónokat izoláltunk. Azokat a sejt vonalakat, amelyeket a hőkezelési ciklusok végén nyertünk a ciklusok sorozatszámával és a kezelés időtartamával neveztük el, pl. klón 2(10x80), amely a klón 2 sejt tizedik 80 perces



1.ábra. Patkány hepatóma sejtvonalak leszármazása és főbb jellemzőik.

Diff. - differenciált sejtvonál

Dediff. - dedifferenciált sejtvonál

Dex S - dexametazon érzékeny sejtvonál

Dex R - dexametazon rezisztens sejtvonál

Hő S - hőérzékeny sejtvonál

Hő R - hőrezisztens sejtvonál

hőkezelésnek kitett klónját jelenti, míg a klónokból izolált szubklónokat T, illetve Scl jelzéssel láttuk el a klón név mellett.

Az új sejtvonalak hőrezisztenciájának mértékét a sejtek kolóniaképző képességének vizsgálatával határoztuk meg, 30, 50, 70, 90 perces 45°C-os hőkezelést követően. A kolóniaképző képesség vizsgálata során azonos számú sejtet (1000 sejt/60mm-es Petri-csésze) tartalmazó Petri-csészéket helyeztünk 45°C-os vízfürdőbe a fent megadott időtartamokra, majd 37°C-on növesztettük a sejteket 2 hétig, a második hétvégén a kolóniákat 10%-os formalin oldattal fixáltuk, majd pedig 1%-os kristályibolya oldattal festettük őket. A hőrezisztencia mértékének meghatározásakor nem csak a túlélő kolóniák számát határoztuk meg, hanem a telepek morfológiáját és méretét is vizsgáltuk.

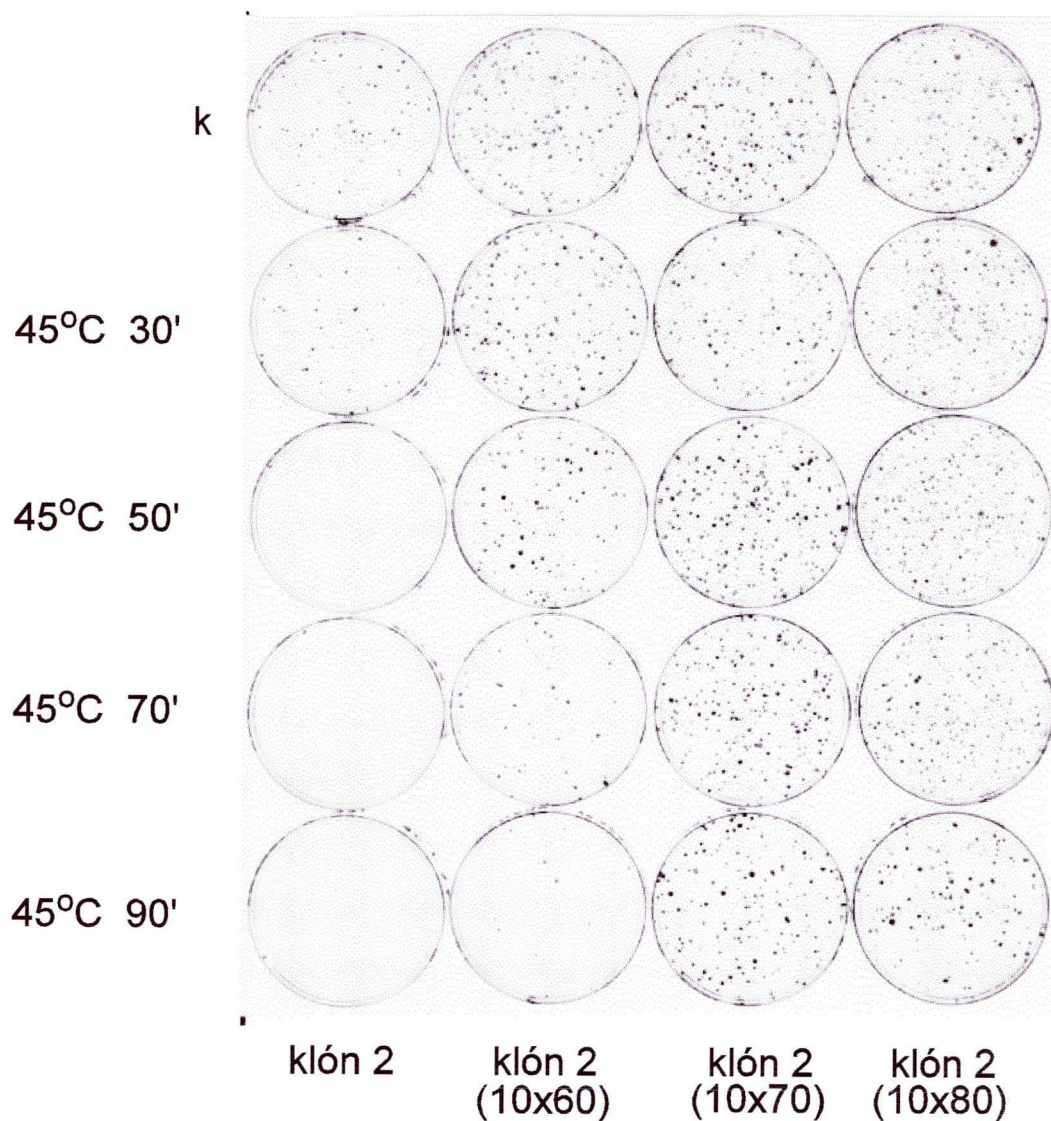
A tesztelt sejtvonalak különböző mértékben váltak rezisztenssé a hőkezeléssel szemben, a legnagyobb mértékben a klón 2 sejtvonala származékai, a klón 2(10x60), (10x70) és (10x80), illetve ezeknek szubklónjai váltak ellenállóvá a hővel szemben (2. ábra). A későbbiekben ezeknek a sejtvonalaknak a jellemzésével foglalkoztunk, lévén ezek a ténylegesen hőrezisztensek. Összehasonlítva a szülői klón 2 sejtet a hőrezisztenseket, a klón 2(10x80) és szubklónja a klón 2(10x80)T1 bizonyultak a legrezisztensebbnek.

Mindegyik sejtvonala 4 hónapos, folyamatos kultúrában való fenntartást követően is megőrizte hővel szembeni rezisztenciáját. Az ily módon izolált és tesztelt stabil hőrezisztens sejtvonala morfológiáját és májspecifikus funkcióit vizsgáltuk a későbbiekben.

3. 1. 2. Sejtmorfológia és májspecifikus funkciók

Morfológia tekintetében a hőrezisztens sejtek megváltoztak, összehasonlítva a klón 2 sejtet, megállapíthattuk, hogy sejtjeink általában megnagyobbodtak, elnyúltabbak lettek, mint a szülői sejt. Generációs idejük hasonló a szülőéhez, 23-26 óra.

A májspecifikus funkciók közül az albumin termelődését és a TAT (tirozin aminoszferáz) enzim expresszióját vizsgáltuk. Mindkét fehérje a felnőtt



2. ábra. A kolóniaképzés vizsgálata 45 C-os hőkezelést követően a klón 2 és hőrezisztens variánsainál

Azonos számú sejtet különböző idejű (30, 50, 70 és 90 perces) 45 C-os hőkezelésnek tettünk ki a kontroll sejtek kivételével, majd a sejteket 37 C-on neveltük, 2 hét elteltével fixáltuk és festettük őket.

májsejtek mellett a differenciálódott hepatóma sejtekben is termelődik. A kísérlet során össz-mRNS preparálást (53.) követően Northern-blot analízis (54.) segítségével választottuk szét molekulásúly szerint az RNS-t, majd albuminra és TAT enzim mRNS-re specifikus cDNS próba (55., 56.) segítségével mutattuk ki a mRNS szintet.

A szülői klón 2 sejtvonalba nem termelődik egyik fehérje sem, vagy csak igen kis mennyiségben, a sejtvonala dedifferenciálttá vált. A hőrezisztens sejtvonalakban albumin termelődést nem tudtunk kimutatni, míg TAT enzim termelődése a klón 2 (10x60) és klón 2(10x70) sejtvonalba kis mértékben megnövekedett a szülőhöz viszonyítva, de jelentősen alatta maradt a differenciált sejtekben, mint pl. Faza 967-ben kimutatható szintnek. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy az általunk izolált hőrezisztens variánsok dedifferenciáltak maradtak.

3. 2. Hőrezisztens sejtek stresszválasza

3.2.1. Stresszválasz enyhe, 42°C-os hőkezelést követően

3.2.1.1. Fehérjeszintézis vizsgálata

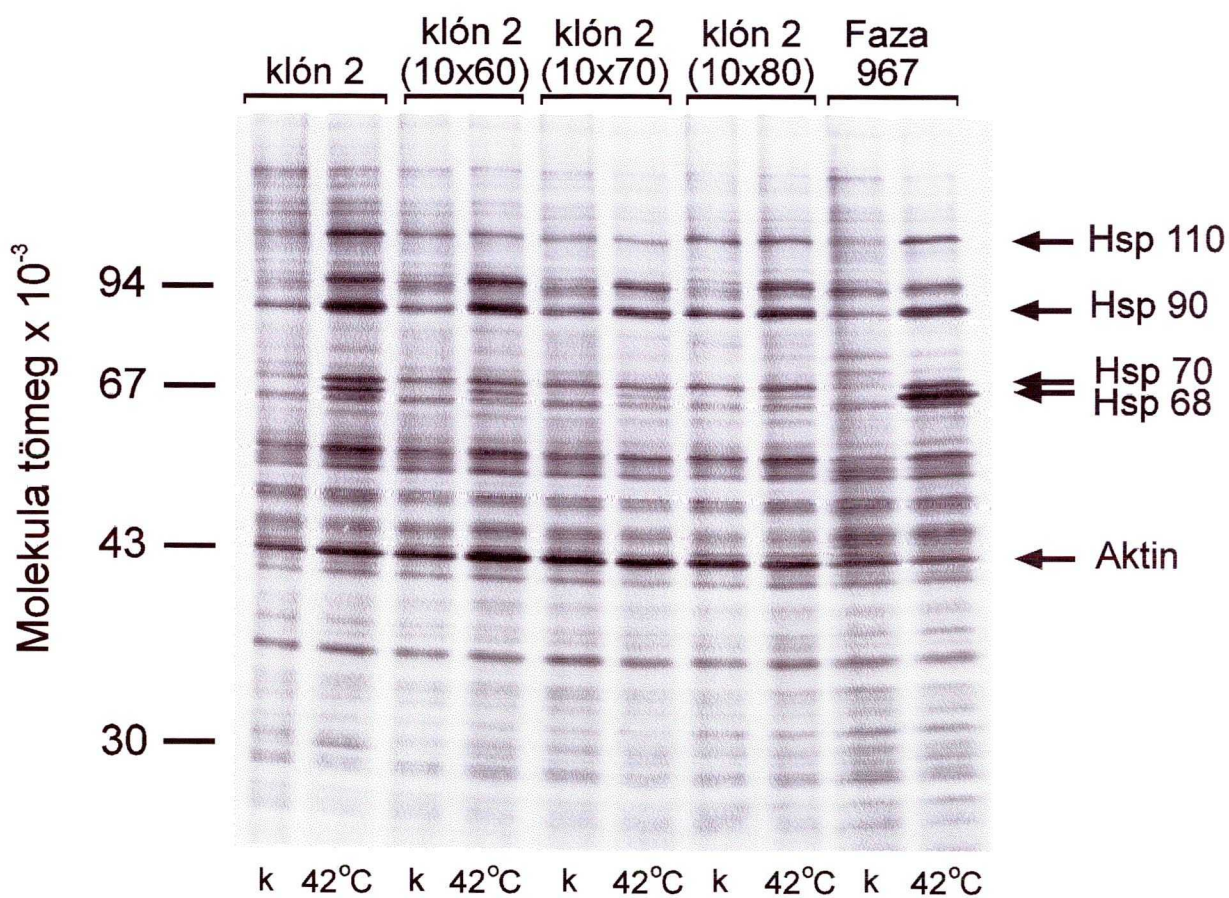
Az elkövetkezőkben arra kerestük a választ, hogy eltér-e a hőszenszítív szülői sejtvonala és a hőrezisztens variánsok fehérjemintázata. A kialakult hőrezisztencia újonnan megjelent hő-sokk fehérjének, vagy egyéb a konstitutív fehérjék szintjén bekövetkezett változásnak, esetleg a hő-sokk fehérjék indukálhatóságában bekövetkezett változásnak tulajdonítható-e?

