

**A hőrezisztencia és multidrog
rezisztencia kialakulásának vizsgálata**

EGYETEMI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Hevér-Szabó Anna
Molekuláris biológus

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont
1995.

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	3
2	Irodalmi áttekintés	4
2.1	Hő-sokk válasz	4
2.1.1	A hő-sokk fehérjék felosztása és funkcióik	4
2.1.2	A termotolerancia	6
2.1.3	A hőrezisztencia	7
2.2	A multidrogo rezisztencia	7
3	Problémafelvetés	10
3.1	A modellrendszer	10
3.2	Kérdésfelvetések és célkitűzések	11
4	Anyagok és módszerek	12
4.1	Sejtkultúrák	12
4.2	Tápfolyadékok, sejtkultúrák fenntartása	12
4.3	Hőrezisztens sejtek izolálása	13
4.4	Szubklónok izolálása	13
4.5	Drogrezisztens sejtvonalak izolálása	13
4.6	A sejtvonalak és főbb jellemzőik (2.ábra)	14
4.7	A sejtek kolóniaképző képességének vizsgálata	15
4.8	Sejtek viabilitásának vizsgálata	15
4.9	Generációs idő meghatározása	16
4.10	TAT indukció és aktivitás mérés	16
4.11	RNS preparálás és Northern-blot analízis	17
4.12	Sejtek fehérjeszintézisének vizsgálata	17
4.13	Luciferáz enzim aktivitás mérése	18
4.14	ECL Western-blot analízis	19

5	Eredmények és megvitatásuk	20
5.1	Hőrezisztens sejtek izolálása és jellemzése	20
5.1.1	Hőrezisztens sejtek izolálása	20
5.1.2	Rezisztencia teszt, stabilitási teszt	20
5.1.3	Sejtmorfológia és dexametazon rezisztencia	21
5.1.4	Májspecifikus funkciók vizsgálata	22
5.2	Hőrezisztens sejtek stresszválasza	22
5.2.1	A fehérjeszintézis vizsgálata	22
5.2.2	mRNS szintézis a patkány hepatóma sejtekben	26
5.2.3	Hőérzékeny riporterfehérje stabilitásának vizsgálata	28
5.3	A hőrezisztens sejtek drogrezisztenssé váltak	29
5.4	Drogrezisztens sejtvonalak izolálása és jellemzése	31
5.4.1	Drogrezisztens sejtvonalak izolálása	31
5.4.2	A drogrezisztencia tesztelése a colchicinen nöövő sejteknél	31
5.4.3	Sejtmorfológia és májspecifikus funkciók	32
5.4.4	45°C-os stresszválasz	33
5.4.5	A drogrezisztens sejtvonal nem vált hőrezisztenssé	33
5.4.6	A P-glikoprotein szintje megemelkedett a drogrezisztensekben	33
6	Az eredmények összefoglalása	35
7	Köszönetnyilvánítás	37
8	Ábrák	46

1. Bevezetés

Az elmúlt két évtizedben egyre nagyobb teret nyert a klinikumban a rákos megbetegedések hipertermiával kombinált kemoterápiás és sugárkezelése. A hőkezelés fokozza a sugárkezelés hatását, megkönnyíti a kemoterápiás szerek bejutását a sejtekbe, illetve részlegesen gátolhatja a sugárzás és a drogok okozta károsodások kijavítását, a sejtek "repair mechanizmusát" [DH84,MTG90]. A ciklikusan alkalmazott hőkezelések során a tumoros sejtekben rezisztencia alakulhat ki a soron következő hőkezelésekkel szemben, amely jelentősen csökkentheti a terápia hatékonyságát.

Annak ellenére, hogy a gyógykezelések során nagyon fontos volna tudni, hogy hogyan alakul ki a hőrezisztencia és milyen gének felelősek a kialakulásáért, magáról a hőrezisztenciáról csak keveset tudunk.

Az irodalomból is alig néhány hőrezisztens sejtvonal vált ismertté [CL88, LHK*91,FAH86], ezért nagy jelentőséggel bírhatnak az újabb, "in vitro" módon fenntartható, stabil hőrezisztens vonalak.

A dolgozatomban első részében ilyen hőrezisztens sejtvonalak izolálását és jellemzését ismertetem.

A kemoterápiás szerekkel szemben kialakuló rezisztencia, a drogrezisztencia is hasonlóképp hátráltathatja rákterápiát, a dolgozat második felében ilyen drogrezisztens sejtvonalak izolálásáról és jellemzéséről számolok be, illetve olyan sejtvonalokról, amelyek a hőrezisztencia mellett egyben a drogrezisztenciát is megszerezték.

Ezeknek a sejtvonalaknak a segítségével tanulmányozhatóvá vált mind a hőrezisztencia, mind a drogrezisztencia, valamint a két jelenség közötti kapcsolat.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Hő-sokk válasz

2.1.1 A hő-sokk fehérjék felosztása és funkcióik

Minden eddig vizsgált organizmus a környezeti hőmérséklet növekedésére specifikus fehérjék, a hő-sokk fehérjék megemelt szintézisével válaszol [Lin86]. A hő-sokk fehérjék szintézise nemcsak hővel, hanem egyéb környezeti változással is indukálható, ezért stressz fehérjéknek is nevezik őket. Ilyen stressz hatások közé tartozik pl. az alkohol, drogok, nehézfémek, vírusok bejutása a szervezetbe [AB79,TWWMF82].

Az eukaryota hő-sokk fehérjék 5 fő családra oszthatók az őket alkotó monomerek molekulatömege szerint: a 15-30 kDa tömegűeket összefoglaló néven kis molekulatömegű hő-sokk fehérjéknek, a 60 kDa körülieket HSP60-nak, a 66-78 kDa közöttieket HSP70-nek, a 83-90 kDa közöttieket HSP90-nek, a 100-110 kDa-os molekulatömegűeket pedig HSP100 fehérjecsaládnak nevezik [MTG90].

A különböző fajok azonos molekulatömegű hő-sokk fehérjéinek aminósav szekvenciája nagymértékben konzerválódott a törzsfejlődés folyamán, gyakran még a törzsfejlődéstanilag egymástól távolos fajok hő-sokk fehérjéi között is nagyobb, mint 50%-os homológiát találhatunk [HM85].

A hő-sokk fehérjék génjei általában multigén családokat alkotnak, a gének transzkripcióját az 5' végen található konszenzus elemekhez (heat shock element, HSE) [Pel82,KSL87,MTM88] kötődő hő-sokk faktorok (HSF) szabályozzák [Wu84], más, nem hő-sokk függő promoter elemek mellett. Hő-sokk hatására a hő-sokk fehérjék génjeinek transzkripciója megnövekedik, s ezt egy gyors transzláció követi, míg a sejt egyéb fehérjéinek szintézise lecsökken [AB79].

A hő-sokk nemcsak transzkripcióbeli változásokat okoz a sejtekben, hanem drasztikus morfológiai és biokémiai elváltozások is bekövetkeznek. Emlős sejteknél írták le a sejtek alakjának megváltozását, amelyben szerepet játszott

az intermedier filament hálózat sérülése is [TWMF82]. Károsodhat a plazma membrán, a magi struktúra, megváltozik a centroszoma szerveződése is [PL94].

A hő-sokk fehérjék nemcsak stressz hatásokra, hanem a sejtek életműködése, fejlődése során is nagy mennyiségben expresszálódnak (konstitutív hő-sokk fehérjék), és sokrétű funkcióval rendelkeznek. Így például a HSP70 család tagjai fontos szerepet játszanak a fehérjék membránokon való átjutásában, az úgynevezett ATP-függő "unfoldase" funkció révén, amely biztosítja a fehérjék kitekert konformációját az átjutáskor [GS92]. Hasonlóképp "feltekeretlen" fehérjeláncokhoz kötődik a citoplazmában található TF55 fehérje is, a prokaryota DnaJ viszont mind a feltekert, mind a feltekeretlen konformációjú fehérjeláncokhoz képes kötődni [TNW*91,SWG88]. Számos hő-sokk fehérje rendelkezik ATP-áz aktivitással, mint pl. a hsp104, az *E. coli* ClpA fehérjéje, a HSP90 család tagjai, a prokaryota Lon fehérje, a HSP70 és HSP60 család tagjai [PL93]. A hő-sokk fehérjék számos olyan faktorhoz is képesek kötődni, amelyek résztvesznek a sejtek életműködésének szabályozásában. A HSP90 család tagjai agonista hiányában szteroid hormon receptorhoz kötődnek, és több protein kinázzal is kapcsolatba lépnek, mint pl. kazein kináz II és eIF2alfa kináz [MY92,RWKH89,PHS92]. A hő-sokk fehérjék egymáshoz is kapcsolódhatnak, többek között a hsp70 és hsp90 között is leírtak ilyen asszociációt [PL93]. Maguk a hő-sokk fehérjék peptidil prolin izomeráz funkciót is betölthetnek, mint az élesztőben a cyclophilinek, amelyek szintén kapcsolódhatnak más hő-sokk fehérjékhez [NDW93].

Talán az egyik legfontosabb és legáltalánosabb funkciójuk a hő-sokk fehérjéknek az, hogy szabályozzák más fehérjeláncok fel-, ill. kitekeredését (folding, unfolding) és megkönnyítik a fehérje alegységek össze- és szétszerelődését. Megelőzik ezáltal a nem megfelelő kapcsolatok létrejöttét, vigyáznak a molekulák natív struktúrájára, mint egy gardedám, ezért is nevezik a hő-sokk fehérjéket gyakran molekuláris "chaperone"-oknak (gardedám) [Ell93]. Maguk a "chaperone"-ok nem válnak a végső funkcionális struktúra részévé, nem adnak át szterikus információkat sem a fehérjeláncok feltekeredésekor, sem az oligomerizáció során. A molekuláris "chaperone"-ok, mint pl. a HSP70 család tagjai, kötődnek specifikus tulajdonságú (hidrofób) oldalláncokhoz, amelyek a naszcens fehérjéken az összeszerelődés korai stádiumában a molekula felszínére kerülhetnek és inkorrekt struktúrákat hozhatnak létre. A "chaperone"-ok kötődésükkel megakadályozzák a hibás szerkezetű fehérjék létrejöttét, a fehérjék elszállítódását téves célkompartmentekbe. A legtöbb esetben ATP hidrolízisét követően válik szét a hsp70 és a másik fehérje, amely a szétválást követően képes aktív térszerkezetet felvenni, vagy transzportálódni a megfelelő organel-

lumba [PL93]. Gyakran más, úgynevezett partner fehérjék is szerepet játszanak a hsp70 aktiválásában, mint pl. az *E. coli*-ban a DnaK kapcsolódását a célfehérjéhez a DnaJ és GrpE együttesen megkönnyíti [PL93].

A HSP60 család fehérjéi közül a nagy szekvencia homológiát mutató (45%-60%), 60 kDa molekulatömegű fehérjéket külön csoportosították, "chaperonin" elnevezést adva nekik. A "chaperonin"-ok közé sorolták még a szintén magas szekvencia homológiát mutató 10 kDa-os alegységgel rendelkező hő-sokk fehérjéket is [EvdV91]. A HSP60 család tagjai, a "chaperonin"-ok, hasonlóan a HSP70 fehérje család tagjaihoz, strukturális motívumokat ismernek fel a feltekeretlen (unfolded) fehérjeláncokon [GS92], képesek kötődni ezekhez a motívumokhoz és indukálni a fehérjék érését, a fehérjeláncok feltekeredését (folding). A fehérjék másodlagos szerkezete kialakul, de a harmadlagos szerkezet létrejötte gátolt. A legtöbb esetben a szubsztrát fehérje további éréséhez, ill. a hsp60-ról való leválásához szükség van hsp10 és ATP jelenlétére is [SZR*93]. Az előző két nagy "chaperone"-családdal ellentétben, a HSP90 tagjai csak bizonyos fehérje csoportokkal (pl. kinázok) képesek stabil kapcsolatot kialakítani [MY92]. A kapcsolódás által megakadályozzák ezeknek a fehérjéknek az aggregációját, ha már bekövetkezett az aggregáció, segítik a fehérjék szétválását [MY92].

A kis molekulatömegű fehérjék szintén rendelkeznek "chaperone" aktivitással, amely az előzőekkel ellentétben ATP-től független [PL93].