Stresszkezelésként a 42°C-os 3 órás hőkezelést alkalmaztuk, ez a kondíció nem befolyásolja nagy mértékben sejtvonalaink viabilitását. A fehérjemintákat a hő-sokkot követően ³⁵S -metioninnal jelölt sejtekből preparáltuk, majd egy dimenziós

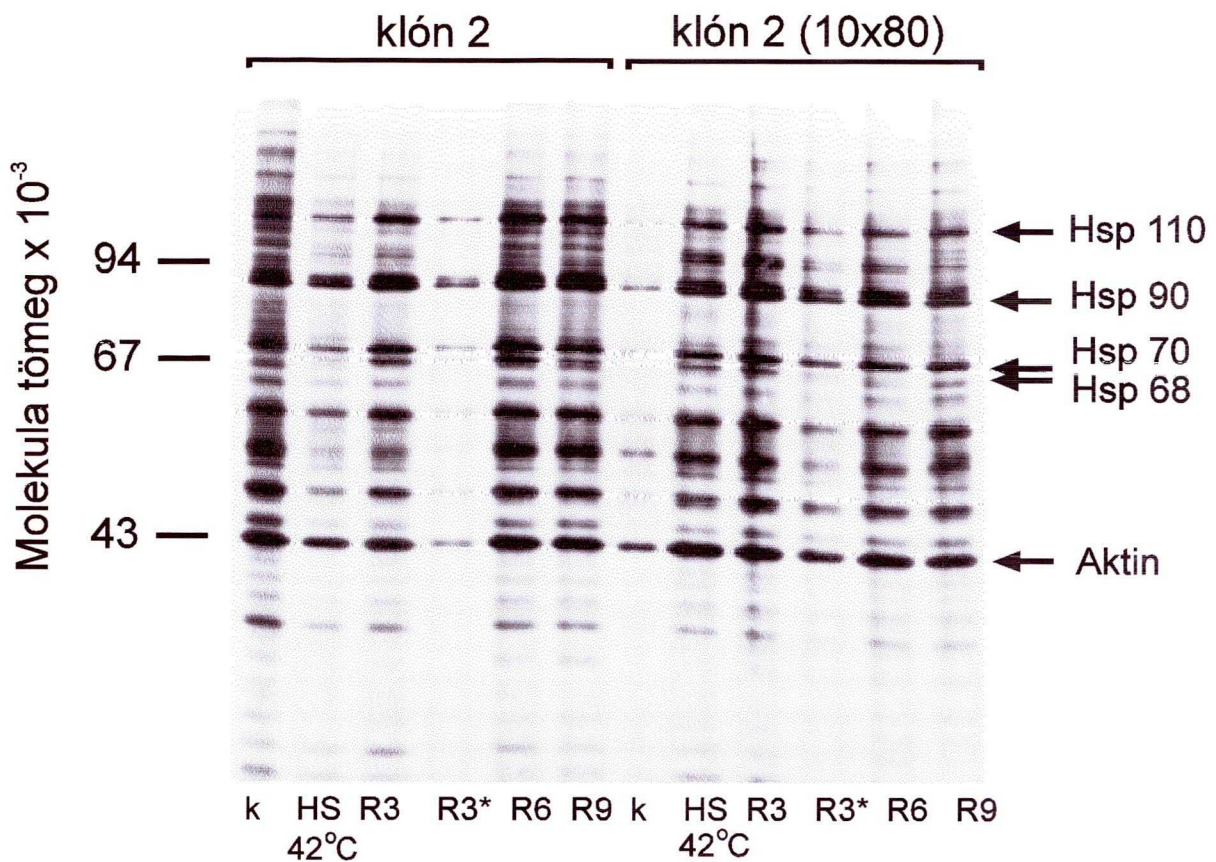
SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével molekulatömeg szerint elválasztottuk a fehérjemolekulákat (57., 58.).

Összehasonlítva a hőrezisztens sejtvonalak és a szülői sejtvonal fehérjemintázatát, megállapítottuk, hogy új hő-sokk fehérje nem jelent meg a hőrezisztensekben, a konstitutív hő-sokk fehérjék esetében azonban jelentős változásokat találtunk. A konstitutívan expresszálandó fehérjék közül a hsp110, 90 és 70 szintje megnövekedett valamennyi hőrezisztensben, legszembetűnőbb mértékben a klón 2(10x80) sejtben. A hőkezelést (42°C 3 óra) követően ezek a magas alapszintű konstitutív fehérjék jóval kisebb mértékben indukálódtak, mint a klón 2 sejtben (3. ábra).

Az indukció mértéke nem csak a konstitutív hő-sokk fehérjék esetében tér el a szülői sejtben tapasztaltaktól, hanem a hsp68 indukálható fehérje esetében is, amely jóval kisebb mértékben indukálódott a hőrezisztensekben. Ez a fehérje, mint korábbi vizsgálatainkból kiderült (4.), a klón 2 sejtvonalban csökkent indukálhatóságot mutat (deficiens) a klón 2 szülői sejtvonalával, a Faza 967 sejtrel összehasonlítva. Látható, hogy ez a csökkenés tovább folytatódott a hőrezisztens sejtvonalakban. Felmerült az a kérdés, hogy az indukcióban tapasztalt eltérések nem egyszerűen csak az eltérő indukciós kinetikának tulajdoníthatóak-e. A fehérjeszintézis kinetikáját hasonlóan határoztuk meg, mint az előző kísérletben, ³⁵S-metionin beépülését követtük nyomon az újonnan szintetizálódó fehérjékben, de ebben az esetben radioaktív pulzusjelölést alkalmaztunk, a hő-sokk ideje alatt és a felgyógyulási fázis alatt 3 órás periódusonként jelöltük a sejteket. A fehérjemintákat szintén egy dimenziós SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk (4. ábra). Látható, hogy bár a konstitutív fehérjék indukciója a hőrezisztensben erőteljesebb a hő-sokk alatt, a szülői sejtben a felgyógyulási periódus 3. órájában már meghaladja a hőrezisztensben látható szintet. A hsp68 indukciós kinetikája is eltérő a vizsgált sejtekben, a hőrezisztensben hasonlóan a konstitutív fehérjékhez, a hő-sokk alatt már szintetizálódik, de a későbbiekben szintje alatta marad a szülői sejtben látható szintnek. Ezen adatok alapján elmondható, hogy az enyhe, 42°C-os hőkezelés a hőrezisztens klón 2(10x80) sejtben ugyan gyorsabban váltja ki a hő-sokk fehérjék indukcióját, de az indukció mértéke alatta marad a hőérzékeny szülői sejtben tapasztalható értéknek mind a konstitutív fehérjék, mind pedig az indukálható hsp68 esetében, tehát a korábbi



3. ábra. 42 C-os, 3 órás hőkezelés hatása a hepatóma sejtek fehérje szintézisére. A sejteket a hőshokot követő 3 órában jelöltük ³⁵S-metioninnal, ezt követően fehérjét preparáltunk, s egy dimenziós gélelektroforézissel választottuk szét a fehérjéket. K - kontroll
42 C - hőshokolt sejtekből nyert minta



4. ábra. A hőstresszelt (42 C, 3 óra) sejtek fehérje szintézisének nyomon követése az idő függvényében.

A fehérjék jelöléséhez 35S-metionint adtunk 3 óras pulzusokban a hősokk és a felgyógyulás ideje alatt.

k - kontroll minta

HS 42 C - A hősokk ideje alatt jelölt minta

R3 - A felgyógyulás első 3 órájában jelölt minta

R3* - A felgyógyulás 2.5-3. órájáig jelölt minta

R6 - A felgyógyulás 3-6. órájáig jelölt minta

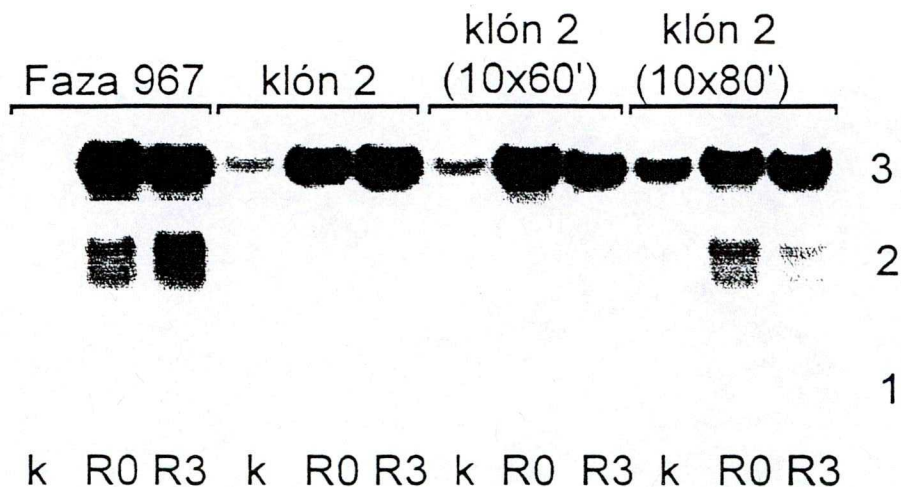
R9 - A felgyógyulás 6-9. órájáig jelölt minta

kísérletben tapasztalt csökkent mértékű indukció nem vezethető vissza a megváltozott kinetikára. Feltételezhetően az enyhe hő-sokk a hőrezisztens sejtben nem váltja ki a hő-sokk fehérjék maximális indukcióját, a védelemhez elégséges az eleve magasabb szintű konstitutív fehérjék és a hsp68 kisebb mértékű indukciója.

3.2.1.2. mRNS szintézis 42°C-os hőkezelést követően

Gyakran a sejtvonalak fehérjeszintézisében mutatkozó különbségek visszavezethetők translációs és/vagy transzkripciós kontrollbeli eltérésekre. Annak eldöntésére, hogy a sejtvonalaink esetében találunk-e ilyen eltéréseket, megvizsgáltuk, hogy a sejtjeinkben a mRNS szint mutat-e korrelációt a fehérjeszinttel. Ennek során össz-mRNS-t izoláltunk 42°C 3 órás hőkezelés után közvetlenül, illetve a felgyógyulási periódus 3. órájában a sejtekből. Northern-blot analízis alkalmazásával, és radioaktívan jelölt cDNS próbákkal (59., 60., 61.) követtük nyomon a hőérzékeny és hőrezisztens sejtekben a mRNS szintjét és indukciós kinetikáját (5.a, ábra). A hőindukálható hsp68 mRNS indukciója, hasonlóan, mint a fehérjéé, csökkent a klón 2 hőérzékeny sejtben, összehasonlítva a Faza 967 sejtrel, a hőrezisztens klón 2(10x60) sejtben ez az indukció még alacsonyabb értéket mutat, összhangban a fehérjeszintézissel. A klón 2(10x80) sejtben azonban a hsp68 mRNS indukciója jelentős mértékben megnövekedett a szülői sejthez viszonyítva, ellentmondva a fehérjeszint lecsökkenésének. Ez az eltérés a mRNS mennyisége és a róla szintetizálódó fehérje mennyiség között, magyarázható a mRNS stabilitásának megváltozásával, illetőleg egyéb, translációs szinten megvalósuló kontrollal.

A konstitutív hő-sokk fehérjék közül a hsp90 mRNS-ének szintézisét és indukciós kinetikáját vizsgáltuk. A hsp90 mRNS alapszintje megnövekedett a hőrezisztensekben és intenzíven indukálódott mind a hőérzékeny, mind a hőrezisztens sejtekben a hő-sokkot követően, amely adatok teljes összhangban állnak a fehérjeszintézis vizsgálatokor kapott eredményekkel. A hsp90 és a hsp68 mRNS-ének indukciós kinetikája kis mértékben megváltozott a hőrezisztensekben, hasonlóan a fehérjeszintézis kinetikájához.



5.a. ábra. A hepatóma sejtek mRNS szintézisének vizsgálata 42 C-os 3 órás hő-sokk kezelést követően. Northern-blot analízis segítségével választottuk szét az RNS mintákat, majd radioaktívan jelölt cDNS próbákkal hibridizáltuk őket.

1. Gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz

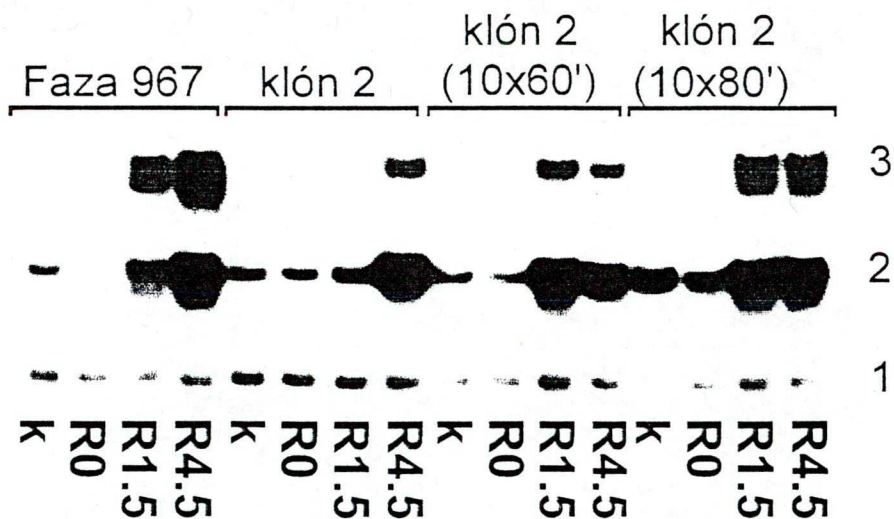
2. Hsp68 mRNS

3. Hsp90 mRNS

k - kontroll minta

R0 - A hő-sokk után közvetlenül preparált minta

R3 - A hő-sokk után 3 órával készült minta



5.b. ábra. Hepatóma sejtek stressz válaszáának vizsgálata mRNS szinten 45 C-os 15 perces hőkezelést követően. Az ábrán Northern-blot analízis eredménye látható a specifikus DNS próbákkal való hibridizálás után.

1. Gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz mRNS

2. Hsp90 mRNS

3. Hsp68 mRNS

k - kontroll minták

R0 - közvetlenül a hő-sokk után preparált minták

R1.5 - a hő-sokk után 1.5 órával preparált minták

R4.5 - a hő-sokk után 4.5 órával preparált minták

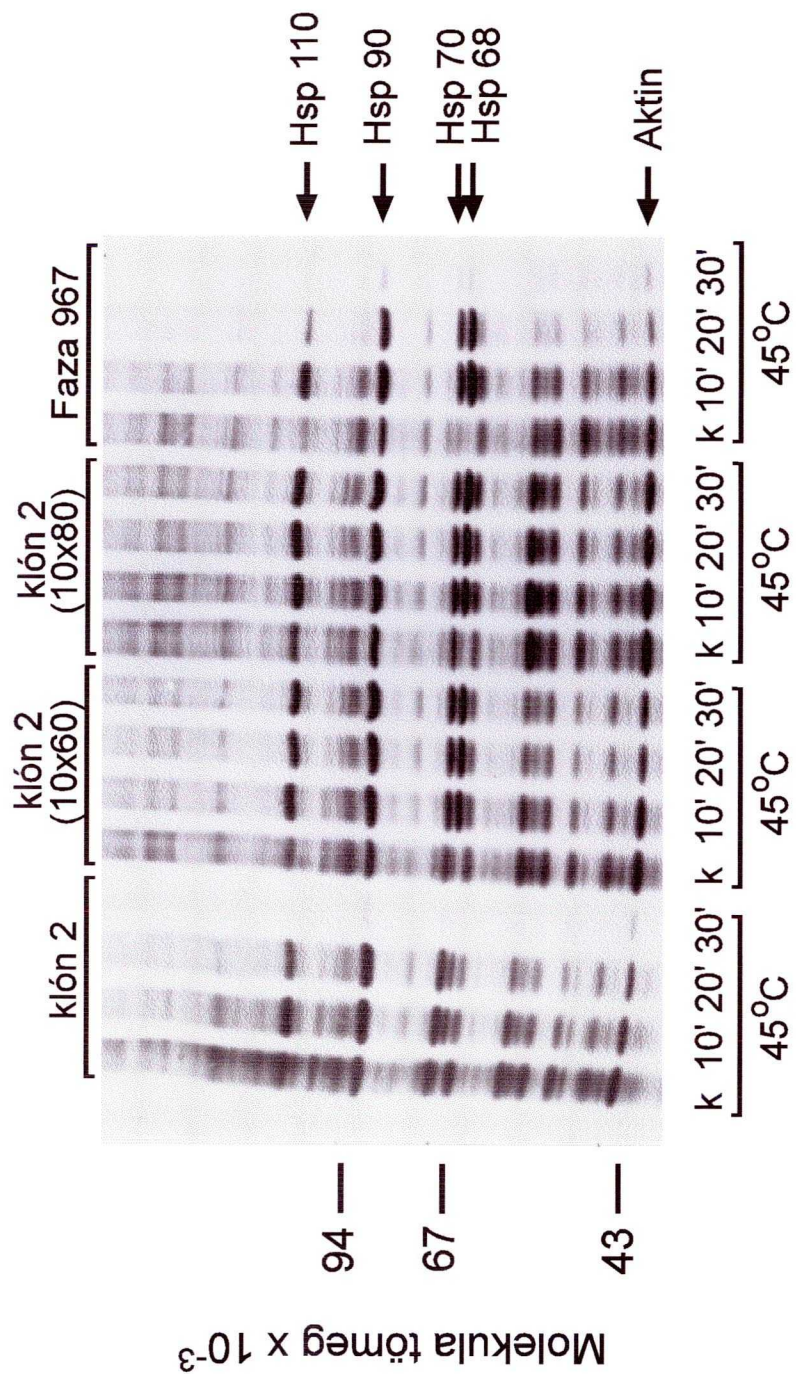
3.2.2. Stresszválasz erős, 45°C-os hőkezelést követően

3.2.2.1. A fehérjeszintézis vizsgálata

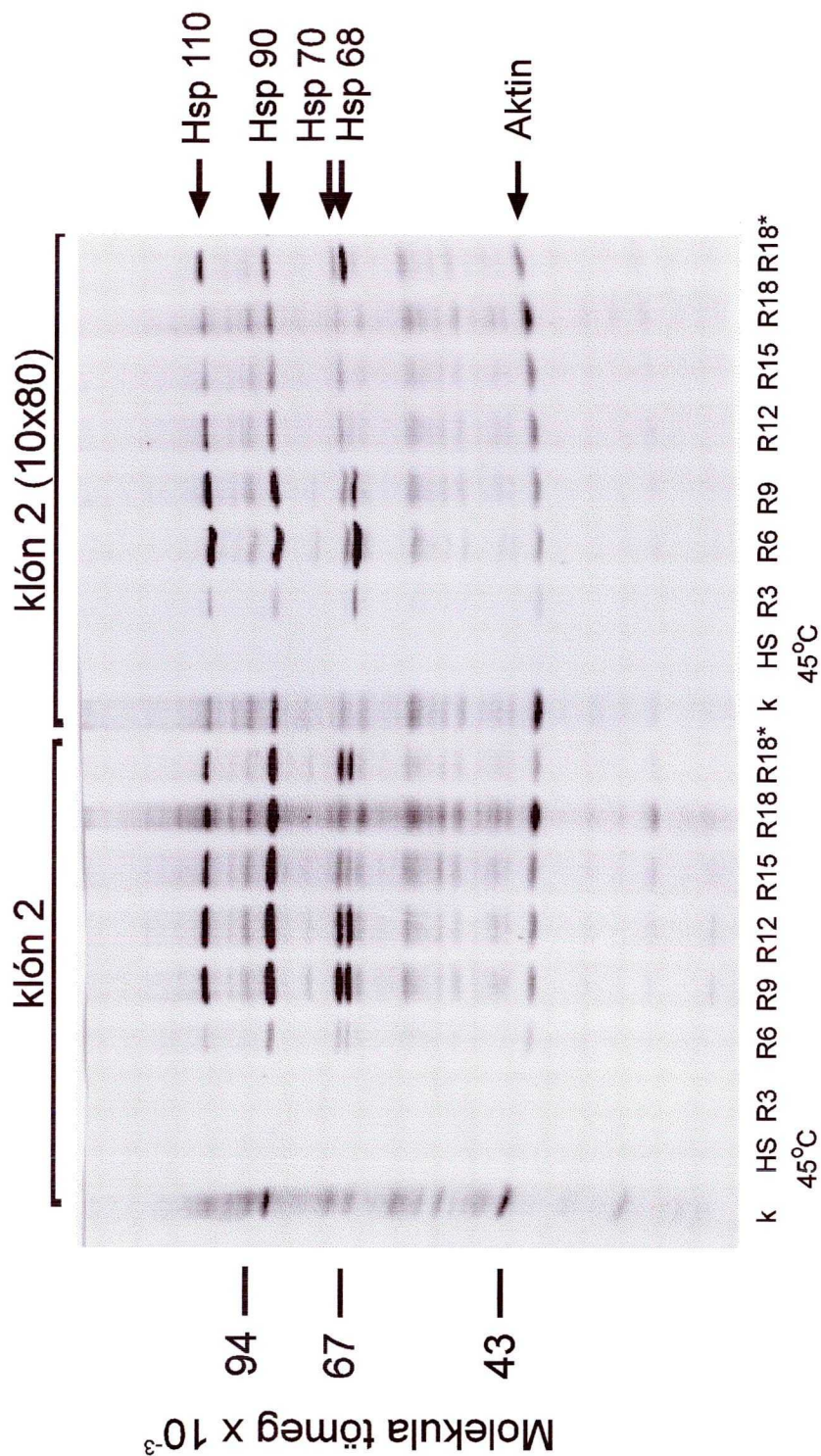
Az előző kísérletek adataiból látható, hogy gyenge hőkezelés hatására a hőrezisztensekben a hő-sokk fehérjék indukciója nem olyan intenzív, mint a hőérzékeny sejtvonalban. A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy erősebb hőkezelés hatására megváltozik-e az indukció mértéke, vagy ez a fehérjemennyiség elégséges az erősebb hőhatás kivédéséhez is. Mivel sejtvonalaink esetében a 45°C-os hőkezelés erős hő-sokknak számít, ezért kísérletünkben sejteinket ezen a hőmérsékleten kezeltük 10, 20 illetve 30 percen át, és az újonnan szintetizálódó fehérjéket ³⁵S-metioninnal jelöltük a hő-sokkot követő 18 órában. A fehérjemintákat egy dimenziós SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk. A 6. ábrán látható, hogy míg a két hőszenzitív sejt, a klón 2 és a Faza 967 fehérjeszintézisét a 30 perces hőkezelés szinte teljesen meggátolta, addig a hőrezisztensekben intenzív fehérjeszintézis folyik. A hsp68 indukciója deficiens maradt a klón 2 sejtben, a hőrezisztens sejtekben ez a deficiencia megszűnőben van, a klón 2(10x80) sejtben a hsp68 indukciója szinte eléri a Faza 967 sejtben tapasztalható indukciós szintet. Feltételezhető, hogy az erősebb hő-sokk hatásának kivédéséhez a hőrezisztens sejtvonalakban szükséges a hsp68 megnövekedett mennyisége is. A fehérjék indukciós kinetikáját hasonló módon vizsgáltuk, mint a 42°C -os kezelést követően. A sejteket 45°C-os 15 perces hőkezelés alatt, illetve az azt követő 18 órás felgyógyulási időszakban 3 órás periódusokban jelöltük ³⁵S-metioninnal. Azt tapasztaltuk, hogy hasonlóan, mint a 42°C-os kezelést követően, a hőrezisztens sejtekben az indukció korábban kezdődött és rövidebb ideig tartott, mint a hőérzékeny sejtben (7. ábra).