2.1.2 A termotolerancia

A hő-sokk fehérjék szintjének nagy mértékű megnövekedése hő-sokkot követően, ill. már a hő-sokk alatt, arra enged következtetni, hogy szerepük van a hővel szembeni védelemben. Számos tanulmány beszámol arról, hogy korrelációt találtak a hő-sokk fehérjék indukciója és a hővel szembeni tolerancia kialakulása között [MTG90]. A hő indukálta termotolerancia átmenetileg (maximum néhány napig) nagyobb ellenállóképességet biztosít nemcsak az ismételt hőkezeléssel szemben, hanem egyéb kezelésekkel (sugárkezelés, kemoterápiás szerek, etanol, aminosav analógok) szemben is [Lin86]. Ezek a kezelések károsítják, vagy denaturálják a fehérjéket. Valószínű, hogy az "abnormális", károsodott fehérjék jelenléte váltja ki a hő-sokk fehérjék indukcióját. Feltételezik, hogy legalább két alapvető módon segíthetik a hő-sokk fehérjék kivédni a stresszorok okozta károsodást. Az egyik szerint elősegítik az "abnormális" fehérjék lebomlását, ill. néhány hő-sokk fehérjének magának is van proteolitikus aktivitása. A másik mód "molekuláris chaperone-ok" működése alapján kép-

zelhető el, amelyek megelőzik a fehérjék aggregációját, elősegítik a denaturált fehérjeláncok újbóli, helyes feltekeredését (refolding) [MTG90].

2.1.3 A hőrezisztencia

Nemcsak a termotolerancia kialakulásában, hanem a stabil, örökíthető hőrezisztencia létrejöttében is fontos szerepet játszhatnak a hő-sokk fehérjék. Az irodalomból csak néhány stabil hőrezisztens sejtvonalat ismerünk, amelyek egy részét ismételt hőkezelések [HvK88], illetve fehérjeszintézist gátló vegyületek (hisztidinol) alkalmazásával nyerték [LHK*91], valamint etil metán szulfonát kezelést követő egyszeri hőkezeléssel [CL88]. A hőrezisztencia kialakulása több esetben korrelál bizonyos hő-sokk fehérjék, hsp27, hsp70 ill. hsp90 konstitutív szintjének megemelkedésével a hőrezisztens variánsokban, illetve új, konstitutívan expresszálódó hsp70 megjelenésével [CL88, Li85, YIK86, AvKKH89]. Hő-sokk gének (hsp27, α -B-crystallin) transzfekecióját követően a stabil transzfekektánsok hőrezisztenciája is megnövekedett [LCL*89, IITG94]. CHO (kínai höröcsög ovárium) sejtekből izolált hőrezisztens vonalakban nem tudtak kimutatni változást a hő-sokk fehérjék szintjében a hőérzékeny sejtvonálhoz viszonyítva, viszont a hőrezisztensekben jelentős mértékben megnövekedett a vimentin mennyisége, ami feltehetőleg a hő-sokk során a cytoskeleton integritásának megőrzésében játszik szerepet [LHC*92].

Más esetekben a membrán koleszterol tartalmának lecsökkenésével, s ezáltal a membrán fluiditásának megnövekedésével hozzák összefüggésbe a hőrezisztencia kialakulását [ATH88]. Feltételezhető, hogy a hőrezisztens sejtvonalakban a fent leírt változások mellett a hő okozta károsodások sokkal gyorsabb kijavítása történik, a hőrezisztens sejtvonalak jobb javító, "repair" mechanizmussal rendelkeznek, mint a hőszenszítív sejtvonalak [Lás92]. Kísérletek alapján valószínűsítik, hogy a fenotípusos termotolerancia és a genetikailag öröklődő termorezisztencia különböző jelenségek, nem kapcsolatosak, mivel termorezisztens sejtek maguk is termotoleránssá tehetők [MTG90].

2.2 A multidrog rezisztencia

Multidrog rezisztenciának nevezzük azt a jelenséget, amikor bizonyos sejtvonalak rezisztenciát mutatnak több olyan kemoterápiás szerrel szemben is, amelyek eltérnek egymástól mind kémiai szerkezetben, fizikai tulajdonságokban, mind hatásmechanizmusban [GP93]. A multidrog rezisztencia fenotípusa szá-

mos olyan sejtben is kialakult, amelyet egyetlen drogtípussal többször kezeltek, vagy szelektáltak [EL89]. A multidrog rezisztencia kialakulása többféle mechanizmuson keresztül mehet végbe. A glutation-S- transzferáz izoenzimcsaládok megemelkedett expresszióját, a topoizomeráz II enzim csökkent szintjét is kapcsolatba hozták a kemoterápiás szerekekkel szembeni rezisztencia kialakulásával [BTS*86,YRBP87]. Az ABC- (ATP-binding cassette) transzportfehérjék családjába tartozó MRP-nek (multidrug resistance-associated protein) megnövekedett a szintje a drogrezisztens SCLC (small cell lung cancer) sejtekben szintén összefüggésbe hozható a multidrog rezisztencia kialakulásával, csakúgy mint az MCF-7 humán mellrák sejtekben a nukleozid transzportfehérje megváltozott mennyisége [CBG*92,MFMM91]. A fent említett sejtvonalak az "atípusos" multidrog rezisztenciával rendelkeznek, a rezisztencia több, egymástól független úton alakult ki. "Típusosnak" tekinthető az eddig még nem említett, de az irodalomban a legjobban jellemzett multidrog rezisztencia típus, amely a P-glikoprotein megnövekedett szintjéhez kapcsolható [Ron91]. A P- glikoproteint egy kis géncsalád kódolja, amelynek a humán sejtekben két (MDR1 és MDR2), a rágcsálókban három (mdr1, mdr2, mdr3) tagja van, ezek a gének erősen homológ szekvenciájú P-glikoproteineket kódolnak, de a rágcsálók génei közül csak az mdr1 és mdr3 gének, a humán gének közül az MDR1 expressziója vált ki a transzfekciós kísérletekben multidrog rezisztenciát [GP93]. Ez a 170 kDa molekulatömegű membránprotein a drogok ATP-függő, aktív kipumpálását végzi a sejtekből [GEJ*86]. A P- glikoprotein az MRP-hez hasonlóan az ABC-transzport fehérjék családjába tartozik, szerkezetére jellemző, hogy két megközelítőleg 43%-os homológiát mutató molekulafélből áll, ami arra enged következtetni, hogy génduplikáció eredményeként jöhetett létre [Ron91]. Mindegyik molekulafél 6 transzmembrán domént és egy ATP-kötő domént tartalmaz [Ron91]. Nagy mennyiségben mutatták ki számos drogrezisztens humán tumorból, de expresszálódik néhány normális szövetben is, mint például vese és máj [GB93]. A P-glikoprotein fiziológiás funkciója még nem ismert, valószínű, hogy a szervezet méregtelenítő mechanizmusában vesz részt. A P- glikoprotein mRNS nemcsak konstitutívan expresszálódik, hanem hő-sokkal, Na-arzenit kezeléssel indukálható, s ez az indukció befolyásolható actinomycin D-vel, ami arra enged következtetni, hogy transzkripcionálisan szabályozott [CTD*90]. A HepG2 hepatoma sejtvonalon az MDR1 gén promóter régiójában azonosítottak két HSE-t, ebben a sejtvonalon azonban hővel nem, csak Na-arzenit kezeléssel indukálható a P-glikoprotein szintézise, a kísérletek eredményeiből valószínűsíthető, hogy az MDR1 gén expressziója sejt-specifikusan is szabályozódhat. Számos kemoterápiás szer (vincristin, dau-

nomycin, colchicin és doxorubicin) képes indukálni a P- glikoprotein szintézisét [GP93]. A megnövekedett mennyiségű P-glikoprotein okozta multidrog rezisztencia fenotípust Ca^{2+} -csatorna blokkolók (verapamil, nifedipine), calmodulin inhibitorok gyakran képesek megszüntetni [GP93]. Bizonyos multidrog rezisztens sejtvonalak, amelyeknél magas szintű rezisztenciát mutattak ki, gyakran nem bizonyultak stabilnak, drogmentes táptalajban tenyésztve elvesztették rezisztenciájukat. A citológiai vizsgálatok szerint a magas drogrezisztencia szint gyakran kapcsolódott nem stabil genetikai elemek megjelenéséhez, mint például "double minute" kromoszómák és homogénan festődő kromoszóma régiók, amelyeknek a jelenléte gén amplifikációra utal [RAH*84]. A gyógyászatban a rákos megbetegedések kezelésekor gyakran alkalmaznak lokális hipertermiát sugárkezeléssel, vagy kemoterápiás kezeléssel kombinálva. A hőkezelés érzékennyíti a sejteket a rákövetkező drog-, ill. sugárkezeléssel szemben. A kezeléseket ciklikusan alkalmazzák, s gyakran a már hőkezelt sejtek rezisztenssé válnak rákövetkező hőkezeléssel szemben, kevésbé érzékennyé válhatnak sugárkezeléssel szemben, valamint kialakulhat multidrog rezisztencia is. CHO hőrezisztens sejtvonalakban a hsp27 megemelkedett szintje játszik szerepet abban, hogy a sejtvonalak ellenállóvá váltak drogokkal szemben is [HRL*91].

3. Problémafelvetés

3.1 A modellrendszer

Munkacsoportunk patkány rákos májsejtvonalak (hepatóma sejtvonalak) stresszválaszát vizsgálja. Ezek a sejtvonalak kiváló modellrendszerül szolgálnak a környezetből érkező stresszhatások tanulmányozására, hiszen a máj az intermedier anyagcsere egyik fontos állomása, szűrőmechanizmusán keresztül jut számos tápanyag a keringésbe és enzimrendszerei révén képes toxikus hatású anyagokat inaktiválni. Az általunk az elmúlt években izolált és jellemzett patkány hepatóma sejtvonalak nemcsak differenciációs állapotban és glukokortikoid érzékenységben, hanem hőtűrő képességben is különböznek egymástól (1.ábra). A sejteink származási vonalát és főbb jellemzőit a 2. ábra foglalja össze. Korábban megvizsgáltuk, hogy sejteink eltérő hőtűrőképessége kapcsolatba hozható-e a sejtek különböző differenciációs fokával, illetve glukokortikoid érzékenységével. Enyhe, 42°C-os hő-sokk kezelést követően megállapítottuk, hogy a fő hő-sokk fehérjék közül a hsp110, 100, 90, 70 és 60 valamennyi vizsgált sejtvonalunkban indukálódott. Ezzel szemben a hsp70 fehérjecsalcád egyik tagja, a hsp68 csökkentebb mértékben indukálódott (deficiens) néhány glukokortikoid rezisztens klónban, mint a glukokortikoid érzékenyekben. Bizonyos hő-sokk fehérjék a dedifferenciált sejtvonalakban nem indukálódtak, míg a differenciált hepatóma vonalakban kimutatható ezen fehérjék indukciója. Kísérleteinkből levonhattuk azt a következtetést, hogy a glukokortikoid rezisztencia és a differenciációs állapot ugyan befolyásolja a hő-sokk gének expresszióját, de nem mutat korrelációt a sejtek hőtűrő képességével [BHV91,PND*92]. Kíváncsiak voltunk, hogy ha megnövekedik a sejtek hőtűrő képessége és hőrezisztencia alakul ki, hogyan változik a sejtek hő-sokk fehérjeszintézise, megszűnik-e a hsp68 indukciójában tapasztalt deficiencia. Ezenfelül magyarázatot szerettünk volna kapni sejtvonalaink eltérő hőérzékenységére, a magasabb fokú hőtűrő képesség és a hőrezisztencia kialakulására, ezért hőrezisztens sejtvonalak tanulmányo-



zásába kezdtünk.

3.2 Kérdésfelvetések és célkitűzések

Munkánk során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Az eltérő fenotípusú és hőtűrő képességű hepatóma sejtvonalakból lehet-e hőrezisztens sejtvonalakat nyerni?
- A hőrezisztencia mértéke hasonló-e a különböző szülőktől származó hőrezisztensekben?
- A hőrezisztencia stabil-e a sejtvonalakban?
- A hőrezisztensek stresszválasza eltér-e a szülőkétől, fehérje és mRNS szinten kimutathatók-e eltérések, s ezek korrelálnak-e a rezisztencia kialakulásával?
- Mi az oka a rezisztencia kialakulásának?

4. Anyagok és módszerek

4.1 Sejtkultúrák

A laborunkban fenntartott és a kísérletekhez alkalmazott patkány hepatóma sejtvonalak a Reuber H35 [Reu61] sejtvonalból előállított H4IIEC3 [PPMP64] sejtvonala származékai. A differenciálódott hepatóma sejtvonalak megőriztek bizonyos máj-specifikus funkciókat in vitro körülmények között is [DW74,PPMP64], míg a dedifferenciálódott sejtvonalak ezeket a funkciókat részben vagy teljesen elveszítették [VB83,TNSV87]. Egyes sejtvonalak osztódása gátolható szintetikus glukokortikoidokkal (dexametazon érzékenyek) [VPG80], míg más sejtvonalak szaporodását nem befolyásolja a glukokortikoid kezelés (dexametazon rezisztensek) [VDSF83].