3.2.2.2. mRNS szintézis 45°C-os hőkezelést követően

Hasonló módszerrel vizsgáltuk a sejtek mRNS szintézisét és indukciós kinetikáját, mint a 42°C-os kezelést követően. Össz-mRNS mintákat izoláltunk 45°C-os 15 perces hő-sokkot követően, illetve a felgyógyulási fázisban, másfél



6. ábra. Növekedő időtartamú hőstressz hatása a hepatóma sejtek fehérjeszintézisére. Az izotópos (³⁵S-metionin) jelölést a hő-sokk után 19 órahosszat végeztük.
 k - kontroll
 45 C 10'-
 45 C 20'- hőstresszelt minták
 45 C 30'-



7. ábra. A fehérjeszintézis nyomonkövetése hőkezelést (45 C 15') követően pulzusjelöléssel.

k - kontroll

HS 45 C - 15' 45 C-os hőkezelés

R3 - A hőkezelést követő első 3 órában ³⁵S-metionin jelölés

R6 - A hőkezelést követő 3-6 óra. közötti időszakban,

R9 - A hőkezelést követő 6-9 óra. közötti időszakban,

R12 - A hőkezelést követő 9-12. óra közötti időszakban,

R15 - A hőkezelést követő 12-15. óra közötti időszakban,

R18 - A hőkezelést követő 15-18. óra közötti időszakban,

R18* - A hőkezelést követő 18 órahosszat történt a jelölés.

óránként. A hsp68 és hsp90 mRNS szintézisét követtük nyomon Northern-blot analízis segítségével (5.b, ábra).

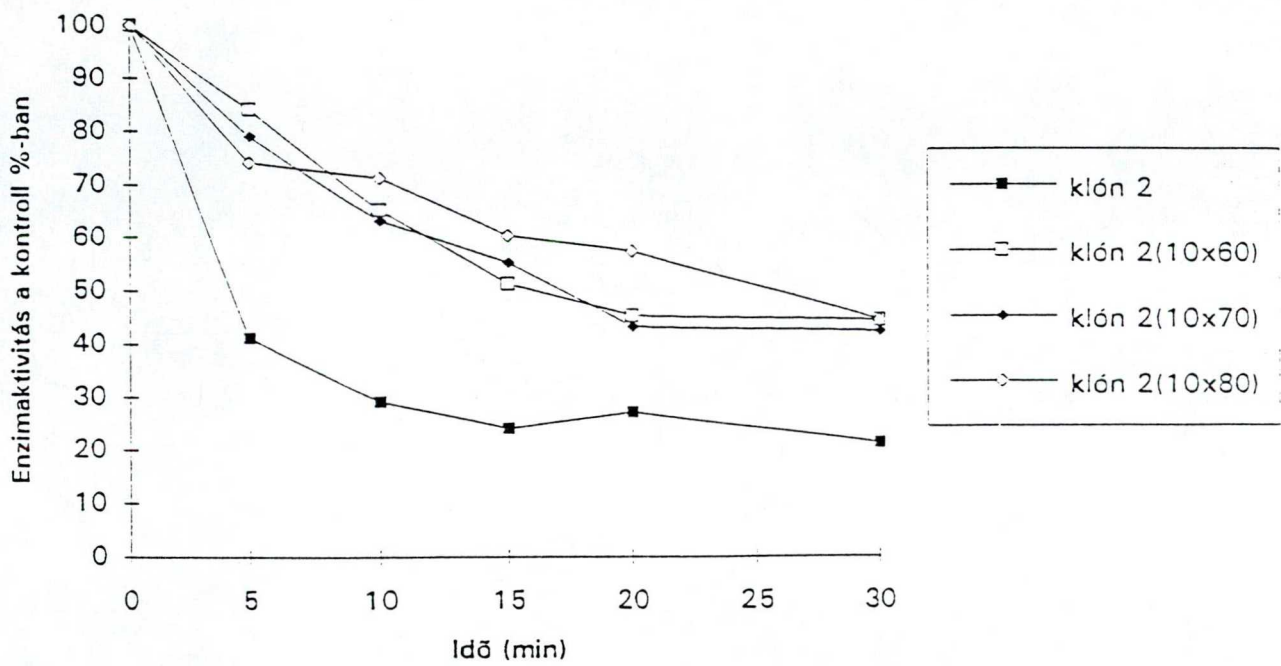
A fehérjeszintézis eredményeivel megegyezően, a hsp68 mRNS indukciója a klón 2 sejtben deficiens maradt, míg a hőrezisztensekben az indukció megnövekedett, bár a két sejtben különböző mértékben. A konstitutív hsp90 mRNS alapszintje a hőrezisztens sejtekben magasabbnak bizonyult és indukciója korábban kezdődött. Ezek az eredmények összhangban állnak a fehérjeszintézis vizsgálatának eredményeivel.

3.2.3. Hőérzékeny riporterfehérje stabilitásának vizsgálata

A következőkben arra kerestük a választ, hogy a hőrezisztens sejtekben megnövekedett konstitutív hő-sokk fehérjéknek (hsp110, 90 és 70) szerepük van-e a hőrezisztencia kialakításában, a többi fehérje hővel szembeni védelmében. Sejtvonalainkba transzfektálással bejuttattuk a citomegalovírus promóterét és a hőérzékeny luciferáz struktúrgént hordozó plazmidot (pCMVLuc) (62., 63.), amelynek enzimatis aktivitását követtük nyomon különböző idejű (5, 10, 15, 20 és 30 perces) 42°C-os hőkezeléseket követően. A sejtjeinkben átmenetileg expresszálódó luciferáz enzim ATP és Mg^{2+} jelenlétében két lépésben luciferinből oxyluciferint állít elő, a reakció végén AMP és CO_2 mellett foton szabadul fel, amelyet folyadék-szcintillációs mérőműszerrel mérhetünk, és amelynek intenzitása arányos az enzim mennyiségével (64.).

A 8. ábrán látható, a hőszenszitiv klón 2 sejtben a luciferáz aktivitása már 5 perc hőkezelést követően jelentősen lecsökkent, míg a hőrezisztens sejtvonalakban csak 20 perces hőkezelés után következett be hasonló mértékű aktivitáscsökkenés.

A fenti eredmény valószínűsíti, hogy hőrezisztens sejtjeinkben a konstitutív hő-sokk fehérjék megnövekedett mennyisége szerepet játszhat más fehérjék hővel szembeni védelmében, a hőrezisztencia kialakításában.



8. ábra. Hőérzékeny luciferáz enzim stabilitásának vizsgálata 42 C-os 5, 10, 15, 20 és 30 perces hőkezelést követően.

3.3. Hőrezisztens sejtek drogrezisztenciája

Az a tény, hogy néhány, az irodalomból ismert sejtvonalnál a hőérzékenység megváltozása együttjárhat különböző kemoterápiás szerekkel szembeni érzékenység megváltozásával, arra ösztönzött bennünket, hogy teszteljük hőrezisztenssé vált sejteink drogrézisztenciáját.

A munkacsoportunkban többféle eljárást alkalmaztunk a drogrezisztencia vizsgálatára (kolóniaképző képesség vizsgálata, a sejtek enzimikus aktivitásának nyomonkövetése XTT segítségével). Az elkövetkezőkben a Tripán-kék festési eljárással kapott eredményeket összegzem.

A Tripán-kék festéssel a sejtek viabilitását követtük nyomon 1, 2 és 3 napos drogkezelést követően. Különböző, a rákterápiában használatos drogok különböző koncentrációit alkalmaztuk, hogy megtaláljuk azt a koncentrációt, amely 50%-os növekedés gátlást idéz elő sejteinknél. Ezekkel a koncentráció értékekkel (IC₅₀) számszerűleg is jellemezhetővé vált sejteink drogrézisztenciája. Az 9.a, ábrán a három napos drogkezelést követően meghatározott IC₅₀ értékeket tüntettük fel, míg a 9.b, ábra a klón 2 IC₅₀ értékeihez viszonyított relatív rezisztencia értékeket tartalmazza a hőrezisztens sejtek esetében.

A táblázatok adataiból kitűnik, hogy a hőrezisztens sejtek ellenállóbbakká váltak a drogokkal szemben, mint a klón 2. Mind az öt alkalmazott kemoterápiás szerrel szemben kialakult rezisztencia, a sejtek multidrog rezisztensekké váltak, bár különböző mértékben.

Ezen adatok ismeretében számos új, megválaszolendő kérdés vetődött fel:

- A hőérzékeny sejtvonalból drogszelekcióval előállítható-e multidrog rezisztens sejtvonal, illetőleg a hőrezisztens sejtek meglévő multidrog rezisztenciája fokozható-e ily módon?

	Colchicin	Doxorubicin	Actinomycin D	Puromycin	Vinblastin
	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ug/ml	ng/ml
klón 2	56.2	74.2	4	0.8	11.7
klón 2(10x80)	106	212.5	20.8	6.4	29.8
klón 2(10x80)T1	135.7	698.7	30.7	9.1	60.7

9.a. ábra. A klón 2 sejt és hőrezisztens variánsainak IC50 értékei.

	Colchicin	Doxorubicin	Actinomycin	Puromycin	Vinblastin
klón 2	1	1	1	1	1
klón 2(10x80)	1.9	2.8	5.2	8	2.5
klón 2(10x80)T1	2.4	9.4	7.6	11.3	5.1

9.b ábra. Relatív rezisztencia értékek.

- A drogszelekcióval előállított drogrezisztens sejtek hőrezisztensekké válnak-e?

- Mi a drogrezisztencia kialakulásának az oka, kimutatható-e változás a rezisztensek hő-sokk fehérje szintézisében?

3.4. Drogrezisztens sejtvonalak izolálása és jellemzése

A kérdések megválaszolásához első lépésként drogrezisztens sejtek izolálását kezdtük meg. Fokozatosan növekvő koncentrációjú colchicinen növesztettük a sejteket (klón 2 és hőrezisztens variánsai) az 1000 ng/ml végkoncentráció eléréséig. Az izolálást követően ezeket a sejtvonalatokat, a klón 2c1000, klón 2(10x80)c1000 és klón 2(10x80)T1c1000 sejteket 1000 ng/ml colchicint tartalmazó tápfolyadékban neveltük.

3.4.1. Drogrezisztencia tesztelése

Hasonló módon állapítottuk meg a colchicinre szelektált sejtek esetében az IC50 értékeket, mint a hőrezisztens sejtek esetében. A 10.a, ábra az IC50 értékeket tünteti fel, míg a 10.b, ábra a relatív rezisztencia értékeket mutatja.

Az eredményekből kitűnik, hogy valamennyi sejtvonala jelentős mértékben rezisztenssé vált colchicinre, a többi kemoterápiás szerrel szemben pedig keresztrezisztenciát mutatnak. A sejtek keresztrezisztencia mintázata eltér egymástól, a különböző drogokra eltérő mértékben váltak rezisztenssé. A legnagyobb mértékű rezisztencia a puromycinnel szemben alakult ki a sejtekben, míg a hőrezisztens sejtekből származtatott drogrezisztens sejtek (klón 2(10x80)c1000 és klón 2(10x80)T1c1000) a vinblasztinnal szemben bizonyultak a legérzékenyebbeknek.

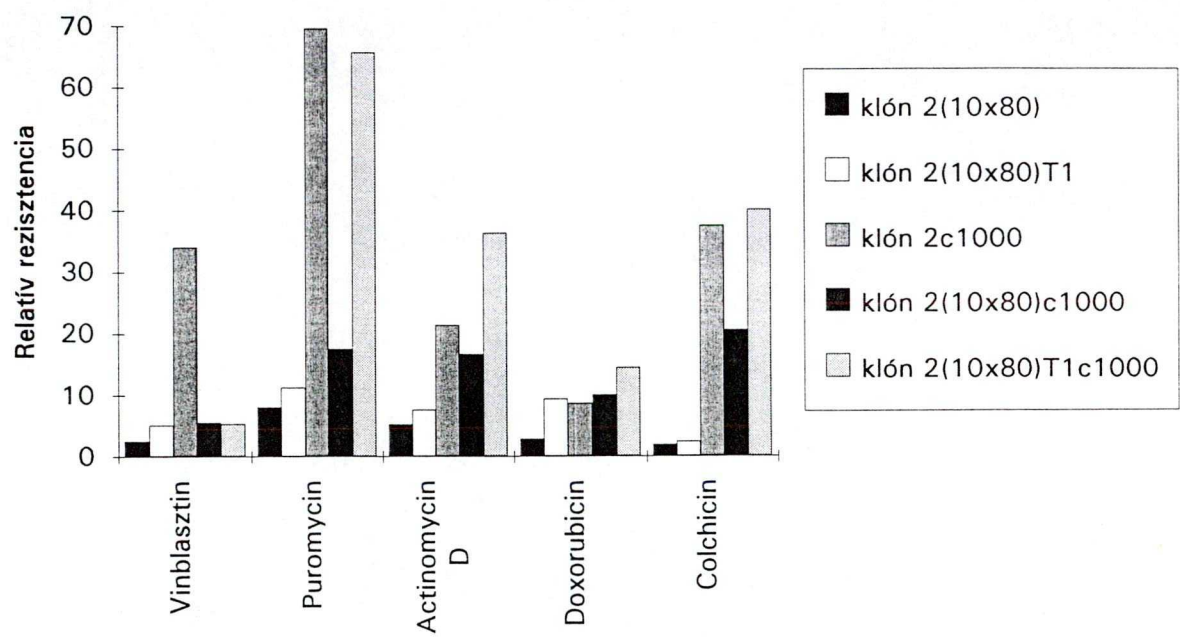
	Colchicin	Doxorubicin	Actinomycin D	Puromycin	Vinblastin
	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ug/ml	ng/ml
klón 2	56.2	74.2	4	0.8	11.7
klón 2c1000	2102.6	650	85.2	55.6	400
klón 2(10x80)c1000	1157.5	800	67	14	66.2
klón 2(10x80)T1c1000	2290	1080	145.2	52.5	62.2

10.a. ábra. A klón 2 sejt és a colchicin rezisztens sejt vonalak IC50 értékei.

	Colchicin	Doxorubicin	Actinomycin	Puromycin	Vinblastin
klón 2	1	1	1	1	1
klón 2c1000	37.4	8.7	21.3	69.5	34
klón 2(10x80)c1000	20.5	10.7	16.7	17.5	5.6
klón 2(10x80)T1c1000	40.7	14.5	36.3	65.6	5.3

10.b ábra. Relatív rezisztencia értékek.

Összehasonlítva a drogrezisztens sejtvonalak relatív rezisztencia értékeit a hőrezisztens sejtvonalak relatív rezisztencia értékeivel (11. ábra), láthatjuk, hogy a colchicinen történt szelekció jelentősen megnövelte a sejtek drogrezisztenciáját.



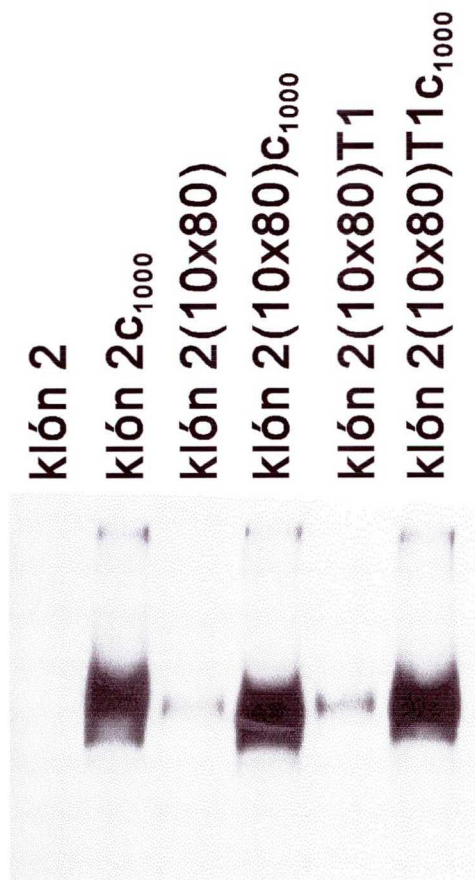
11. ábra. Hőrezisztens és colchicin rezisztens hepatoma sejtvonalak relatív rezisztencia értékei.

3.4.2. Hőrezisztencia tesztelése

A hőérzékeny klón 2 sejtvonalból előállított colchicin rezisztens sejtvonali hőérzékenységet különböző idejű 45°C-os hőkezelést követő kolóniaképző képesség vizsgálatával ellenőriztük. A klón 2c1000 sejtvonali ugyanolyan hőérzékeny maradt, mint a klón 2 sejt, vagyis a drogrezisztencia kialakulása nem járt együtt hőrezisztencia kialakulásával. Ezt az állítást támasztja alá a drogrezisztens sejtek 45°C-os stresszválaszának vizsgálata is. A drogrezisztens sejtek fehérjemintázatát összehasonlítva a szülői sejtekével, nem találtunk változást sem a konstitutív fehérjék szintjében, sem pedig az indukálható hő-sokk fehérjék indukációjában, vagyis sejtjeinkben a drogrezisztencia kialakulása nem kapcsolható a hő-sokk fehérjék szintézisének megváltozásához.

3.4.3. P-glikoprotein szint vizsgálata

Az irodalomból ismert adatok szerint számos esetben a multidrog rezisztencia kialakulásáért a P-glikoprotein szint megnövekedése a felelős. Megvizsgáltuk sejtjeinkben a P-glikoprotein termelődést Western-blot analízis (65.) segítségével, a humán *mdr1* fehérje ellen izolált poliklonális ellenanyag felhasználásával. A klón 2 sejtben nem, de az összes drogrezisztens sejtvonalunkban szintetizálódott P-glikoprotein, a csak hőrezisztens sejtekben jóval kisebb mennyiségben, mint a colchicinre szelektált sejtvonalakban (12. ábra). Feltételezhető, hogy a csak hőrezisztens sejtekben tapasztalható csökkentebb mértékű multidrog rezisztencia a csökkentebb, kisebb mennyiségben jelenlevő P-glikoproteinek köszönhető, míg a colchicin rezisztensekben a jóval nagyobb mennyiségű P-glikoprotein jelentősen megnövelte a rezisztencia mértékét.



12. ábra. Patkány hepatóma sejtek P-glikoprotein alapszintjének vizsgálata Western-blot analízis segítségével.

3.5. Apoptózis indukciója drogszenzitív és drogrezisztens sejtekben

Az előzőekben láthattuk, hogy mind a hőrezisztens, mind pedig a colchicinre szelektált hepatóma sejtvonalkaink multidrog rezisztensek lettek. Ez a rendszer kiválóan modellezi a klinikumban kialakuló rendszert, amikor is a kemoterápiás kezelések során a tumor sejtek rezisztensekké válhatnak. A multidrog rezisztencia kialakulásának számos mechanizmusa létezik, mint például sejtvonalkaink esetében a P-glikoprotein szintjének megnövekedése a drogrezisztens sejtekben. Elképzelhető, hogy ezektől a mechanizmusoktól függetlenül a drogrezisztencia kialakulásában az apoptózis indukciójában, vagy szabályozásában létrejövő változások is szerepet játszhatnak. Az apoptózis genetikailag programozott sejthalál, amely fontos szerepet játszik a szervezet homeosztázisának fenntartásában, hiányában tumor alakulhat ki, vagy hosszan fennmaradó virális fertőzés, míg az intenzív, kontrollálatlan apoptózis fejlődési és degeneratív megbetegedésekhez vezethet (52.). Az apoptózis kiváltása szabályozott körülmények között a megfelelő tumoros sejtekben fontos része lehetne a rákterápiának.

Kísérleteink az elkövetkezőkben arra irányultak, hogy megtudjuk, hogy hepatóma sejtjeinkben ép-e az apoptotikus apparátus, kiváltható-e különböző kezelésekkel (kemoterápiás szerekekkel, szérum megvonással) apoptózis, illetve az indukció tekintetében hasonlóan viselkednek-e a különböző drogrezisztenciával rendelkező sejtek.

3.5.1. Apoptózis meghatározása morfológiai jegyek alapján

Az irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy az apoptózis morfológiailag jól jellemzett folyamat. Vizsgálataink kezdetén elsősorban morfológiai jegyek alapján határoztuk meg azokat a paramétereket, amelyeknek alkalmazásával apoptózis

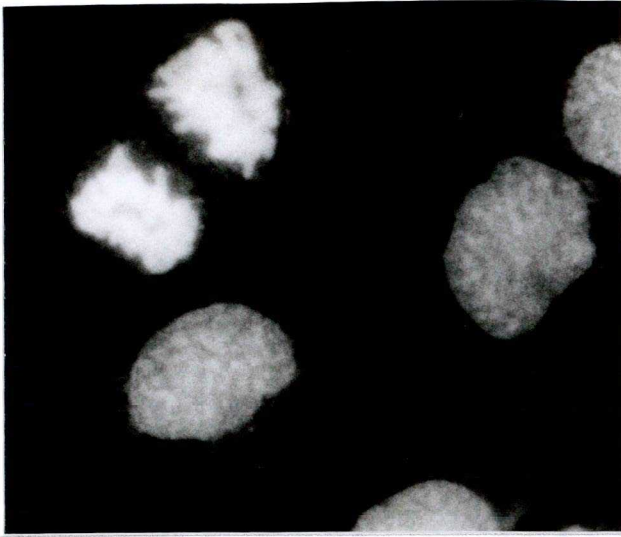
indukálható sejtvonalainkban. Különböző idejű (1, 2 és 3 napos) kemoterápiás kezeléseket követően a letapadt sejteket metanollal fixáltuk, majd propidium-iodiddal (5ug/ml) festettük, amely ultraibolya fényben gerjesztődik és elsősorban a kétszálú DNS-hez kötődik. Mivel ezzel a módszerrel a Petri-csésze aljáról levált, a tápfolyadékban úszó sejteket nem tudtuk megfesteni, a propidium-iodidos festéssel párhuzamosan Giemsa festést is alkalmaztunk. A Petri-csészék aljáról tripszinezéssel leválasztott, valamint a tápfolyadékban úszó sejteket cytospinnel történő fugalás után metanollal fixáltuk, majd 10%-os Giemsa-oldattal festettük.

Mikroszkópos elemzések során megállapítottuk, hogy sejtjeinknél is el tudjuk különíteni az irodalomból ismert morfológiai osztályokat (13. ábra). A továbbiakban az apoptózis különböző stádiumainak elkülönítésére a finomabb felosztást lehetővé tevő propidium-iodidos festést választottuk, míg a nekrosis arányt a Giemsa festésből számoltuk. Az egyes kezeléseket követően statisztikusan meghatároztuk az apoptózisos, illetve a nekrotikus sejtek arányát a teljes sejtszámhoz viszonyítva. A 14. ábrán láthatóak a 3 napos drogkezelés hatását összefoglaló eredmények.

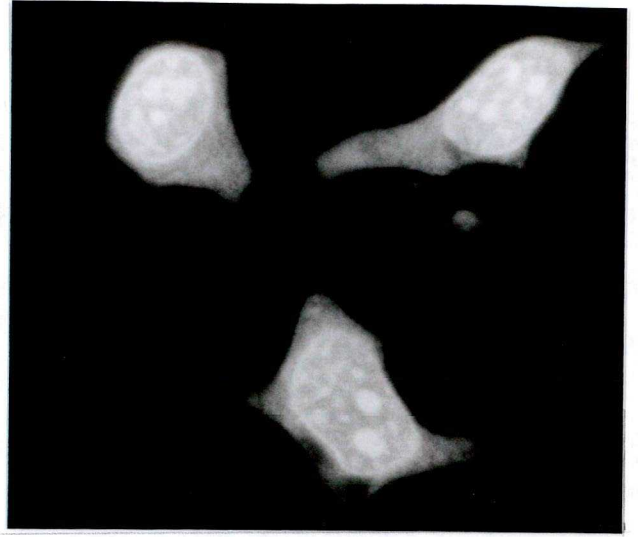
3.5.1.1. Apoptózis indukciója kemoterápiás szerekkel

Látható, hogy valamennyi vizsgált sejtvonalunkban indukálható az apoptózis kemoterápiás kezeléssel. A drog- és hőszenzitív klón 2 sejtben kontroll körülmények között nagyon alacsony mind a nekrotikus, mind az apoptózisos sejtek aránya, alacsony a spontán apoptotikus ráta. Mindegyik kemoterápiás szerrel indukálható volt apoptózis, koncentráció függő módon, magas százalékban (50% körüli) apoptózist az IC₅₀ értékek négyszerese -ötszöröse váltott ki, míg a nekrosis mértéke közel azonos (10-15%) maradt.