4.2 Tápfolyadékok, sejtkultúrák fenntartása

Sejtjeinket műanyag szövettenyésztő flakákban, illetve Petri-csészékben (Greiner) 37°C-os CO₂ termosztátban (5% CO₂, 95% levegő), 5% főtájis borjúsavót (Gibco) tartalmazó tápfolyadékban (F12 Gibco, jele: F12-S) tenyésztetjük [VPG80]. A dexametazon rezisztens klón 2 sejtek tápfolyadékát 2x10⁻⁶M dexametazonnal (Sigma), illetve a colchicin rezisztens sejteket 1000ng/ml végkoncentrációjú colchicinnel (Vega) egészítettük ki. A tenyésztőedények felületére növelt sejteket 0.05% tripszint (Difco) és 0.02% EDTA-t tartalmazó Saline A pufferrel (5.6x10⁻⁵M fenolvörös, 4.1x10⁻³M NaHCO₃, 0.13M NaCl, 5.3x10⁻³M KCl, 5x10³M D-glükóz, 0.05% tripszin) távolítottuk el.

4.3 Hőrezisztens sejtek izolálása

A kísérlet kezdetekor 2×10^6 sejtet helyeztünk 100mm átmérőjű műanyag Petri-csészébe. Három párhuzamos csészét indítottunk, amelyeket az indítást követő napon 45°C -os termosztátba helyeztünk 60, 70 ill. 80 percig. A nagy Petri-csészékkel párhuzamosan 60mm-es Petri-csészékbe is helyeztünk sejteket (1×10^5) a viabilitási teszthez és párhuzamosan hőkezeltük őket. A hő-sokkot követően a csészéket 37°C -os termosztátba helyeztük, s a túlélő sejteket addig növesztettük, míg teljesen be nem nőttek a tenyésztőedényt. Ezt követően újra hőkezeltük a sejteket (mindegyiket az előző feltételeknek megfelelően), és a túlélőket ismét felszaporítottuk. Tízszer ismételtük meg a hőkezelési és felnövesztési ciklust, s annak megfelelően neveztük el a sejtvonalat, hogy mennyi ideig voltak kitéve hőkezelésnek, pl. azok a sejtvonalak, amelyek 60 perces 45°C -os hőkezelésen estek át 10 cikluson keresztül, a (10x60) elnevezést kapták.

4.4 Szubklónok izolálása

Klónokat izoláltunk a tizedik hő-sokkot követően felnövesztett sejtvonalakból. 140mm átmérőjű Petri-csészékbe 1×10^6 sejtet helyeztünk és 7-10 nap elteltével mikroszkóppal vizsgálva kijelöltük az izolálni kívánt telepeket. Szilikon zsírba mártott fémgűrűt helyeztünk rájuk és tripszin segítségével leválasztottuk a sejteket a Petri-csészéről, majd normál tápfolyadékba, 35mm-es csészékbe helyeztük őket. Nevükben az Scl rövidítés utal a szubklón eredetre.

A T jelű szubklónokat hasonló eljárással izoláltuk, csak a kilencedik hő-sokkot követően a túlélő sejteket felszaporítottuk, majd 1×10^6 sejtet 140mm-es Petri-csészébe helyeztünk és 7 nap múlva ezeket hőkezeltük. A tizedik hő-sokkot túlélő kolóniákból választottuk ki és izoláltuk a szubklónokat.

4.5 Drogrezisztens sejtvonalak izolálása

Műanyag szövettenyésztő flaskákba azonos mennyiségű sejtet helyeztünk normál F12-S tápfolyadékba, majd a következő napon lecseréltük a tápfolyadékot colchicin tartalmúra (140ng/ml). Két hétig tenyésztettük a sejteket ezen a koncentráción, majd emeltük fokozatosan, kéthetenként, míg el nem értük a végkoncentrációt (1000 ng/ml). Ezeket a sejtvonalat a későbbiekben is

colchicin tartalmú (1000ng/ml) tápfolyadékban tartottuk fenn. Nevükben a colchicin rezisztenciára a c1000 jelzés utal.

4.6 A sejtvonalak és főbb jellemzőik (2.ábra)

- H56: spontán dedifferenciált (Dediff), dexametazon érzékeny (Dex S) [DW74], hőérzékeny (Hő S) sejtvonal.
- S-H56-26: dedifferenciált (Dediff), dexametazon rezisztens leánysejtje a H56 sejtnak, $2\mu\text{M}$ dexametazon tartalmú tápfolyadékban neveljük. Hőérzékeny (Hő S) sejtvonal [VD90].
- S-H56-106: dedifferenciált, dexametazon rezisztens leánysejtje a H56 sejtvonalnak, normál F12 5%FC tápfolyadékban neveljük, hőérzékeny (Hő S) sejtvonal [VD90].
- Faza 967: differenciált (Diff), dexametazon érzékeny (Dex S) [DW74], hőérzékeny sejtvonal.
- Klón 2: dedifferenciált, dexametazon rezisztens, hőérzékeny, laborunkban izolált sejtvonal [VPG80].
- Klón 2(10x60): dedifferenciált, dexametazon rezisztens, hőrezisztens (Hő R) sejtvonal, a klón 2 sejtéből izoláltuk laborunkban.
- Klón 2(10x70): dedifferenciált, dexametazon rezisztens, hőrezisztens sejtvonal, a klón 2-ből izoláltuk laborunkban.
- Klón 2(10x80): dedifferenciált, dexametazon rezisztens, hőrezisztens sejtvonal, a klón 2-ből izoláltuk laborunkban.
- Klón 2(10x80)T1: dedifferenciált, dexametazon rezisztens, hőrezisztens sejtvonal, a klón 2(10x80) sejtvonalból izoláltuk laborunkban.
- Klón 2(10x80)Scl 8, 9: dedifferenciált, dexametazon rezisztens, hőrezisztens sejtvonalak, a klón 2(10x80) sejtvonalból izoláltuk a laborunkban.
- Klón 2_{c1000}: dedifferenciált, drogrezisztens, hőérzékeny sejtvonal, laborunkban izoláltuk a klón 2 sejtvonalból.

- Klón $2(10 \times 80)_{c1000}$: dedifferenciált, drogrezisztens, hőrezisztens sejtvonallal, laborunkban izoláltuk a klón $2(10 \times 80)$ sejtvonalból.
- Klón $2(10 \times 80)T1_{c1000}$: dedifferenciált, drog- és hőrezisztens, laborunkban izoláltuk a klón $2(10 \times 80)T1$ sejtvonalból.

4.7 A sejtek kolóniaképző képességének vizsgálata

Azonos mennyiségű (1000 sejt/Petri-csésze) sejtet helyeztünk 60mm átmérőjű Petri-csészékbe, amelyek F12-S tápfolyadékot tartalmaztak. A korábban dexametazonon illetve colchicinen nevelt sejteket a kísérlet kezdete előtt egy héttel normál, drogmentes táptalajra helyeztük át. A Petri-csészékbe helyezett sejteket egyenletesen eloszlattuk, majd $37^{\circ}C$ -os termosztátba helyeztük a kontroll sejteket, illetve $45^{\circ}C$ -os termosztátba a hő-sokkolandó sejteket, amelyeket a megfelelő idő elteltével: 30, 50, 70, 90, 120 perc múlva visszahelyeztünk a $37^{\circ}C$ -os termosztátba. Egy hét elteltével tápfolyadékot cseréltünk a sejteken, majd újabb egy hét elteltével fixáltuk a Petri-csészék felületén a kolóniákat 10%-os formalinnal és megfestettük őket 1%-os kristályibolya oldattal. A kolóniák leszámolását követően megadtuk a túlélési %-ot a kontrollhoz viszonyítva. Nemcsak a telepek számát vizsgáltuk, hanem morfológiájukat, méretüket is.

4.8 Sejtek viabilitásának vizsgálata

A sejtek viabilitását hőstressz, valamint drogkezelés után Tripán kék festési eljárással vizsgáltuk. Azonos mennyiségű sejtet helyeztünk (1×10^5) 60 mm átmérőjű plasztik Petri-csészékbe, egyenletesen eloszlattuk a csészék alján, majd $37^{\circ}C$ -os termosztátba helyeztük őket. A következő napon hőkezelésnek ($45^{\circ}C$, 60, 70, 80 perc) tettük ki őket. A hő-sokkot követően tripszinezéssel eltávolítottuk a sejteket a Petri-csészék aljáról és centrifugálás (1000 rpm, $4^{\circ}C$) után PBS pufferrel ($0.13M NaCl$, $2.68 \times 10^{-3}M KCl$, $8.7 \times 10^{-3}M Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $1.7 \times 10^{-3}M Na_2PO_4 \cdot H_2O$) mostuk kétszer őket. Az utolsó mosást követő centrifugálás után $300 \mu l$ PBS pufferben felfuszpendáltuk a sejteket, majd $100 \mu l$ -t kivettünk és megfestettünk $50 \mu l$ Tripán kék oldattal (4:1 arányban 0.14% Tripán kék és 4.25% NaCl), 4 perc jégen állás után Buerker-kamra segítségével megszámláltuk az élő sejteket, valamint az elpusztultakat, amelyeket a bejutó

festék kékre színezett. A kontroll %-ában fejeztük ki a sejtek hő-sokkot követő túlélését.

Drogkezelés hatásának vizsgálatakor hasonlóan, mint a hőkezelés hatásának tesztelésekor, a második napon tettük a sejtekre a megfelelő koncentrációjú drogot tartalmazó táptalajt. A drogok hatását 1-2 és 3 nap elteltével vizsgáltuk. Tripszinezéssel eltávolítottuk a sejteket a Petri-csészékről, PBS pufferral történő mosást követően Tripán késsel festettük és számoltuk őket. A drogok hatását a kontrollhoz viszonyítva a gátlás %-ában adtuk meg.

4.9 Generációs idő meghatározása

Azonos mennyiségű sejtet (1×10^5) helyeztünk 60mm átmérőjű műanyag Petri-csészékbe, normál F12-S táptalajba. 4-5 párhuzamos csészét indítottunk és a következő 4 napon tripszin segítségével leválasztottuk a sejteket. Centrifugálást (1000rpm $4^\circ C$) követően a sejteket $500 \mu l$ PBS pufferben szuszpendáltuk, majd Buerker-kamra segítségével sejtet számoltunk. A generációs időt a sejtszámok időfüggvényében való ábrázolásából határoztuk meg.

4.10 TAT indukció és aktivitás mérés

A tirozin aminotranszferáz (TAT) enzim indukciójának méréséhez azonos számú (2×10^6) sejtet helyeztünk Petri-csészékbe, két nap elteltével $1 \times 10^{-6} M$ dexametazonnal indukáltuk 18 órán keresztül a sejteket. Indukciót követően a sejteket tripszinezéssel választottuk le a Petri-csészékről, kétszer öblítettük PBS-sel őket. A TAT enzim aktivitását Diamondstone [Dia66] módszere alapján végeztük. A sejtek feltárását TAT extrakciós puffer ($0.1 M KH_2PO_4$, $0.1 M K_2HPO_4$, $1 \times 10^{-4} M$ piridoxál foszfát, $1 \times 10^{-3} M$ α -ketoglutarát) jelenlétében folyékony nitrogénnel végeztük. Feltárás után 1 órán keresztül fugáltuk (13000 rpm), majd megmértük az aktivitását. A reakció során 1mU TAT enzim 1nmól p-hidroxi-fenil piruvát képződését katalizálja $37^\circ C$ -on 1 perc alatt (tirozin + α -ketoglutarát = p-hidroxifenil piruvát + glutamin). A p-hidroxifenil piruvát NaOH-val történő reakciója során 331 nm-nél elnyelést mutató p-OH-benzaldehydet hoz létre. A specifikus enzimaktivitás kiszámításához a fehérjetartalmat Lowry-féle [LRFR51] módszerrel határoztuk meg.

4.11 RNS preparálás és Northern-blot analízis

Azon kísérletek során, amikor a hő-sokk hatását vizsgáltuk a sejtek össz-RNS szintézisére, 25 ml-es szövettényesztő flaskákba 3×10^6 sejtet mértünk, 37°C -os termosztátban tenyésztettük őket. Az indítást követő harmadik, illetve ötödik napon 42°C , ill. 45°C -os vízfürdőben hőkezeltük a sejteket, majd közvetlenül a hő-sokk után (R0), és 3 (R3) órával, illetve a 45°C -os hő-sokkot követően azonnal (R0), 1.5 (R1.5) és 4.5 (R4.5) órával leszedtük tripszin segítségével a sejteket. PBS pufferral kétszer öblítettük a őket, majd össz-RNS-t preparáltunk guanidinium tiocianátos eljárással [CMR79]. Agaróz gélelektroforézis segítségével 1.2%-os gélen (2.2M formaldehid) molekulatömeg alapján elválasztottuk az RNS molekulákat, majd átblottoltuk őket nitrocellulóz filterre. Hibridizációt az alább felsorolt ^{32}P -jelölt "random priming" DNS próbákkal végeztünk [FV83] :

- a TAT enzim mRNS-ét specifikusan felismerő pcTAT-3 [SSS*82]
- a hsp 68 mRNS-t specifikusan felismerő pM1.8 [ZWH88]
- a hsp 70 mRNS-t specifikusan felismerő pRC62 [OMBK85]
- a hsp 90 mRNS-t specifikusan felismerő pH801 [HBS*86]
- az albumin mRNS-t specifikusan felismerő pRSA13 [CTD*90]
- a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázt specifikusan felismerő GAPD-t [FMP*85]

a mRNS szint meghatározására, belső kontrollként használtuk kísérleteinkben.