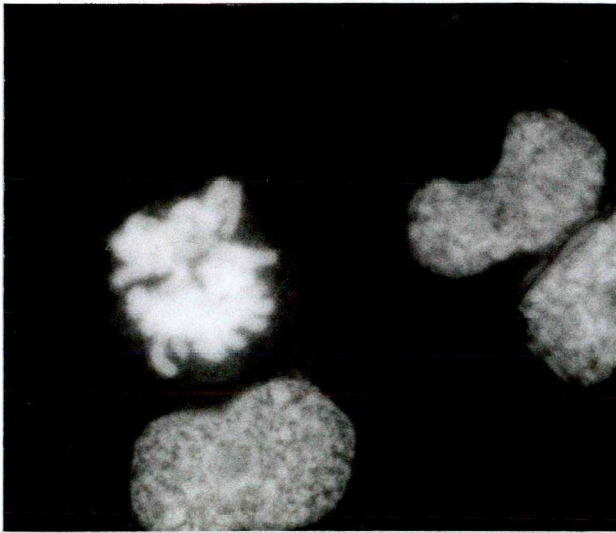
A hőrezisztens és mérsékelten drogrezisztens sejt, a klón 2(10x80)T1 esetében magas százalékban lehetett kiváltani apoptózist már az IC₅₀ koncentráció körüli értékkel a vinblasztin és a doxorubicin esetében, míg a három másik drog esetében az apoptózis alacsony értéken maradt. Hasonló tendenciát figyelhetünk meg az itt nem ábrázolt másik hőrezisztens sejt, a klón 2(10x80) esetében is, az actinomycin D kivételével, amely ennél sejténél IC₅₀ koncentrációnál a vinblasztinhoz és doxorubicinhez hasonlóan magas értéket mutat.



Klón 2 Kontroll



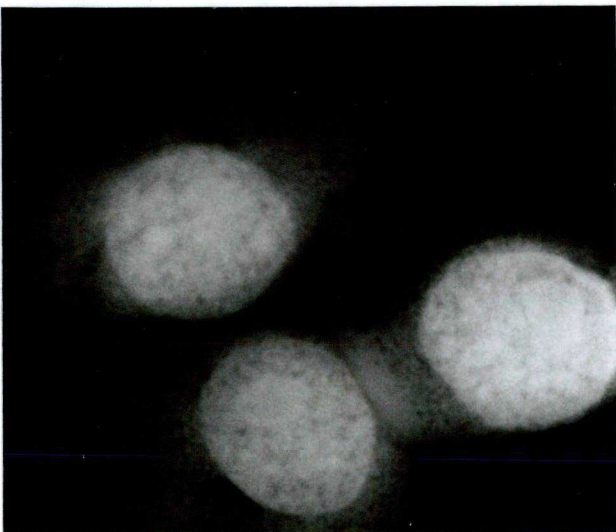
Klón 2 12ng/ml vinblasztin



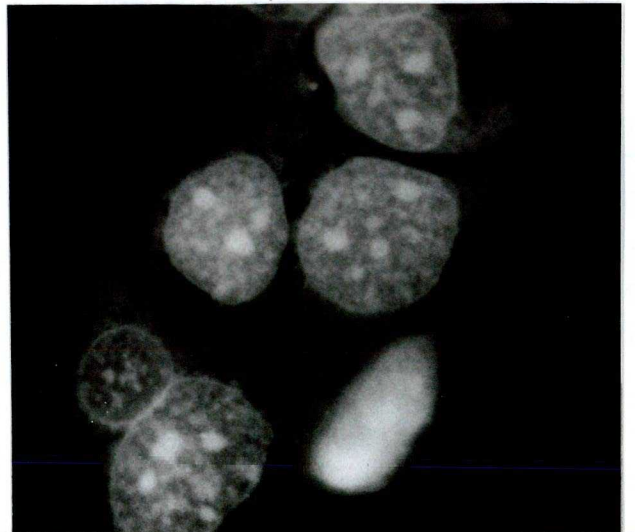
Klón 2(10x80)T1 Kontroll



Klón 2(10x80)T1 60ng/ml vinblasztin



Klón 2(10x80)T1c1000 Kontroll

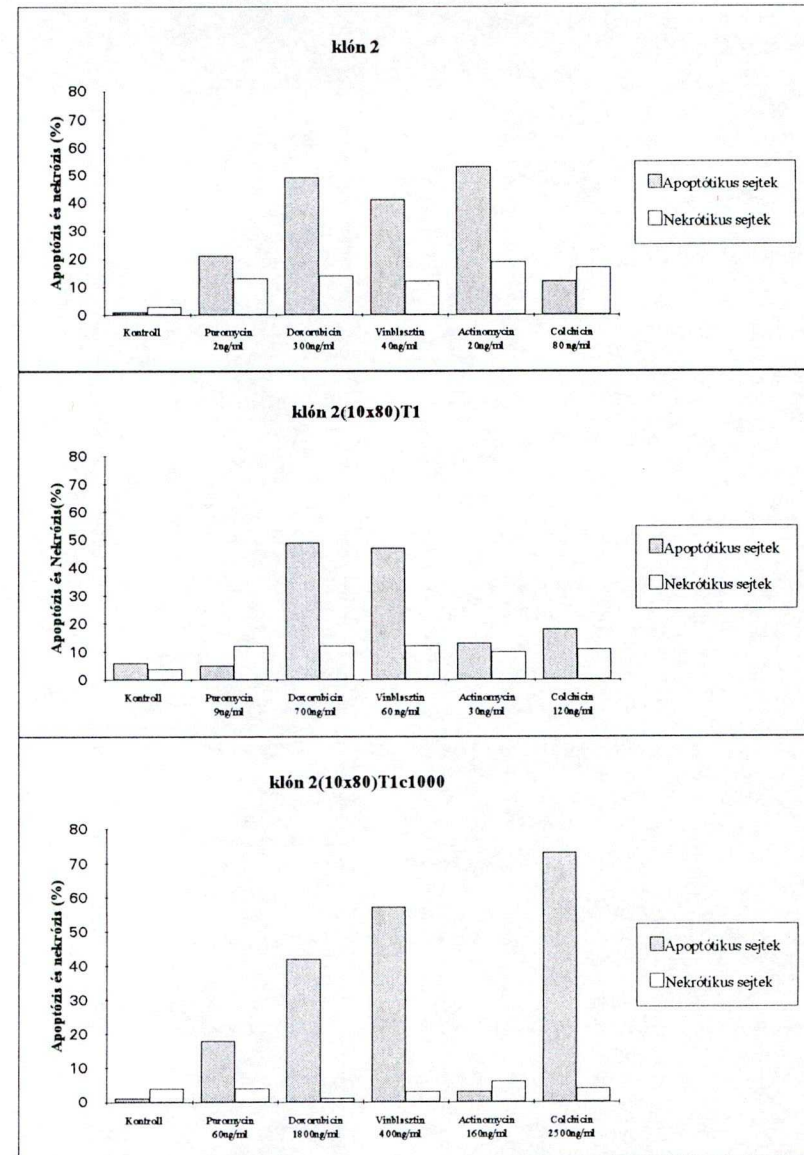


Klón 2(10x80)T1c1000 400ng/ml
vinblasztin

13. ábra. Hepatoma sejtek morfológiája propidium-iodidos festést követően.

klón 2		
	Apoptótikus sejtek	Nekrotikus sejtek
Kontroll	1	3
Puromycin 2ug/ml	21	13
Doxorubicin 300ng/ml	49	14
Vinblasztin 40ng/ml	41	12
Actinomycin 20ng/ml	53	19
Colchicin 80 ng/ml	12	17
klón 2(10x80)T1		
	Apoptótikus sejtek	Nekrotikus sejtek
Kontroll	6	4
Puromycin 9ug/ml	5	12
Doxorubicin 700ng/ml	49	12
Vinblasztin 60 ng/ml	47	12
Actinomycin 30ng/ml	13	10
Colchicin 120ng/ml	18	11
klón 2(10x80)T1c1000		
	Apoptótikus sejtek	Nekrotikus sejtek
Kontroll	1	4
Puromycin 60ug/ml	18	4
Doxorubicin 1800ng/ml	42	1
Vinblasztin 400ng/ml	57	3
Actinomycin 160ng/ml	3	6
Colchicin 2500ng/ml	73	4

14. ábra.
Apoptózis és nekrosis a hepatoma sejtekben
kemoterapiás szerek hatására.



A hőrezisztens és egyben magas fokú drogrezisztenciát mutató sejtek esetében, mint például a klón 2(10x80)T1c1000 sejt, természetesen jóval magasabb koncentrációjú kezelésekre volt szükség az apoptózis indukciójához. Colchicin és doxorubicin az IC50 koncentráció körüli értéknél már elég magas százalékban kivált apoptózist, míg ez a többi kezelés esetében elég alacsony értéken marad, a vinblasztin ebben az esetben csak kb. hatszoros IC50 koncentrációban okoz 50%-nál magasabb apoptózist.

Az itt be nem mutatott klón 2(10x80)c1000 sejtben csak colchicinnel lehet magas százalékban apoptózist kiváltani IC50 körüli koncentráció esetében. A hőszenszitiv szülői sejtől drogszelekcióval előállított klón 2c1000 sejt esetében a doxorubicin, a vinblasztin, valamint az actinomycin D IC50 körüli koncentrációban igen jó apoptózist indukáló ágenseknek bizonyultak.

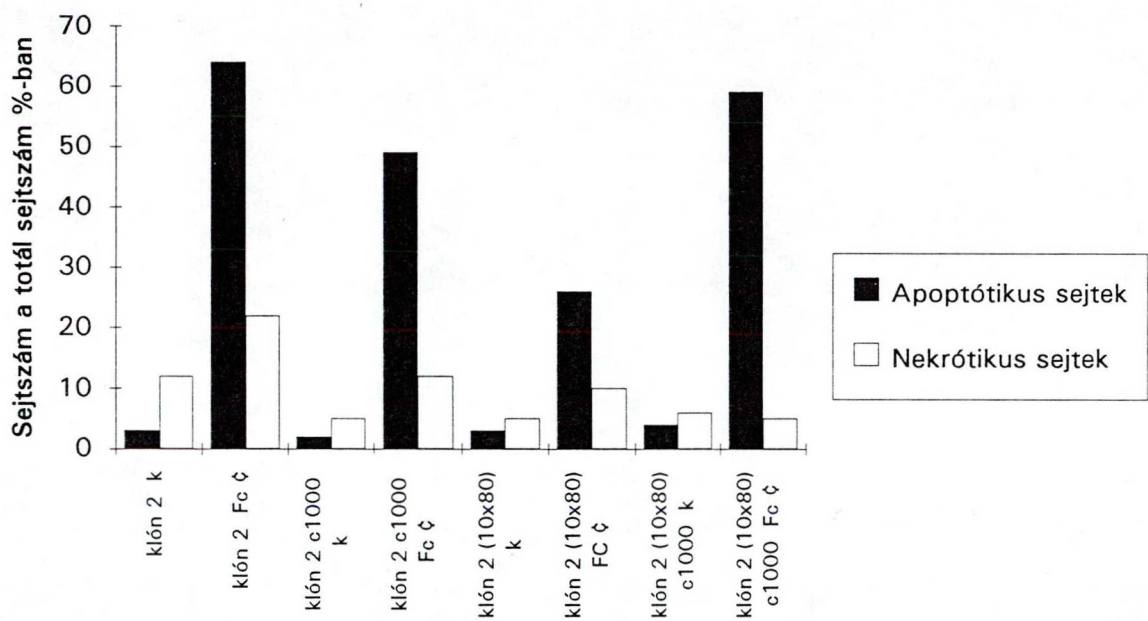
A fenti adatokból látható, hogy sejtjeinkben nem azonos módon váltható ki apoptózis, valamint a kemoterápiás szerek indukációs képessége is eltérő. A doxorubicin és a vinblasztin a sejtvonalak zöménél magas százalékban képes volt indukálni apoptózist, míg a puromycin egyik sejtvonalon sem indukált nagyarányú programozott sejthalált.

3.5.1.2. Apoptózis indukciója szérumban megvonással

A szérumban megvonása, vagyis a növekedési faktor megvonásának vizsgálatakor a sejteket szérumban tápfolyadékban neveltük 1, 2 és 3 napig. Hasonlóan, mint a kemoterápiás kezeléseknél, a sejteket propidium-iodiddal és Giemsa-oldattal festettük, majd mikroszkóposan vizsgáltuk a sejt morfológiát. A 15. ábrán láthatóak a 3 napos szérumban megvonást követően származó adatok. A szérumban megvonás valamennyi sejtvonalonknál indukált apoptózist, a sejtvonalak érzékenysége kis mértékben eltért egymástól.

3.5.2. FACS analízis alkalmazása apoptózis kimutatására

Sejtvonalainkban az apoptózis nyomonkövetése a morfológiai változások megfigyelésével rendkívül idő- és munkaigényes folyamatnak bizonyult.



15. ábra. Apoptózis és nekrosis a hepatoma sejtekben szérummegvonás hatására.

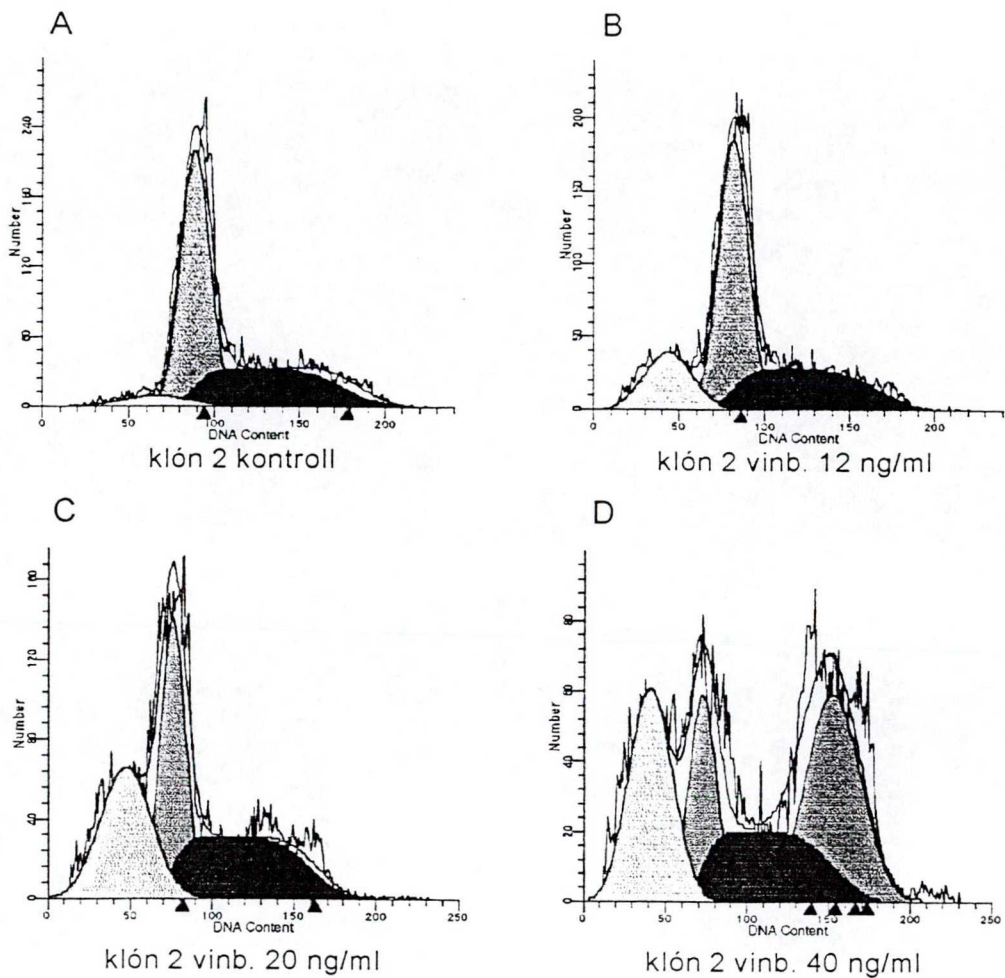
Munkánkat meggyorsítandó, új metódus, a FACS analízis alkalmazását kezdtük meg az apoptózis gyors kimutatására sejtvonalainkban.

A FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) analízis során az előzetesen fluoreszcens festékkel vagy reagenssel specifikusan megfestett sejtek, vagy sejtalkotók által generált optikai vagy elektromos szignál kerül elemzésre. Az áramlási citométerben (flow cytometer) a szuszpenzióban levő sejtek fókuszált lézer vagy nagy nyomású ívlámpa előtt haladnak el, a sugár útjának keresztezésekor a lézersugár szórt fényt és fluoreszcens fényt generál, amelyet a fotodetektor gyűjt össze. A fotodetektor az optikai szignállal arányos elektromos jelet indukál. A szórt fény mérésével információt kaphatunk a sejt méretéről, belső struktúrájáról. A fluoreszcens festékek alkalmazása megnövelte a módszer érzékenységét, a számos specifikusan kötődő ellenanyag egyre több sejtalkotó kimutatását teszi lehetővé (66.).

A FACS analízis alkalmas a sejtek DNS tartalmának a mérésére is. Láthattuk az irodalmi adatokból, hogy az apoptótizáló sejtek kromatin állománya csökken, a sejt zsugorodik a sejthalál folyamatának előrehaladtával. Kísérleteinkben mi is a sejtek DNS tartalmának csökkenését próbáltuk nyomonkövetni kemoterápiás szerekkel történő kezeléseket követően.

Kísérletünk során a klón 2 szülői sejtvonalat különböző koncentrációjú (12ng/ml; 20ng/ml; és 40ng/ml) 24 órás vinblasztin kezelést követően Triton X-100 oldattal permeabilizáltuk, majd 10ug/ml propidium-iodiddal festettük. A méréseket Becton Dickinson FACStar készüléken végeztük, az eredmények kiértékelésében a ModFit analízáló programot használtuk.

A vinblasztin kezelés következtében jelentős mértékben megnőtt a szub-G₁ fázisban levő sejtek aránya a populációban, amely arra utal, hogy számos sejt a drogkezelés következtében vesztett DNS tartalmából, vagyis apoptótizált (16.ábra). Látható, hogy koncentrációfüggő módon a koncentráció növelésével a populáció egyre nagyobb százalékában következett be programozott sejthalál. A G₀/G₁ fázis folyamatosan csökkent a koncentráció növelésével 57%-ról 18%-ra. Az S fázis esetében a legnagyobb koncentrációnál tapasztaltunk nagyobb mértékű csökkenést. A G₂/M fázis extrém mértékben megnőtt a 40ng/ml-es koncentrációnál, úgy tűnik, a sejtek jelentős százaléka G₂ fázisban maradt. A FACS analízis segítségével meghatározott apoptózis % összevethető volt a



	G0/G1	G2/M	S	Szub-G1
Kontroll	57	5	33	5
Vinb 12ng/ml	54	0.2	31	14.8
Vinb 20ng/ml	37	0.2	36	23.8
Vinb 40ng/ml	18	36	24	22

16. ábra. DNS tartalom mérése FACS analízis segítségével a klón 2 sejtben 24 óráig 12 ng/ml, 20 ng/ml és 40 ng/ml vinblasztin kezelést követően. A táblázat a sejtciklus különböző fázisának százalékos megoszlását tartalmazza.

fénymikroszkópos mérések adataival, bár feltehetőleg a legkorábbi apoptózis morfológiát mutató sejtek, amelyekben a DNS fragmentálódás megkezdődött, de még a sejttérfogat nem csökkent, nem mutathatók ki ezzel a módszerrel. A későbbi kísérleti eredmények is azt sugallják, hogy a FACS analízis jó korrelációt mutat sejteink esetében a kemoterápiás szerek kiváltotta DNS tartalom csökkenésével, illetőleg kimutathatók a sejtciklusban bekövetkező változások. A későbbiek során az apoptózis regulációjában fontos szerepet játszó makromolekulák kimutatását tervezzük specifikus, fluoreszcens konjugátumot tartalmazó ellenanyagok segítségével.

4. A tézisek összegzése

Kísérleti eredményeinket összegezve elmondhatjuk, hogy sikerült stabil hőrezisztens sejtvonalkat előállítanunk eltérő fenotípusú patkány hepatóma sejtvonalakból. A legnagyobb fokú hőrezisztenciát mutató sejtvonalak (klón 2 leszármazottai) morfológiailag megváltoztak, míg differenciációs állapotuk hasonló maradt a szülői sejtvonaleéhoz.

A kialakult hőrezisztencia tulajdonságait vizsgálva illetve okait kutatva a következő eredményekre jutottunk:

A hőrezisztens sejtekben a konstitutív hsp110, 90 és 70 alapszintje megnövekedett a klón 2 sejttel összehasonlítva. A hőrezisztencia kialakulásában valószínűleg ezen fehérjék megnövekedett konstitutív szintjének jut a legfontosabb szerep, hiszen ezen fehérjék képesek megvédeni más fehérjéket, például a luciferázt, a hő okozta stressztől, így növelve a sejt túlélési képességét is.

A korábbi eredmények szerint, a szülői klón 2 sejtben enyhe, 42°C-os hőkezelést követően a hsp68 indukciója deficiensnek bizonyult a Faza 967 sejthez viszonyítva. A hőrezisztens sejtvonalkainkban hasonló, enyhe hő-sokkot követően még a szülőinél is lényegesen kevesebb hsp68 indukálódott. Ez arra utal, hogy a hőrezisztens sejtekben egy ilyen szintű hőkezelés nem vált ki igazi sokkot. Ez érthető is, ha figyelembe vesszük az előzőekben említett hő-sokk fehérjék megnövekedett konstitutív szintjét. A feltételezéseink szerint ilyen enyhe - de a szülői sejtekben jelentős változásokat okozó - hőkezelés hatását a hőrezisztens sejtekben éppen ezek a folyamatosan jelenlévő hő-sokk fehérjék kompenzálják, szükségtelenné téve, más hővel szembeni védelmi mechanizmusok beindulását. Ezt támasztja alá az is, hogy hőrezisztens sejtjeinkben erős, 45°C-os hőkezelést követően a hsp68 indukció nagy mértékben megnövekedett, olyannyira, hogy még a szülőre jellemző indukciós deficiencia is szinte teljesen megszűnt. Ez véleményünk szerint azt mutatja, hogy a hőrezisztens sejtjeinkben továbbra is

működnek a hő-sokk hatására beinduló mechanizmusok, csak a hő-sokként megélt hőmérsékleti szint emelkedett meg a már említett konstitutív hő-sokk fehérjék (hsp110, 90, 70) védő funkciója révén.

A konstitutív hő-sokk fehérjék esetében mindkét típusú hőstresszt követően a mRNS és a róla átíródó fehérjék szintje arányos volt egymással.

Más volt a helyzet a hsp68 fehérje indukciója során. Itt 42°C-os hőkezelést követően a hőrezisztens klón 2(10x80) sejtvonalon a hsp68 mRNS szintje jóval magasabb volt, mint a szülői klón 2-ben, ezzel szemben a fehérje pont fordítva, csökkentebb indukciót mutatott. Ez alapján feltételezhető, hogy a hsp68 fehérje szintje transzlációs kontroll következtében csökkent le. A 45°C-os hőkezelést követően azonban a hsp68 mRNS szintje és a fehérje indukciós szintje újra arányban állt egymással, ami arra utal, hogy a fehérjék átíródását kontrolláló mechanizmus tényleges hő-sokként megélt stressz hatására megszűnik. Szeretnénk felhívni a figyelmet arra, hogy a hsp68 megjelenése nem okolható egyértelműen a hővel szembeni ellenállóképesség megnövekedéséért, mert például a hőérzékeny Faza 967 sejtben is nagy mennyiségben indukálódik.

Összességében elmondhatjuk, hogy hőrezisztens sejtvonalainkban a hőrezisztencia kialakításában a konstitutív hő-sokk fehérjék megemelkedett szintje mellett a hsp68 indukciójának megváltozása is szerepet játszhat.

A hőrezisztens variánsok tulajdonságait kutatva kiderült, hogy azok mérsékelt szintű multidrog rezisztenciát mutatnak. Ez a multidrog rezisztencia nagy mértékben fokozható volt colchicin szelekcióval. Hasonlóan colchicinre szelektálva is sikerült multidrog rezisztens sejtvonalakot létrehozni.