4.12 Sejtek fehérjeszintézisének vizsgálata

Azonos mennyiségű (3×10^5) sejtet helyeztünk 35mm átmérőjű műanyag Petri-csészékbe, az indítást követő harmadik napon hőkezeltük a sejteket vízfürdőben. A tápfolyadék 40mM MOPS (Sigma) puffert tartalmazott, amelyet 1 órával a hőstressz előtt tettünk bele, s ezt követően légmentesen lezártuk a Petri-csészéket. A hő-sokk után lecseréltük a csészék tápfolyadékát 500 - 500 μl F12-S metionin-mentes tápoldatra, amelyhez 50 μCi radioaktív metionint (Amersham, specifikus aktivitása: 48 TBq/mmol) adtunk. A fehérjék

radioaktív jelölése legtöbbször 3, ill. 18 órahosszáig tartott. A jelölés végén a radioaktív tápfolyadékot eltávolítottuk, és jégen kétszer mostuk a sejteket PBS pufferrel, majd csészénként $200\mu\text{l}$ Laemmli mintafellevő pufferben feltártuk a sejteket [Lae70]. Az így nyert fehérje mintákat melegítéssel denaturáltuk (95°C , 10 perc), ezt követően pedig 12%-os poliakrilamid gélen (0.1% SDS) egy-dimenziós gélelektroforézis segítségével molekulatömeg szerint elválasztottuk a fehérjemolekulákat [OFa75]. A fehérjegyégeket Comassie festéssel festettük (Comassie brillant blue R-250), majd megszárítottuk és röntgenfilmre (Medi-fort RP) helyeztük és 1-2 nap múlva előhívtuk.

4.13 Luciferáz enzim aktivitás mérése

Azonos mennyiségű sejtet (2×10^6) helyeztünk 60mm átmérőjű plasztik Petri-csészékbe, normál táptalajba. A következő napon a transzfekeció kezdete előtt 3 órával táptalajt cseréltünk. A transzfekeció során hozzáadtuk a sejtekhez cseppenként, lassan rázogatva a kalcium-foszfát-DNS(pCMVLuc)[FH86,WWD*87] precipitátumot, amelyet a transzfekeció kezdete előtt 20 perccel összemértünk: $10\mu\text{g}$ DNS + $250\mu\text{l}$ 2xHBS puffer (pH6.95) + $250\mu\text{l}$ CaCl_2 (2M 7x hígításban), cseppenként hozzáadva. Szobahőmérsékleten tartottuk a sejteket húsz percig, majd F12 10%Fc táptalajt adtunk a sejtekhez, és 37°C -ra helyeztük őket. Hat órával később táptalajt cseréltünk a sejteken. A kísérlet harmadik napján a sejteket kétszer öblítettük F12 táptalajjal, majd tripszinezést követően azonos mennyiségeket helyeztünk 35mm átmérőjű Petri-csészékbe. A következő napon vízfürdőben 42°C -on hőkezeltük a sejteket, és ezt követően BRLUC pufferben ($550\mu\text{l}$) szedtük le őket. A BRLUC puffer összetétele:

- 25mM TRIS – PO_4 , pH7.8
- 8mM MgCl_2
- 1% TritonX
- 15% glicerol
- 1mM EDTA
- 0.1mg/ml BSA
- 1mM DTT

- 0.2mM PMFS

A mérés során a 250 μ l mintához 4 μ l ATP-t (20mM, Sigma) és 30 μ l luciferint (1mM, Sigma) adtunk, gyors rázást követően folyadék-szcintillációs mérőműszerrel (LKB) mértük a foton kibocsátást [NMB88].

4.14 ECL Western-blot analízis

1x10⁶ sejtet indítottunk 25 ml-es szövettenyésztő flaskában. Az indítást követő napon hőkezeltük a sejteket (45°C, 15 perc). A sejteket tripszinezés előtt egyszer, a tripszinezést követően kétszer öblítettük PBS-sel, jégen. A lefugált (1000rpm, 5 perc, 4°C) sejteket TRIS-mannitollal kétszer mostuk, majd 300-300 μ l 20%-os TCA-t adtunk hozzá. A fehérjemérést módosított Lowry eljárással végeztük [LRFR51]. A fehérje mintákat DB pufferben hígítottuk, 1 μ g/ μ l végtérfogatra. A fehérjemolekulákat 7%-os SDS poliakrilamid gélen választottuk el (100-130 V/5h), ezt követően a fehérjéket PVDF membránra blottoltuk át (500mA, 1.5h). Majd a 4077 elnevezésű, a humán mdr1 N-terminálisát felismerő poliklonális ellenanyagot helyeztük rá, és 18 h inkubációt követően TBS-TWEEN oldattal mostuk (2x20 perc), majd a második ellenanyagként az anti-nyúl IgG peroxidázt (Promega) használtuk. Egy óra elteltével TBS-TWEEN oldattal mostuk, majd ECL oldattal (Amersham) előhívtuk. Ezt követően röntgen filmen exponáltuk.

5. Eredmények és megvitatásuk

5.1 Hőrezisztens sejtek izolálása és jellemzése

5.1.1 Hőrezisztens sejtek izolálása

Annak a kérdésnek a megválaszolásához, hogy lehet-e hőrezisztenseket izolálni a sejtvonalainkból, az eltérő fenotípusú és hőérzékenységű (1. ábra) H56, S-H56-26, S-H56-106, Faza 967 és klón 2 sejtvonalat választottuk ki. Az izoláláshoz egy irodalomból ismert módszert alkalmaztunk [HvK88], amelynek során a sejteket ciklikusan különböző idejű (60, 70 és 80 perc) 45°C-os hőkezeléseknek tettük ki és a túlélőket felnövesztettük, a túlélő sejteket a ciklus sorszámával és a hőkezelés idejével jelöltük meg, pl. a klón 2 sejt tizedik 60 perces hőkezelést túlélő klónja a klón 2(10x60). A sejtek viabilitása, amelyet minden egyes hő-sokkot követően Tripán kék festési eljárással teszteltünk, a ciklusok számának előrehaladtával a hosszabb ideig hőkezelt sejtvonalaknál nőtt meg leginkább, pl. a tizedik ciklust követően a klón 2(10x80)-nál a kezdeti 25%-ról 75%-ra nőtt, míg a rövidebb idejű sorozatos hőkezeléseknek kitett klón 2(10x60) és klón 2(10x70) esetében alig változott (4-5%-kal nőtt). Ezt követően a hőrezisztens sejtvonalakból szubklónokat (T és Scl jelzésűek) izoláltunk, így rendelkezésünkre álltak mind kevert populációk, mindpedig egyedi klónok.

5.1.2 Rezisztencia teszt, stabilitási teszt

Az izolálási eljárás után, amely kb. 8-12 hónapot vett igénybe, megvizsgáltuk mind a kevert populációk, mind az egyedi klónok kolóniaképző képességét különböző idejű (30', 50', 70', 90') 45°C-os hőkezelés után, hogy adatokat kapjunk a hőrezisztencia mértékére. A számos tesztelt sejtvonalt különböző mértékben vált rezisztenssé a hővel szemben, közülük a klón 2 hőrezisztens származékai

a klón 2(10x60), (10x70) és (10x80) bizonyultak a legrezisztensebbeknek. A továbbiakban ezért ezen sejtvonalaknak, illetve szubklónjainak a jellemzésével foglalkoztunk. Az izoláció után közvetlenül tesztelve a klón 2 hőrezisztens származékainak a plating efficienciája hasonló volt a szülőéhez (3. ábra), azaz 1000-1200 sejtből mintegy 3-400 képezett kolóniát kontroll körülmények között. Azonban 70 perces hő-sokkot követően a klón 2 már egyáltalán nem formált kolóniát, míg az összes rezisztens esetében számos telepet találtunk (3. ábra, 3.1 táblázat). A három rezisztens sejtvonál közül mind telep méret, mind telepszám tekintetében a klón 2(10x60) bizonyult a legkevésbé rezisztensnek, míg a két másik sejtvonál egymáshoz közel hasonló értékeket mutatott.

A hőrezisztencia stabilitásának vizsgálatát 4 hónapig folyamatosan kultúrában nevelt sejtvonalakokkal végeztük el. Különböző idejű (30', 50', 70', 90') 45°C-os hőkezeléssel tesztelve a kolóniaképző képességet, megállapítottuk, hogy a klón 2(10x70) kis mértékben veszített a rezisztenciájából, míg a klón 2(10x60) és a klón 2(10x80) sejtvonál teljesen megőrizte azt. Alapvetően mind a három sejtvonál rezisztens maradt a szülői klón 2 sejtvonálhoz képest.

Tehát elmondhatjuk, hogy a klón 2(10x80) esetében sikerült stabil, magas fokú hőrezisztenciát mutató sejtvonalat izolálnunk, amely hosszabb ideig való kultúrában tartás után is megőrizte rezisztenciáját. Megvizsgáltuk ebből a sejtvonalból származó egyedi klónok hőrezisztenciáját is. A morfológiai különbségek alapján kiválogatott Scl jelű szubklónok, illetve T jelű szubklónok eltértek egymástól hőrezisztencia tekintetében (4. ábra, 4.1 táblázat). Az általunk vizsgált klónok többsége kevésbé bizonyult rezisztensnek hővel szemben, mint a klón 2(10x80) sejtvonál. A legrezisztensebb sejtvonálnak a T1 elnevezésű szubklón bizonyult. A kolóniaképző képesség alapján vizsgált rezisztencia kis mértékben meghaladta a szülői sejtvonálét is (4. ábra, 4.1 táblázat) és több hónapos folyamatos fenntartást követően is stabilan fennmaradt.

5.1.3 Sejtmorfológia és dexametazon rezisztencia

A klón 2 sejtvonál lapos, nem túl nagy sejtekből áll, erősen tapad a tenyésztőedény aljára. A hőrezisztens származékok általában nagyobbak, elnyúltabbak (5. ábra), kevésbé tapadnak, generációs idejük megegyezik a szülőével (23-26 óra).

Mivel a klón 2 szülő dexametazon rezisztens, ezért megvizsgáltuk, hogy a hőrezisztens sejtvonalak megőrizték-e a dexametazon rezisztenciát. Megállapítottuk, hogy a hőrezisztens variánsok a szülőhöz hasonlóan dexametazon rezisztensek maradtak, 10^{-6} M dexametazon jelenlétében megőrizték osztódó

képességüket.

5.1.4 Májspecifikus funkciók vizsgálata

A differenciált hepatóma sejtek (pl. Faza 976) - a felnőtt májsejtekhez hasonlóan - nagy mennyiségben termelnek albumint és TAT (tirozin aminotranszferáz) enzimet. Ez utóbbi szintézise dexametazon kezeléssel (10^{-6} M, 18h) indukálható. A szülői sejtvonalkunk, a klón 2 többek között ezeket a tulajdonságait is elvesztette, dedifferenciálttá vált. Megvizsgáltuk, hogy az általunk izolált hőrezisztens sejtvonalakban visszatérnek-e a fent említett májspecifikus funkciók. Az albumin mRNS szintézist Northern-blot analízissel, specifikus albumin cDNS próba segítségével teszteltük. Albumin termelődést sem a klón 2-ben, sem a hőrezisztens vonalakban nem tudtunk kimutatni. A TAT enzim mRNS szintézist szintén Northern-blot analízissel és a TAT mRNS-re specifikus cDNS próba [SSS*82] hibridizálásával követtük nyomon, illetve az enzim aktivitását is vizsgáltuk [Dia66]. A 6. ábrán jól látható, hogy míg a differenciált Faza 967 sejtvonalk jelentős mennyiségben termelt TAT mRNS-t, addig a dedifferenciált klón 2 nem, vagy csak igen kis mennyiségben. Ugyanakkor két hőrezisztens vonalban (10x60 és 10x70) kis mértékben megnövekedett a szülőhöz képest a TAT mRNS szint. Az enzim aktivitást megvizsgálva megállapítottuk, hogy a Faza 967 sejtben dexametazon kezeléssel nagy mértékben indukálható a TAT, míg a klón 2-ben, a klón 2(10x80)-ban és T1 szubklónjában nem mutatható ki enzim aktivitás az indukciót követően sem. Azonban a két hőrezisztensben, amelyekben az enzim alapszintje eleve magasabb volt, kis mértékben tovább növekedett az enzim mennyisége az indukciót követően (6.1. táblázat). Látható, hogy a hőrezisztens sejtvonalk dedifferenciáltak maradtak, nem nyerték vissza az összes általunk vizsgált májfunkciót.