A hőrezisztens, kis mértékben spontán multidrog rezisztens klón 2(10x80) és klón 2(10x80)T1, a belőlük nyert colchicinre szelektált multidrog rezisztens klón 2(10x80)c1000 és klón 2(10x80)T1c1000, illetve a szülőből szintén colchicinre szelektált erősen multidrog rezisztens klón 2c1000 tulajdonságait vizsgálva, arra a következtetésre juthatunk, hogy a sejtvonalainkban a multidrog rezisztenciát nagy valószínűséggel a P-glikoprotein megnövekedett szintje okozta. Ez a következtetés összhangban áll azzal, hogy a hőrezisztens sejtekben a P-glikoprotein szintje kis mértékben emelkedett meg, míg a colchicinre szelektált sejtvonalakban ez a szint lényegesen magasabb volt.

Megvizsgálva sejtvonalkaink apoptotikus tulajdonságait, megállapítottuk, hogy valamennyi hepatóma sejtvonalkunkban kiváltható apoptózis mind kemoterápiás szerekkel, mind pedig szérumban megvonással, ami a rákos megbetegedések gyógyításában a továbbiakban nagy jelentőséggel bírhat.

5. Irodalomjegyzék

1. Dewey, W.C. and E.V. Holahan.

Hyperthermia-basic biology. *Prog. Exp. Tumor Res.*, 28:198-219., 1984.

2. Morimoto, R.I., A. Tissieres and C. Georgopoulos.

Stress Proteins in Biology and Medicine. Cold Spring Laboratory Press, 1990.

3. Baranyi, M., A. Hever-Szabo and A. Venetianer.

Heat-shock response of rat hepatoma variant cells. *Eur. J. Biochem.*, 200:707-713., 1991.

4. Purity, M., V.T. Nguyen, M.F. Dubois, O. Bensaude, A. Hever-Szabo and A. Venetianer.

Decreased stress inducibility of hsp68 protein in a rat hepatoma variant clone. *Eur. J. Biochem.*, 210:793-800., 1992.

5. Lindquist, S.

The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem.*, 55:1151-1191., 1986.

6. Hunt, C.R. and R.I. Morimoto.

Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82:6455-6459., 1985.

7. Pelham, H.

A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp70 heat-shock gene. *Cell*, 30:959-961., 1982.

8. Kingston, R.E., T.J. Schuetz and Z. Larin.

Heat-inducible human factor that binds to a human hsp70 promoter. *Mol. Cell. Biol.*, 7:1530-1534., 1987.

9. Wu, C.

Activating protein factor binds in vitro to upstream control sequences in heat-shock gene chromatin. *Nature*, 311:81-84., 1984.

10. Ashburner, M.M. and J.J. Bonner.

The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell*, 17:241-254., 1979.

11. Gething, M.J. and J.J. Sambrook.

Protein folding in the cell. *Nature*, 355:33-45., 1992.

12. Ellis, R.J.

The general concept of molecular chaperones. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser B.*, 339:257-262., 1993.

13. Parsell, D.A. and S. Lindquist.

The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 27:437-496., 1993.

14. Chrétien P. and J. Landry.

Enhanced constitutive expression of the 27-kda heat shock proteins in heat-resistant variants from chinese hamster cells. *J. Cell. Physiol.*, 137:157-166., 1988.

15. Li, G.C.

Elevated levels of 70,000 dalton heat shock protein in transiently thermotolerant chinese hamster fibroblasts and their stable heat resistant variants. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 11:165-177., 1985.

16. Yahara, I., H. Iida and S. Koyasu.

A heat shock-resistant variant of chinese hamster cell line constitutively expressing heat shock protein of Mr 90,000 at high level. *Cell Struct. Funct.*, 11:65-73., 1986.

17. Anderson, R.L., I. van Kersen, P.E. Kraft and G.M. Hahn.
Biochemical analysis of heat-resistant mouse tumor cell strains: a new member of the HSP70 family. *Mol. Cell. Biol.*, 9:3509-3516., 1989.
18. Anderson, R.L., T. Tao and G.M. Hahn.
Membrane lipids of B16 melanoma cells and heat-resistant variants. *Int. J. Radiat. Biol.*, 54:813-823., 1988.
19. Gottesman, M.M. and I. Pastan.
Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.*, 62:385-427., 1993.
20. Cole, S.P.C., G. Bhardwaj, J.H. Gerlach, J.E. Mackie, C.E. Grant, K.C. Almquist, A.J. Stewart, E.U. Kurz, A.M.V. Duncan and R.G. Deeley.
Overexpression of a transporter gene in a multidrug resistant human lung cancer cell line. *Science*, 258:1650-1654., 1992.
21. Batist, G., A. Tulpule, B.K. Sinha, A.G. Katki, C.E. Myers and H.K. Covan.
Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer. *J. Biol. Chem.*, 261:15544-49., 1986.
22. Roninson, I.B.
Molecular and Cellular Biology of Multidrug Resistance in Tumor Cells. New York: Plenum, 1991.
23. Gerlach, J.H., J.A. Endicott, P.F. Juranka, G. Henderson, F. Sarangi, K.L. Deuchars and V. Ling.
Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggest a model for multidrug resistance. *Nature*, 324:485-489., 1986.
24. Higgins, C.F. and M.M. Gottesman.
Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem. Sci.* 17:18-21., 1992.

25. Choi, K., C-j. Chen, M. Kriegler and I.B. Roninson.
An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant human cells result from spontaneous mutations in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene. *Cell*, 53:519-529., 1988.
26. Gros, P. and E. Buschman.
The mouse multidrug resistance gene family: structural and functional analysis. *Int. Rev. Cytology*, 137:169-197., 1993.
27. Chin, K., S. Tanaka, G. Darlington, I. Pastan and M.M. Gottesman.
Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 265:221-226., 1990.
28. Cohen, J.J.
Apoptosis. *Immunology Today*, 14 :126-130., 1993.
29. Kerr, J.F.R., A.H. Wyllie and A.R. Currie.
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26:239-257. 1972.
30. Lockstrin, R.A. and J. Beaulaton.
Cell death: questions for histochemists concerning the causes of the various cytological changes. *Histochem. J.* 13:659-666. 1981.
31. McConkey, D.J., P. Hartzell, P. Nicotera, A.H. Wyllie and S. Orrenius.
Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicol. Lett.* 42:123-130. 1988.
32. Allbritton, N.L., C.R. Verret, R.C. Wolley and H.N. Eisen.
Calcium ion concentrations and DNA fragmentation in target cells destruction by murine cloned cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 167:514-527. 1988.
33. Jones, D.P., D. J. McConkey, P. Nicotera and S. Orrenius.
Calcium-activated DNA fragmentation in rat liver nuclei. *J. Biol. Chem.* 264:6398-6403. 1989.

34. Koike, T., D.P. Martin and E.M. Jr. Johnson.
Role of Ca channels in the ability of membrane depolarization to prevent neuronal death induced by trophic-factor deprivation: evidence that levels of internal Ca determine nerve growth factor dependence of sympathetic ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6421-6425. 1989.
35. Barry, M.A., C.A. Beliuke and A. Eastman.
Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem. Pharmacol.* 40:2353-2362. 1990.
36. Morris, R.G., E.D. Duvall, A.D. Hargreaves and A.H. Wyllie.
Hormone-induced cell death. II. Surface changes in thymocytes undergoing apoptosis. *Am. J. Pathol.* 115:426-436. 1984.
37. Wyllie, A.H., J.F.R. Kerr and A.R. Currie.
Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68:251-306. 1980.
38. Duval, E., A.H. Wyllie and R.G. Morris.
Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology* 56:351-358. 1985.
39. Arends, M.J. and A.H. Wyllie.
Mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32:223-254. 1992.
40. Tenniswood, M.P., R.S. Guenette, J. Lakins, M. Mooibroek, P. Wong and J. E. Welsh.
Active cell death in hormone-dependent tissues. *Cancer Metastasis Rev.* 11:197-200. 1992.
41. Kaufmann, S.H.
Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res.* 49:5870-5878. 1989.

42. Nagle, W.A., B.L. Soloff, A.J. Jr. Moss and K.J. Henle.
Cultured chinese hamster cells undergo apoptosis after exposure to cold but nonfreezing temperatures . *Cryobiology* 27:439-451. 1990.
43. Geng, L. and C.S. Potten.
Changes after irradiation in the member og mitotic cells and apoptotic fragments in growing mouse hair follicules and in the width of their hairs. *Radiat. Res.* 123:75-81. 1990.
44. Duke, R.C., J.J. Cohen and R. Chervenak.
Differences in target cell DNA fragmentation induced by mouse cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *J. Immunol.* 137:1442-1447. 1986.
45. Sentman, C.L., J.R. Shutter, D. Hockenbery, O. Kanagawa and S.J. Korsmeyer.
bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negativ selection in thymocytes cell. 67:879-888. 1991.
46. Shimizu, S.Y., Y. Eguchl, H. Kosaka, W. Kamiike, H. Masuda and Y. Tsujimoto.
Prevention of hipoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL. *Nature.* 374:811-813. 1995.
47. Hockenbery, D.M., Z.N. Oltvay, X.M. Yiu, C.L. Milliman and S.J. Korsmeyer.
Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 75:241-251. 1993.
48. Boise, L.H., M. Gonzalez-Garcia, C.E. Postema, L. Ding, T. Lindsten, L.A. Turka, X. Mao, G. Nunez and C. Thompson.
bcl-x, a *bcl-2* related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic death. *Cell.* 47:597-608. 1993.
49. Hale, A.J., C.A. Smith, L.C. Sutherland, V.E.A. Stoneman, V.L. Longthorne, A.C. Culchane and G.T. Williams.
Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur. J. Biochem.* 236:1-26. 1996.

50. El-Diery, W.S., T. Tokino, V.E. Velculescu, D.B. Levy, R. Parsons, J.M. Trent, D. Liu, E. Mercer, K.W. Kinzler and B. Vogelstein.

WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 75:817-825. 1993.

51. Yonish-Ronach, E.D., J. Resnitzky, J. Lotem, L. Sachs, A. Kimchi and M. Oren.

Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*. 352:345-347. 1991.

52. White, E.

Life, death and the pursuit of apoptosis. *Genes and Development*. 10:1-15. 1996.

53. Chirgwing, J.M., A.E. Przybylaand, R.J. MacDonald and W.J. Rutter.

Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18:5294-5299., 1979.

54. Freinberg, A.P. and B. Vogelstein.

A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132:6-23., 1983.

55. Tratner, I., J.L. Nahon, J.M. Sala-Trepat and A. Venetianer.

Albumin and α -fetoprotein in rat hepatoma cell lines is correlated with specific DNA hypomethylation and altered chromatin structure in the 5' region. *Mol. Cell. Biol.*, 7:1856-64., 1987.

56. Scherer, G., W. Schmid, C.M. Strange, W. Rowekamp and G. Schutz.

Isolation of cDNA clones coding for rat tyrosine aminotransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79:7205-7208., 1982.

57. Laemmli, U.K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685., 1970.

58. O'Farrell, P.H.

High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250:4007-21., 1975.

59. Zakeri, Z.F., D.J. Wolgemuth and C.R. Hunt.
Identification and sequence analysis of a new member of the mouse HSP70 gene family and characterization of its unique cellular and developmental pattern of expression in the male germ line.
Mol. Cell. Biol., 8:2925-2932., 1988.
60. Hickey, E., E.S. Brandon, S. Sadis, G. Smale and L.A. Weber.
Molecular cloning of sequences encoding the human heat-shock proteins and their expression during hyperthermia. *Gene*, 43:147-154., 1986.
61. Fort, P., L. Marty, M. Piechaczyk, S.E. Sabrouy, C. Dai, P. Jeanteur and J.M. Blanchard.
Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate- dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.*, 13:1431-1443., 1985.
62. Foecking M.K. and H. Hofstetter.
Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. *Gene*, 45:101-105., 1986.
63. De Wet, J.R., K.V. Wood, M. DeLuca, D.R. Helinsky and S. Subramani.
Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, 7:725-737., 1987.
64. Nguyen, V.T., M. Morange and O. Bensaude.
Firefly luciferase luminescence assays using scintillation in transfected mammalian cells. *Anal. Biochem.*, 171:404-408., 1988.
65. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall.
Protein measurement with the FOLIN phenol-reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275., 1951.
66. Tanke, J.H. and M. van der Keur.
Selection of defined cell types by flow-cytometric cell sorting. *TIBTECH.* 11:55-62., 1993.