5.2 Hőrezisztens sejtek stresszválasza

5.2.1 A fehérjeszintézis vizsgálata

5.2.1.1 A hő-sokk fehérjék konstitutív szintje megváltozott a hőrezisztens sejtvonalakban

A májspecifikus funkciók vizsgálata után kíváncsiak voltunk arra, hogy tapasztalunk-e eltérést a hőrezisztens sejtvonalk és a szülői sejtvonalk stresszválasza között,

megjelent-e a hőrezisztens sejtekben új hő-sokk fehérje, megváltozott-e a konstitutív hő-sokk fehérjék alapszintje, illetve hőstresszt követően a fehérjék indukálhatósága a hőrezisztens sejtvonalakban.

Korábbi vizsgálati eredményeinkből tudtuk, hogy a hepatóma sejtek viabilitását a 42°C-os 3 órás hőkezelés (enyhe hő-sokk) nem befolyásolja jelentős mértékben. Ez a kondíció enyhe stresszhatásnak számít, de alapvető változást idéz elő a sejtek fehérjeszintézisében. Ezért először 42°C-os három órás hőkezelés után vizsgáltuk meg a szülői és a hőrezisztens sejtvonalak fehérjemintázatát ³⁵S-metionin jelölést követően egy és két dimenziós gélelektroforézis segítségével.

Megállapítottuk, hogy új, a szülőben nem detektált hő-sokk fehérjét nem tudunk ezzel a módszerrel kimutatni a hőrezisztens variánsokban, tehát a hőrezisztencia kialakulásáért a sejtvonalakban feltehetőleg nem egy új hő-sokk fehérje a felelős.

Az állandóan jelenlevő, konstitutív hő-sokk fehérjék közül a viszonylag nagy mennyiségben jelenlevő hsp110, 90 és 70 szintje megnövekedett a hőrezisztens sejtvonalakban, legnagyobb mértékben a klón 2(10x80) sejtben. A megemelkedett alapszintű hő-sokk fehérjék szintézise azonban 42 °C-os 3 órás hő-sokk hatására kisebb indukciót mutatott, mint a szülői sejtvonalonban (7. ábra). A hőrezisztens sejtek fehérjemintázata nemcsak a konstitutív fehérjék, hanem az indukálható fehérjék tekintetében is eltért a szülőétől.

Korábbi kísérleteinkből tudjuk, hogy a klón 2 sejtben a hsp68 hő-sokk fehérje sokkal kevésbé indukálódott, mint a szülői Faza 967 sejtben, azaz a klón 2 deficiens a hsp68 hőindukációjában [PND*92]. A hőrezisztens sejtek fehérjemintázatát megvizsgálva enyhe hő-sokkot követően, látható, hogy ezekben nem nőtt, sőt tovább csökkent a hsp68 indukálhatósága. A klón 2(10x80) sejtvonalonban a legerősebb a hsp68 indukálhatósága, de nem éri el a szülői sejtben kimutatott szintet.

5.2.1.2 A hőrezisztens sejtvonalakban megváltozott a hő-sokk fehérjék indukációs kinetikája enyhe, 42°C-os hőkezelést követően

Annak az eldöntésére, hogy a hőrezisztens sejtekben tapasztalt eltérő fehérjeindukció a megváltozott indukációs kinetikának köszönhető-e vagy sem, az alábbi kísérletet végeztük el. Ennek során gyenge, 42°C-os hő-sokk kezelést alkalmaztunk 3 órán keresztül és fehérjeszintézist mind a kezelés alatt, mind az azt követő felépülési fázisban ³⁵S-metionin beépülésének segítségével

köveltük nyomon. Pulzusjelölést alkalmazva, a sejteket a hő-sokk alatt 3 óra-hosszáig, illetve a hő-sokkot követő 9 óra felgyógyulási (recovery) szakaszban 3 órás periódusonként jelöltük. Ezután a fehérjemintákat egy dimenziós SDS poliakrilamid gélelektroforézissel vizsgáltuk.

A 8. ábrán látható, hogy a klón 2(10x80) hőrezisztens sejtben gyorsabb a hő-sokk fehérjék indukciója, mint a szülői klón 2 sejtben. A konstitutívan is szintetizálódó, megnövekedett alapszintű hsp110, 90 és 70 indukciós kinetikája is jelentős változást mutat a hőrezisztensben.

Ezek a fehérjék már a hő-sokk ideje alatt intenzívebben szintetizálódtak, mint a szülőben, és ez a magas szint megmaradt végig a vizsgált időszak alatt, míg a szülőben a hő-sokktól kezdve fokozatosan emelkedett a fehérje mennyisége a hatodik óra végéig, és ebben az időintervallumban a szintézis mértéke meghaladta a hőrezisztensben tapasztalt szintet. Elmondhatjuk, hogy bár a hőrezisztens sejtvonalon a hő-sokk alatt intenzívebben indukálódnak a konstitutív hő-sokk fehérjék, a szülői sejtben az indukció mértéke már a harmadik órában meghaladja a hőrezisztens sejtben mért értéket.

A nem konstitutív hőindukálható fehérjék, mint például a hsp68 indukciós kinetikája is eltérő a két sejtben. A szülőben a hsp68 maximális indukciója a hő-sokkot követő 0 és 6 óra között található, addig a klón 2(10x80) sejt esetében már a hő-sokk ideje alatt intenzíven szintetizálódik, és a felgyógyulás 3. óráját követően meg is szűnik a szintézise. Bár a hőrezisztens sejtekben megváltozott a hsp68 indukciós kinetikája, de az indukció mértéke továbbra is alacsonyabb maradt, mint a szülőben. Ily módon kísérletünk alapján elmondhatjuk, hogy az enyhe, 42°C-os hőkezelés a hőrezisztensben gyorsabban váltja ki a hő-sokk fehérjék indukcióját, de az indukció mértéke alacsonyabb maradt mind a konstitutív fehérjék, mind pedig a hőindukálta hsp68 esetében. Valószínű, hogy ez az enyhe hőkezelés a hőrezisztens sejtvonalon esetében nem váltja ki a hő-sokk fehérjék maximális indukcióját, a védelemhez elégséges az alacsonyabb fokú indukciója a hsp 68-nak és már eleve magasabb alapszintű konstitutív fehérjéknek is, így a csökkent mértékű indukció nem a megváltozott kinetikának köszönhető.

5.2.1.3 A hőrezisztensekben erős hő-sokkot követően megszűnt a deficiencia a hsp68 indukciójában

Felvetődött a kérdés, hogy erősebb hőhatás kivédéséhez a hőrezisztensekben szükséges-e a hő-sokk fehérjék intenzívebb indukciója, megváltozik-e az indukciós kinetika.

Ennek eldöntéséhez a 45°C-os hőkezelést választottuk, ezen a hőmérsékleten már néhány perces kezelést is erős környezeti stresszként élnek meg a hepatóma sejtek, és intenzív hő-sokk fehérje szintézissel válaszolnak rá [PND*92]. Sőt, hosszabb kezelés hatására el is pusztulnak (1. ábra).

Kísérletünkben összehasonlítottuk két szülői (Faza 967 és klón 2) és két hőrezisztens sejt vonal (klón 2(10x60), (10x80)) stresszválaszát 45°C-os 10, 20 illetve 30 perces hőkezelést követően. A sejtekből nyert fehérjemintákat 1 dimenziós SDS poliakrilamid gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk miután az újonnan szintetizálódott fehérjéket ³⁵S-metioninnal jelöltük a hő-sokkot követő 18 órán keresztül.

A 9. ábra mutatja, hogy a hőérzékeny klón 2 és Faza 967 fehérje szintézisét a 30 perces 45°C-os hőkezelés erősen gátolta, míg a hőrezisztensekben intenzív fehérje szintézis mutatható ki, amely szintén igazolja, hogy hővel szemben valóban ellenállóbbak. A klón 2 sejtben a hsp68 indukálhatósága csökkent mértékű maradt a Faza 967 sejtéhez viszonyítva. Ezzel szemben a klón 2 hőrezisztens variánsaiban megszűnt ez a hsp68 indukciójában kimutatható a deficiencia. A két hőrezisztensben sokkal intenzívebben (bár különböző mértékben) indukálódott a hsp68, mint a klón 2 sejtben. Sőt, a klón 2(10x80) sejtben a Faza 967 sejtéhez hasonló magas szintet ért el.

A klón 2(10x80) szubklónjait is megvizsgálva 15 perces 45°C-os hőstresszt követően teljesen hasonló eredményre jutottunk (10. ábra). Tehát a hsp68 a szubklónokban is erőteljesen indukálódik a hőkezelést követően. Látható, hogy az erős, 45°C-os hőkezelés okozta károsodások kivédéséhez a hőrezisztens sejt vonalakban szükség van a hsp68 megnövekedett mennyiségére.

Annak eldöntéséhez, hogy a hőrezisztensek hő-sokkal szembeni védelmében szerepet játszik-e a hő-sokk fehérjék indukciós kinetikájának megváltozása a sejt vonalakat 45°C-os 15 perces hőkezelésnek tettük ki. Ezután radioaktívan (³⁵S-metionin) jelöltük a szintetizálódó fehérjéket: egyrészt a hő-sokk alatt, másrészt a hő-sokkot követő 18 órás felgyógyulási időszakban 3 órás periódusokban, illetve 18 órán keresztül folyamatosan. A 11. ábrán látható, hogy a hsp68 indukciós kinetikája gyorsabb a klón 2(10x80) sejtben. A klón 2 sejtnél a maximális indukció a felgyógyulási periódus 6-12. órájáig tartott, míg a klón 2(10x80) sejtnél 3-9. órájáig. A hőrezisztens sejt vonalban a többi hő-sokk fehérje szintézise is korábban kezdődött és az indukció általában rövidebb ideig tartott, mint a hőérzékeny szülőben.

5.2.1.4 A fehérjeszintézis vizsgálatának összefoglalása

Az eddigieket összefoglalva elmondható:

- A hőrezisztens variánsok és a belőlük izolált szubklónok és T klónok fehérjemintázata eltért a hőérzékeny klón 2 sejtvonaltól. Az eltérés elsősorban a hőrezisztenseknek a klón 2 sejtvonalthoz képest megnövekedett a hsp110, 90 és 70 konstitutív szintjében jelentkezett.
- A rezisztensek hőkezelést követő stresszválasza is eltért a hőérzékeny sejtvonaltól, hiszen
 - 42°C-os kezelés hatására a hsp68 kisebb mértékű indukciót mutatott, mint a klón 2 sejtben
 - 45°C-os kezelést követően a hsp68 csökkent indukálhatósága részben vagy teljesen megszűnt a rezisztensekben.
- A hő-sokk fehérjék indukciós kinetikája megváltozott a hőérzékeny sejthez képest, ugyanis a hőrezisztensekben a hő-sokk fehérjék szintézise korábban jelent meg és rövidebb ideig volt kimutatható.

A kísérleti eredmények alapján elmondható, hogy a hsp68 gyors és megnövekedett indukciója szükséges az erős hőkezelések okozta károsodások kivédéséhez, de egymagában nem elégséges a hőrezisztencia kialakulásához, hiszen a hőrezisztensekben az indukálhatóság hasonló, mint a hőérzékeny Faza 967 sejtben. A hőrezisztencia kialakulásáért feltehetőleg nem csak egyetlen tényező felelős, a konstitutív hsp110, 90 és 70 alapszintjének megnövekedése éppúgy szerepet játszhat benne, mint a hsp68 megnövekedett indukálhatósága.

5.2.2 mRNS szintézis a patkány hepatóma sejtekben

Mint az előzőekben láthattuk, a hőérzékeny és hőrezisztens sejtvonalaink jelentős különbséget mutatnak fehérjemintázatban. Az egyes sejtvonalak fehérjeszintézisében jelentkező különbségek oka lehet mind transzlációs, mind transzkripciós kontrollbeli eltérés. Szükségessé vált annak vizsgálata, hogy milyen korrelációt mutat a sejtek mRNS szintézise a fehérjeszintézissel az általunk vizsgált hő-sokk fehérjék esetén. Nyomon követtük a mRNS szintézist mind 42°C-os, mind 45°C-os hőkezelést követően.

5.2.2.1 mRNS szintézis 42°C-os kezelést követően

A hő-sokkot követő mRNS szintézis vizsgálatához 42°C-os (3 órás) hőkezelés után közvetlenül, valamint a felgyógyulási periódus harmadik órájában preparáltunk össz-RNS-t a sejtekből. Radioaktívan jelölt (^{32}P -ATP és CTP) cDNS próbát használva, Northern-blot analízis segítségével nyomon követtük a hőérzékeny és hőrezisztens sejtekben a mRNS mennyiségét és indukciós kinetikáját. A hőindukálható hsp68 mRNS-nek kimutatását pM1.8 plazmival való hibridizáció tette lehetővé.

A hsp68 mRNS-e a kontroll mintákban nem volt ki mutatható, csak a hő-sokkoltakban (12/a. ábra). A hőérzékeny Faza967 sejtben már a hő-sokk után közvetlenül nagy mennyiségű hsp68 mRNS jelent meg, amelynek a mennyisége kis mértékben még tovább nőtt a felgyógyulás ideje alatt. A szintén hőérzékeny klón 2 sejtben a hsp68 mRNS csak csekély mennyiségben szintetizálódott, a már korábban leírt deficienciának megfelelően. A hőrezisztensekben eltérő mértékű indukciót tapasztaltunk. A klón 2(10x60) sejtben az indukció mértéke alatta maradt a klón 2 sejtbelinek, ami korrelál a fehérjeminták vizsgálatokor kapott eredményekkel. A másik hőrezisztens sejtben, a klón 2(10x80)-ban a hsp68 mRNS indukciója lényegesen intenzívebb volt, mint a klón 2 sejtben, ellentétben a fehérjék szintézisével tapasztaltakkal. Tehát a hőrezisztens klón 2(10x80) sejtben nagyobb mennyiségű mRNS-ről kevesebb fehérje szintetizálódott. Ez feltehetőleg a mRNS-ek stabilitásbeli különbségével vagy egy - a transláció szintjén életbe lépő - szabályozó mechanizmussal magyarázható.

A konstitutívan szintetizálódó és hővel indukálható hsp90 mRNS a radioaktívan jelölt pH801 próba hibridizációját követően volt kimutatható az össz-mRNS preparátumból. A hőrezisztensekben a hsp90 mRNS alapszint megnövekedett, és mindegyik sejtvonalon intenzíven indukálódott a hő-sokkot követően, a fehérjeszintézis vizsgálatoknál kapott eredményekkel teljes összhangban (12/a. ábra). A hőrezisztens sejtekben kis mértékben megváltozott a hsp90 mRNS indukciós kinetikája a klón 2 sejthez viszonyítva.

5.2.2.2 mRNS szintézis 45°C-os kezelést követően

A mRNS szintézist nyomon követtük erős, 45°C-os 15 perces hő-sokk kezelést követően. Ennek során össz-mRNS-t izoláltunk közvetlenül a hő-sokk után, illetve azt követően 1.5, 3 és 4.5 óra elteltével a Faza967 sejtéből valamint a klón 2 sejtéből és hőrezisztens variánsaiból. Northern-blot analízis segítségével elemeztük a sejtek hsp68, hsp70 és hsp90 mRNS szintézisét (12/b ábra). Megvizsgálva a hsp68 mRNS indukcióját a sejtvonalainkban megállapítottuk,



hogyan az a klón 2 sejtben deficiens maradt. A hőrezisztens variánsokban a fehérje szintézissel korrelációban a hsp68 mRNS indukciója megnövekedett, és a két hőrezisztens különbözött mind az indukció mértékében, mind pedig a kinetikájában (12/b. ábra).

A konstitutívan indukálódó hő-sokk fehérjék közül megvizsgálva a hsp90 mRNS szintézisét megállapítottuk, az előző kísérlettel egybehangzóan, hogy megnövekedett a hsp90 mRNS alapszintje a rezisztensekben. A hő-sokkot követően erősen indukálódott mind a hőérzékeny sejtekben, mind a hőrezisztensekben, de az indukció kinetikája eltérő, a hőrezisztens sejtekben korábban, már felgyógyulási periódus első 1.5 órájában nagy mennyiségű mRNS szintetizálódott.

Az általunk vizsgált másik konstitutív fehérje a hsp70, melynek mRNS-e specifikusan hibridizál a radioaktívan jelölt pRC62 DNS próbával. A hsp70 mRNS alapszintje megemelkedett a hőrezisztens variánsokban, legnagyobb mértékben a klón 2(10x80)-ban (12/b. ábra). A 45°C-os 15 perces hőkezelést követően mindegyik sejtvonalon intenzíven indukálódott a hsp70 mRNS, és az indukció mértéke a legnagyobb alapszinttel rendelkező sejtekben volt a legalacsonyabb. Tehát itt sem tapasztaltunk eltérést a fehérjeszintézissel összehasonlítva. Az indukció kinetikája a hsp90 mRNS-hez hasonló, tehát a hőrezisztensekben a hő-sokkot követően gyorsabban szintetizálódott a mRNS.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a fehérjeszintézis eredményeivel megegyezően a konstitutív hsp90 és hsp70 alapszintje egységesen megemelkedett a hőrezisztensekben. Azonban az indukciójuk mértéke és kinetikája eltérő volt. A hsp68 mRNS indukciója különbözött gyenge és erős hő-sokkot követően. A 42°C-os kezelést követően a hsp68 mRNS szintje nem korrelált a fehérje szinttel a klón 2(10x80) sejtvonalon.

5.2.3 Hőérzékeny riporterfehérje stabilitásának vizsgálata

Az előző kísérletekből kiderült, hogy a hőrezisztens sejtekben néhány fehérjének megemelkedett a konstitutív szintje. Felmerült az a kérdés, hogy ezeknek van-e szerepe a többi fehérje hővel szembeni védelmében. Erre a kérdésre hőérzékeny riporter fehérje (szentjánosbogár luciferáz) stabilitásának nyomon követésével kerestük a választ.

A patkány hepatóma sejtvonalkba transzfektálható a citomegalovírus promotere mögött szentjánosbogárból izolált luciferáz struktúrgént hordozó pCMVLuc plazmid [FH86,WWD*87], amelyről emlős sejtvonalakban átme-

netileg expresszáldik az enzimatikusan aktív luciferáz. A luciferáz enzim ATP és Mg^{2+} jelenlétében két lépésben a luciferinből oxyluciferint állít elő, a folyamat végén AMP és CO_2 szabadul fel és foton lép ki. A fénykibocsátás intenzitásából következtethetünk a luciferáz mennyiségére a reakcióegyben [dWWd*87].

A kísérlet során a luciferáz enzim plazmidját bejuttattuk a hőérzékeny (klón 2) és a hőrezisztens (klón 2(10x60, 10x70, 10x80)) sejtekbe. Majd a transzfekciót követő napon 5, 10, 15, 20, 30 percen át $42^\circ C$ -os hőstressznek tettük ki a sejteket, és a fénykibocsátás intenzitásából következtettünk a működőképes, - a hőhatás következtében nem degradálódott - aktív enzim mennyiségére. Megállapítottuk, hogy a hőérzékeny klón 2 sejtben a luciferáz enzim aktivitása már 5 perc $42^\circ C$ -os hőkezelést követően több, mint 50%-kal csökkent a kontroll sejtekhez viszonyítva, míg az ilyen mértékű aktivitás csökkenés a hőrezisztensekben (klón 2(10x60) és (10x70)) megközelítőleg csak 20 perces hőkezelés után következett be, illetőleg a klón 2(10x80) sejtvonalon pedig még később (13. ábra).

A hőrezisztensekben tapasztalt magasabb enzimaktivitásból arra következtethetünk, hogy a hőrezisztensekben a hő-sokk fehérjék résztvesznek a hőrezisztencia kialakításában, oly módon, hogy megvédik az enzimfehérjéket, vagy struktúrfehérjéket a hő okozta degradációtól, illetve megakadályozzák az újonnan képződött fehérjék aberrációját, vagy a fehérje alegységek aggregációját.

5.3 A hőrezisztens sejtek drogrezisztenssé váltak

Irodalomból ismert, hogy bizonyos sejtek hőérzékenységének megváltozása befolyásolhatja különböző, a gyógyászatban használatos szerekekkel szembeni érzékenységüket is. Ezért megvizsgáltuk az általunk izolált hőrezisztens sejtek drogrezisztenciáját is. A sejtvonaink drogrezisztenciájának tesztelésére több módszert is alkalmaztunk, például drogkezelést követően teszteltük a sejtek kolóniaképző képességét, amellyel a drogok hosszútávú hatását vizsgáltuk. Az XTT (egy viszonylag újonnan előállított tetrazolium só) segítségével a sejtek enzimatis aktivitását követtük nyomon, míg a Tripán kék festési eljárással a sejtek viabilitását vizsgáltuk drogkezelés után, az elkövetkezőkben az így kapott eredményeket összehajtem.

Ahhoz, hogy az egyes sejtvonalak drogrezisztenciáját számszerűleg is összehajtem tudjuk hasonlítani, a Tripán kék festési eljárást követően meghatároztuk a sej-

tek LD50 értékét. Az LD50 érték a drogoknak azon koncentrációja, amelynél a sejtek 50%-a elpusztul egy meghatározott kezelési idő után. Kísérleteink során az élősejtszámot 1, 2 és 3 nap drogkezelést követően határoztuk meg Tripán kék festéssel, a kapott értékeket a kontroll sejtszám százalékában fejeztük ki és grafikusán ábrázoltuk (14.ábra).

Kezdetben meghatároztuk a drogkoncentrációknak azt az intervallumát, amelybe az LD50 érték beletartozik, különböző koncentrációjú drogokkal 1, 2 és 3 napig kezeltük a sejteket. Ezután az így megtalált intervallumot tovább finomítottuk, majd a viabilitás értékek grafikus ábrázolásával, grafikus interpolációval nyertük az LD50 értékeket. Ezt az eljárást mind a szülői klón 2 sejttel, mind a hőrezisztens sejtvonalakkal elvégeztük néhány, szerkezetében és hatásmechanizmusában eltérő kemoterápiás szerrel (vinblastin, puromycin, actinomycin D, doxorubicin, colchicin). Mivel a három nap drogkezelés bizonyult a leghatékonyabbnak a 15/a. táblázatban a három nap drogkezelést követően meghatározott LD50 értékeket tüntettük fel. A könnyebb áttekinthetőség kedvéért meghatároztuk a relatív rezisztencia értékeket is, amelyeket a rezisztens sejtek LD50 értékének és a szülői klón 2 sejt LD50 értékének a hányadosaként kaptunk meg (15/b. táblázat).

A táblázatok adatai alapján megállapítható, hogy mind az öt alkalmazott kemoterápiás szerrel szemben kialakult rezisztencia a vizsgált hőrezisztens sejtekben. A klón 2(10x80)T1 sejtben mindegyik droggal szemben magasabb fokú rezisztenciát tudunk kimutatni, mint a klón 2(10x80) sejtben. A hőrezisztens sejtek a puromycinnel szemben mutatták a legnagyobb rezisztenciát, míg a colchicinnel szemben voltak a legérzékenyebbek. Tehát a hőrezisztens sejtek néhány, a rákterápiában használatos droggal szemben rezisztenssé váltak, keresztrezisztencia kialakult ki bennük. Ezek a megfigyelések újabb kérdéseket vetettek fel:

- Az így szerzett drogrezisztencia fokozható-e drogon történő szelekcióval?
- A hőérzékeny szülőkből szelektálhatók-e drogrezisztens sejtvonalak?
- Hogyan viszonyul a drogrezisztencia szintje egymáshoz képest
 - a csak drogrezisztens,
 - a csak hőrezisztens,
 - a hő- és drogrezisztenciát is mutató sejteknél?
- A drogrezisztensek mutatnak-e keresztrezisztenciát más droggal szemben?

5.4. DROGREZISZTENS SEJTVONALAK IZOLÁLÁSA ÉS JELLEMZÉSE³¹

- A drogrezisztensek hőrezisztensekké válnak-e?
- Megváltozik-e a sejtek fehérjemintázata, köthető-e valamely hő-sokk fehérje megnövekedett szintéziséhez a drogrezisztencia?
- Mi a drogrezisztencia kialakulásának oka?

5.4 Drogrezisztens sejtvonalak izolálása és jellemzése

5.4.1 Drogrezisztens sejtvonalak izolálása

A felvetett kérdésekre választ keresve drogrezisztensek izolálásába kezdtünk. A kiválasztott sejtvonalakat (H56, Faza 967, klón 2, és a klón 2 hőrezisztens variánsai) fokozatosan növekvő koncentrációjú drogot tartalmazó táptalajon neveltük, az "Anyagok és módszerek" című fejezetben leírtak alapján. A drogszelekciót elsősorban colchicinnel végeztük. A fokozatos koncentráció emelésekkel kb. 2 hónap elteltével értük el az 1000ng/ml- es végkoncentrációt.

Ezt az eljárást a H56 és a Faza 967 sejtvonalnál nem sikerült maradéktalanul végrehajtani, ugyanis ezek a sejtek rendkívül érzékenyek bizonyultak már a colchicin alacsony koncentrációjára is, így a szelekció rendkívül hosszú időt vett volna igénybe. Ezzel szemben a klón 2 sejtből és a vizsgált hőrezisztens variánsaiból elő tudtunk állítani a fent leírt módon colchicinen növekvő sejtvonalakat (klón 2_{c1000}, klón 2(10x80)_{c1000} és klón 2(10x80)T1_{c1000}). A drogrezisztenciára az indexbe írt c1000 elnevezés utal.

5.4.2 A drogrezisztencia tesztelése a colchicinen növekvő sejteknél

A drogrezisztencia tesztelésekor a hőrezisztenseknél leírtakhoz hasonlóan jártunk el, a különböző módszerekkel kapott eredmények közül most csak a Tripán kék festéssel kapott eredményeket ismertettem. A 16/a. és 16/b. táblázatban a három nap drogkezelést követően kiszámolt LD50 és relatív rezisztencia értékeket tüntettük fel a szülői klón 2 és a colchicinen növekvő sejtvonalaknál.

Megvizsgálva a táblázatok adatait, megállapíthatjuk, hogy valamennyi szelektált sejtvonal jelentős mértékben rezisztenssé vált colchicinre és a többi kemoterápiás szerrel szemben is keresztrezisztenciát mutatnak.

5.4. DROGREZISZTENS SEJTVONALAK IZOLÁLÁSA ÉS JELLEMZÉSE32

A klón 2_{c1000} esetében a legjobban a puromycinnel szemben növekedett meg a rezisztencia, míg a legkevésbé a doxorubicinre lett rezisztens a sejt. A klón $2(10x80)_{c1000}$ sejtnél a colchicinnel szemben legnagyobb a rezisztencia, és a vinblasztin esetében a legalacsonyabb. Hasonló alacsony rezisztencia értéket mutat a vinblasztinnal szemben a másik hőrezisztens sejtvonalból izolált sejtünk, a klón $2(10x80)T1_{c1000}$. Ez a sejtvonal mutatja a legmagasabb rezisztencia értéket a colchicinnel szemben az összes izolált sejt közül, és hasonlóan a klón 2_{c1000} sejthez, a puromycinnel szemben alakult ki a legnagyobb szintű rezisztencia.

A keresztrezisztencia értékeket összehasonlítva, megállapítottuk, hogy a hőrezisztens sejtek mindegyik vizsgált kemoterápiás szerrel szemben, - hasonlóan, mint a colchicin esetében - viszonylag alacsony rezisztenciát mutattak. Ez az érték a colchicinszelekciót követően mindegyik drogra nézve megnövekedett, legkisebb mértékben a vinblasztin esetében. A két hő- és drogrezisztens sejtvonal közül általában a klón $2(10x80)T1_{c1000}$ sejt magasabb relatív rezisztencia értékeket mutatott, mint a klón $2(10x80)_{c1000}$.

Összevetve a hőérzékeny szülőttől származó klón 2_{c1000} sejt relatív rezisztencia értékeit a hő- és drogrezisztens sejtekével, az egyes drogok esetén eltérő tendenciákat tapasztaltunk. Míg a doxorubicinnel szembeni rezisztencia közel azonos lett a három sejtvonalban, addig a vinblasztinnal szembeni rezisztencia magasabb értéket ért el a klón 2_{c1000} sejtben, mint a hő- és drogrezisztens sejtekben, ugyanis a hőrezisztensek vinblasztin rezisztenciája a drogszelekciót követően alig növekedett. A puromycinnel és a colchicinnel szemben a klón 2_{c1000} és a klón $2(10x80)T1_{c1000}$ közel azonos értéket mutatott, míg a klón $2(10x80)_{c1000}$ sejt rezisztencia értékei jóval alacsonyabbak voltak, mint a két másik sejtvonalé. Az actinomycin D esetében pedig a klón 2_{c1000} és a klón $2(10x80)_{c1000}$ sejt rezisztencia értékei álltak inkább közel egymáshoz.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy sikerült colchicin rezisztens sejtvonalakat előállítanunk, amelyek egyben multidrog rezisztensekké is váltak. A sejtvonalak keresztrezisztencia mintázata eltért egymástól.

5.4.3 Sejtmorfológia és májspecifikus funkciók

A drogrezisztens sejtvonalak morfológiájukat tekintve a hőrezisztens sejtvonalakhoz hasonlóan, eltérnek a szülői klón 2 sejtől (17. ábra). Nagy, elnyúlt lapos sejtek, generációs idejük hasonló a szülőéhez.

Májspecifikus funkciók tekintetében dedifferenciáltak maradtak, nincs albumin szintézisük, nincs TAT enzim termelésük, illetve nagyon alacsony szintű.

5.4.4 45°C-os stresszválasz

Ahhoz, hogy válaszoljunk arra a kérdésre, hogy megváltozott-e a drogrezisztensek fehérje mintázata, illetve köthető-e valamely hő-sokk fehérje megnövekedett szintéziséhez a drogrezisztencia, megvizsgáltuk a drogrezisztens sejtek 45°C-os hőkezelést követő stresszválaszát. Ennek során egy drogrezisztens sejtvonalt, a klón 2_{c1000} és egy hő- és drogrezisztens sejtvonalt, a klón 2(10x80)T1_{c1000} stresszválaszát hasonlítottuk össze a szülőkével, illetve egymással 45°C-os 15 perces hőkezelést követően. A sejtek fehérje mintázatát ³⁵S-metionin jelölést követően 1 dimenziós gélelektroforézis segítségével tettük láthatóvá (18. ábra).

A colchicinre szelektált sejtvonalak hasonló hő-sokk fehérje mintázatot mutattak, mint a szülői sejtvonalak. Nem találtunk növekedést a konstitutív hő-sokk fehérjék alapszintjében, az indukálható hő-sokk fehérjék indukciójának mértéke pedig néhány esetben alatta maradt a szülői sejtvonalba látható szintnek, illetve nem haladta meg azt. Tehát úgy tűnik, hogy sejtvonalaiban a drogrezisztencia nem kapcsolódik a hő-sokk fehérjék szintézisének megváltozásához.

5.4.5 A drogrezisztens sejtvonalt nem vált hőrezisztenssé

A csak drogrezisztenciával rendelkező klón 2_{c1000} sejtvonalt megvizsgáltuk a kolóniaképző képességét különböző idejű 45°C-os hőkezeléseket követően és megállapítottuk, hogy a drogrezisztens sejtvonalt ugyanolyan hőérzékeny maradt, mint a klón 2 sejt. Ez a megállapítás az előzőekkel együtt bizonyítja, hogy sejtjeinkben a drogrezisztencia a hőrezisztencia kialakulásától függetlenül is képes kialakulni.

5.4.6 A P-glikoprotein szintje megemelkedett a drogrezisztensekben

A multidrog rezisztencia kialakulása gyakran köthető a P-glikoprotein (P-gp) szint megnövekedéséhez. Western-blot analízis segítségével megvizsgáltuk sejtjeink P-gp szintézisét. A 4077 jelű poliklonális ellenanyag, amelyet a humán mdr1 fehérje N-terminális vége ellen izoláltak, specifikusan felismeri a P-gp-t sejtjeinkben. Az ellenanyag segítségével ki tudtuk mutatni, hogy míg a klón 2 sejtben nem, addig a hőrezisztensekben kis mennyiségben szintetizálódott a

5.4. DROGREZISZTENS SEJTVONALAK IZOLÁLÁSA ÉS JELLEMZÉSE³⁴

P-gp [VPH94]. Az összes drogrezisztens sejtben pedig jelentősen megnövekedett a P-glikoprotein mennyisége (19. ábra), és a fehérje mennyisége korrelált a mRNS szinttel [PHVss].

Ezen eredmények alapján feltételezhetjük egyrészt, hogy a hőrezisztenseknél a mérsékelt szintű multidrog rezisztencia a sejtekben viszonylag kis mennyiségben szintetizálódott P-glikoproteinnek köszönhető. Másrészt a drogrezisztens sejtekben a nagy mennyiségű P-gp megnövekedett drogrezisztenciát váltott ki.

6. Az eredmények összefoglalása

Munkánk során sikerült hőrezisztens sejtvonalat izolálnunk eltérő fenotípusú patkány hepatóma sejtvonalakból. A hőrezisztens variánsok közül a legrezisztensebbnek a klón 2 sejtvonalból előállított sejtvonalak bizonyultak.

Ezekről a hőrezisztens sejtvonalakról elmondható, hogy stabil hőrezisztenciával rendelkeznek, morfológiailag eltérnek a szülőtől. Specifikus májfunctiók nem, vagy csak csekély mértékben tértek vissza, tehát az izolálási eljárás nem változtatta meg a sejtek differenciációs állapotát.

A hőrezisztensek fehérjemintázata eltért a szülőétől, a konstitutív hsp110, 90 és 70 alapszint megnövekedett bennük. A hővel indukálható hsp68 a 42°C-os hőkezelést követően gyengébben indukálódott a hőrezisztensekben, mint a szülőben. Erős, 45°C-os hőkezelést követően a hsp68 indukció jelentősen megnövekedett a hőrezisztensekben, sőt a hsp68 indukciós deficienciája, amely a szülői sejtvonatra jellemző, részben, illetve teljesen meg is szűnt a rezisztensekben.

A hőrezisztens sejtvonalakban feltehetőleg az így megnövekedett fehérje alap- és indukciós szintek játszanak közre más fehérjék (luciferáz) hő-sokkal szembeni védelmében.

Megvizsgálva a sejtvonalak mRNS szintézisét, megállapítottuk, hogy a hsp68 mRNS szint a klón 2(10x80) sejtvonala esetében a 42°C-os hőkezelést követően jóval magasabb szintet ért el, mint a szülőben, a fehérje szinttel ellentétben, amely a hőrezisztensekben csökkentebb indukciót mutatott, mint a szülőben. Ez a tény arra utal, hogy a fehérje szintézise transzlációs kontroll alatt állt.

A 45°C-os hőkezelés után vizsgálva a hsp68 mRNS szint korrelációt mutatott a fehérje szinttel. A konstitutív hő-sokk fehérjék esetében is a mRNS szint és a fehérje szint arányban állt egymással, mind 42°C-os, mind pedig 45°C-os hőkezelést követően.

A fehérjeszintézis vizsgálatokor kapott eredmények sugallják azt a feltételezést, hogy a hsp68 fehérjének szerepe lehet a hőrezisztens sejtvonalakban a magas hőmérséklet károsító hatásának kivédésében, de feltételezhetően a hőrezisztencia kialakításában több hő-sokk fehérje megnövekedett alapszintje, illetve megemelkedett indukciós szintje is közrejátszik. Laborunkban a legújabb vizsgálatok kimutatták, hogy a hőrezisztensekben megjelent a kis molekulású hő-sokk fehérjék családjába tartozó hsp27, amely a hőérzékeny klón 2 sejtben nem mutatható ki. További vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy csak a hsp27 fehérje elégséges-e a hőrezisztencia kialakításához, vagy ahogyan eddig feltételeztük, egyetlen hő-sokk fehérje szintjének megváltozása nem váltja ki a hőrezisztenciát sejtvonalainkban.

A hőrezisztens variánsok mérsékelt szintű drogrezisztenciát mutattak több, a gyógyászatban használatos szerrel szemben. Ez a hőrezisztenciával párhuzamosan kialakult multidrog rezisztencia fokozható volt lépcsőzetesen növelt koncentrációjú colchicin szelekcióval. Az ily módon előállított drogrezisztens sejtvonalak fehérje mintázata és hő-sokk válasza nem tért el a szülői sejtvonalakétól. Tehát a drogrezisztencia növekedése nem volt köthető megemelkedett hő-sokk fehérje szinthez. A hőérzékeny szülőből izolált drogrezisztens sejtvonala a szülőhöz hasonlóan hőérzékeny maradt, vagyis a drogrezisztencia kialakulása sejtvonalainkban nem járt együtt a hőrezisztencia megjelenésével.

A hőrezisztens sejtvonalakban P-glikoprotein jelenlétét tudtuk kimutatni. A drogrezisztens sejtvonalakban jelentősen megnövekedett ennek a fehérjének a szintje.

Mind a hőrezisztens sejtvonalak, mind pedig a colchicinre szelektált sejtvonalak multidrog rezisztensekké váltak, a sejtvonalak rezisztencia mintázata eltért egymástól.

A sejtvonalak drogokkal szembeni eltérő érzékenysége magyarázható a P-glikoproteinben bekövetkező egyetlen aminosav szubsztitúciójával [CCKR88, GDCT91], amelynek következtében a mutáns P-glikoprotein a különböző drogokkal szemben eltérően viselkedik, megváltozik a relatív rezisztencia mintázat.

Sejtvonalainkban a P-glikoprotein aktív pumpaként működött, mivel a rezisztensekben jelentősen lecsökkent a sejten belüli doxorubicin koncentráció és a P-glikoprotein okozta multidrog rezisztencia fenotípus verapamillal visszafordítható volt. Végsősoron megállapíthatjuk, hogy drogrezisztens sejtvonalainkban a P-glikoprotein szintjének nagy mértékű megnövekedése okozta a drogrezisztenciát.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom az MTA SZBK Genetikai Intézet korábbi igazgatójának, Dr. Alföldi Lajosnak és az intézet jelenlegi igazgatójának, Dr. Raskó Istvánnak, akik mindig támogatták pályázataimat és lehetővé tették, hogy a Genetikai Intézetben végezhessem munkámat.

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Venetianer Anikónak a munkám során nyújtott segítségért, sok hasznos tanácsért és a munkalehetőségek megteremtéséért.

Pirity Melindának a kísérletekben nyújtott szíves segítségéért tartozom köszönettel.

Köszönöm Bálint Aranka, Lévai Tilda és Ugrainé Szathmári Margit asszisztensek kiváló és lelkiismeretes segítségét, valamint köszönöm Truth Ferencné pontos és odaadó munkáját.

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

Irodalom

- [AB79] M.M. Ashburner and J.J. Bonner. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell*, 17:241–254., 1979.
- [ATH88] R.L. Anderson, T. Tao, and G.M. Hahn. Membrane lipids of B16 melanoma cells and heat-resistant variants. *Int. J. Radiat. Biol.*, 54:813–823., 1988.
- [AvKKH89] R.L. Anderson, 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.
- [BHV91] M. Baranyi, A. Hever-Szabo, and A. Venetianer. Heat-shock response of rat hepatoma variant cells. *Eur. J. Biochem.*, 200:707–713., 1991.
- [BTS*86] G. Batist, 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.
- [CBG*92] S.P.C. Cole, 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.
- [CCKR88] K. Choi, 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.

- [CL88] P. Chrétien 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.
- [CMR79] J.M. Chirgwing, A.E. Przybyla and R.J. MacDonald, and W.J. Rutter. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18:5294-5299., 1979.
- [CTD*90] K. Chin, 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.
- [DH84] W.C. Dewey and E.V. Holahan. Hyperthermia-basic biology. *Prog. Exp. Tumor Res.*, 28:198-219., 1984.
- [Dia66] T.I. Diamondstone. Assay of tyrosine transaminase activity by conversion of p-hydrophenil pyruvate to p-hydroxybenz- aldehyde. *Anal. Biochem.*, 16:395-401., 1966.
- [DW74] J. Deschatrette and M.C. Weiss. Characterization of differentiated and dedifferentiated clones from a rat hepatoma. *Biochimie*, 56:1603-1611., 1974.
- [dWWD*87] J.R. de Wet, K.V. Wood, M. deLuca, D.R. Helinski, and S. Subramani. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, 7:725-737., 1987.
- [EL89] J.A. Endicott and V. Ling. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.*, 58:137-171., 1989.
- [Ell93] R.J. Ellis. The general concept of molecular chaperones. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser B.*, 339:257-262., 1993.
- [EvdV91] R.J. Ellis and S.M. van der Vies. Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.*, 60:321-347., 1991.
- [FAH86] G.A. Fisher, R.L. Anderson, and G.M. Hahn. Glucocorticoid-induced heat resistance in mammalian cells. *J. Cell. Physiol.*, 128:127-132., 1986.

- [FH86] M.K. Foehning and H. Hofstetter. Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. *Gene*, 45:101-105., 1986.
- [FMP*85] P. Fort, L. Marty, M. Piechaczyk, S.E. Sabrouy, C. Dai, P. Jean-teur, 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.
- [FV83] A.P. Freinberg and B. Vogelstein. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132:6-23., 1983.
- [GB93] P. Gros and E. Buschman. The mouse multidrug resistance gene family: structural and functional analysis. *Int. Rev. Cytology*, 137:169-197., 1993.
- [GDCT91] P. Gros, R. Dhir, J. Croop, and F. Talbot. A single amino acid substitution strongly modulates the activity and substrate specificity of the mouse *mdr1* and *mdr3* drug efflux pumps. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:7289-7293., 1991.
- [GEJ*86] J.H. Gerlach, 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.
- [GP93] M.M. Gottesman and I. Pastan. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.*, 62:385-427., 1993.
- [GS92] M.J. Gething and J.J. Sambrook. Protein folding in the cell. *Nature*, 355:33-45., 1992.
- [HBS*86] E. Hickey, 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.

- [HM85] C.R. Hunt 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.
- [HRL*91] J. Huot, G. Roy, H. Lambert, P. Chrétien, and J. Landry. Increased survival after treatments with anticancer agents of chinese hamster cells expressing the human Mr 27,000 heat shock protein. *Cancer Research*, 51:5245-5252., 1991.
- [HvK88] G.M. Hahn and I. van Kersen. Isolation and initial characterization of thermoresistant RIF tumor cell strains. *Cancer Res.*, 48:1803-1807., 1988.
- [IITG94] T. Iwaki, A. Iwaki, J. Tateishi, and J.E. Goldman. Sense and antisense modification of glial α B-crystallin production results in alterations of stress fiber formation and thermoresistance. *J. Cell Biol.*, 125:1385-93., 1994.
- [KSL87] R.E. Kingston, T.J. Schuetz, and Z. Larin. Heat-inducible human factor that binds to a human hsp70 promoter. *Moll. Cell. Biol.*, 7:1530-1534., 1987.
- [Lae70] U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685., 1970.
- [LCL*89] J. Landry, P. Chrétien, H. Lambert, E. Hickey, and L.A. Weber. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J. Cell. Biol.*, 109:7-15., 1989.
- [LHC*92] Y.J. Lee, Z. Hou, L. Curetty, E. P. Armour, A. Al-Saadi, J. Bernstein, and P.M. Corry. Heat-resistant variants of the chinese hamster ovary cell: alteration of cellular structure and expression of vimentin. *J. Cell Physiol.*, 151:138-146., 1992.
- [LHK*91] Y.J. Lee, Z. Hou, D. Kim, A. Al-Saadi, and P.M. Corry. Inhibition of protein synthesis and heat protection: histidinol-resistant mutant cell lines. *J. Cell. Physiol.*, 149:396-402., 1991.
- [Li85] G.C. Li. 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.
- [Lin86] S. Lindquist. The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem.*, 55:1151-1191., 1986.
- [LRFR51] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. Protein measurement with the FOLIN phenol-reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275., 1951.
- [Lás92] A. László. The thermoresistant state: protection from initial damage or better repair? *Exp. Cell Res.*, 202:519-531., 1992.
- [MFMM91] P.F. Morgan, R.L. Fine, P. Montgomery, and P.J. Marangos. Multidrug resistance in MCF-7 human breast cancer cells is associated with increased expression of nucleoside transporters and altered uptake of adenosine. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 29:127-132., 1991.
- [MTG90] R. I. Morimoto, A. Tissieres, and C. Georgopoulos. *Stress Proteins in Biology and Medicine*. Cold Spring Laboratory Press, 1990.
- [MTM88] D.D. Mosser, N.G. Theodorakis, and R.I. Morimoto. Coordinate changes in heat shock element binding activity and hsp70 gene transcription rates in human cells. *Mol. Cell. Biol.*, 8:4736-4744., 1988.
- [MY92] Y. Miyata and I. Yahara. The 90-kDa heat shock protein, HSP90, binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity. *J. Biol. Chem.*, 267:7042-7047., 1992.
- [NDW93] K. Nadeau, A. Das, and C.T. Walsh. Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases. *J. Biol. Chem.*, 268:1479-1487., 1993.
- [NMB88] V.T. Nguyen, M. Morange, and O. Bensaude. Firefly luciferase luminescence assays using scintillation in transfected mammalian cells. *Anal. Biochem.*, 171:404-408., 1988.
- [OFa75] P. H. O'Farrell. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250:4007-21., 1975.

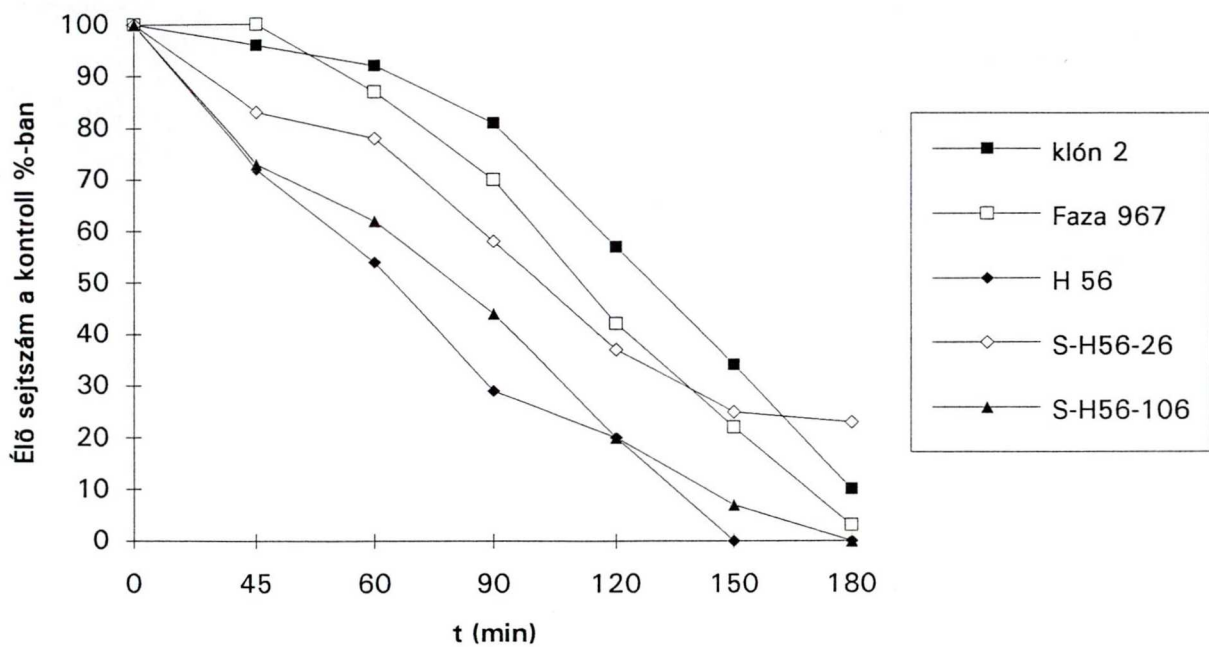
- [OMBK85] K. O'Malley, A. Mauron, J.D. Barchas, and L. Kedes. Constitutively expressed rat mRNA encoding a 70-kilodalton heat-shock-like protein. *Mol. Cell. Biol.*, 5:3476-3483., 1985.
- [Pel82] H. Pelham. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp70 heat-shock gene. *Cell*, 30:959-961., 1982.
- [PHS92] W.B. Pratt, K.A. Hutchison, and L.C. Scherrer. Steroid receptor folding by heat-shock proteins and composition of the receptor heterocomplex. *Trends Exp. Med.*, 3:326-333., 1992.
- [PHVss] M. Pirity, A. Hever-Szabo, and A. Venetianer. Overexpression of P-glycoprotein in heat- and/or drug resistant hepatoma variants. *Cytotechnology*, in press.
- [PL93] D.A. Parsell 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.
- [PL94] D.A. Parsell and S. Lindquist. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor Press, New York, 1994.
- [PND*92] M. Pirity, 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.
- [PPMP64] H.C. Pitot, C. Perains, P.A. Morse, and V.R. Potter. Hepatomas in tissue culture compared with adapting liver in vivo. *Natn. Cancer Inst. Monogr.*, 13:229-242., 1964.
- [RAH*84] I.B. Roninson, H.T. Abelson, D.E. Housman, N. Howell, and Varshavsky. *Nature*, 309:626-628., 1984.
- [Reu61] M.D. Reuber. A transplantable bile-secreting hepatocellular carcinoma in the rat. *J. Natn. Cancer Inst.*, 26:891-899., 1961.
- [Ron91] I.B. Roninson. *Molecular and Cellular Biology of Multidrug Resistance in Tumor Cells*. New York: Plenum, 1991.



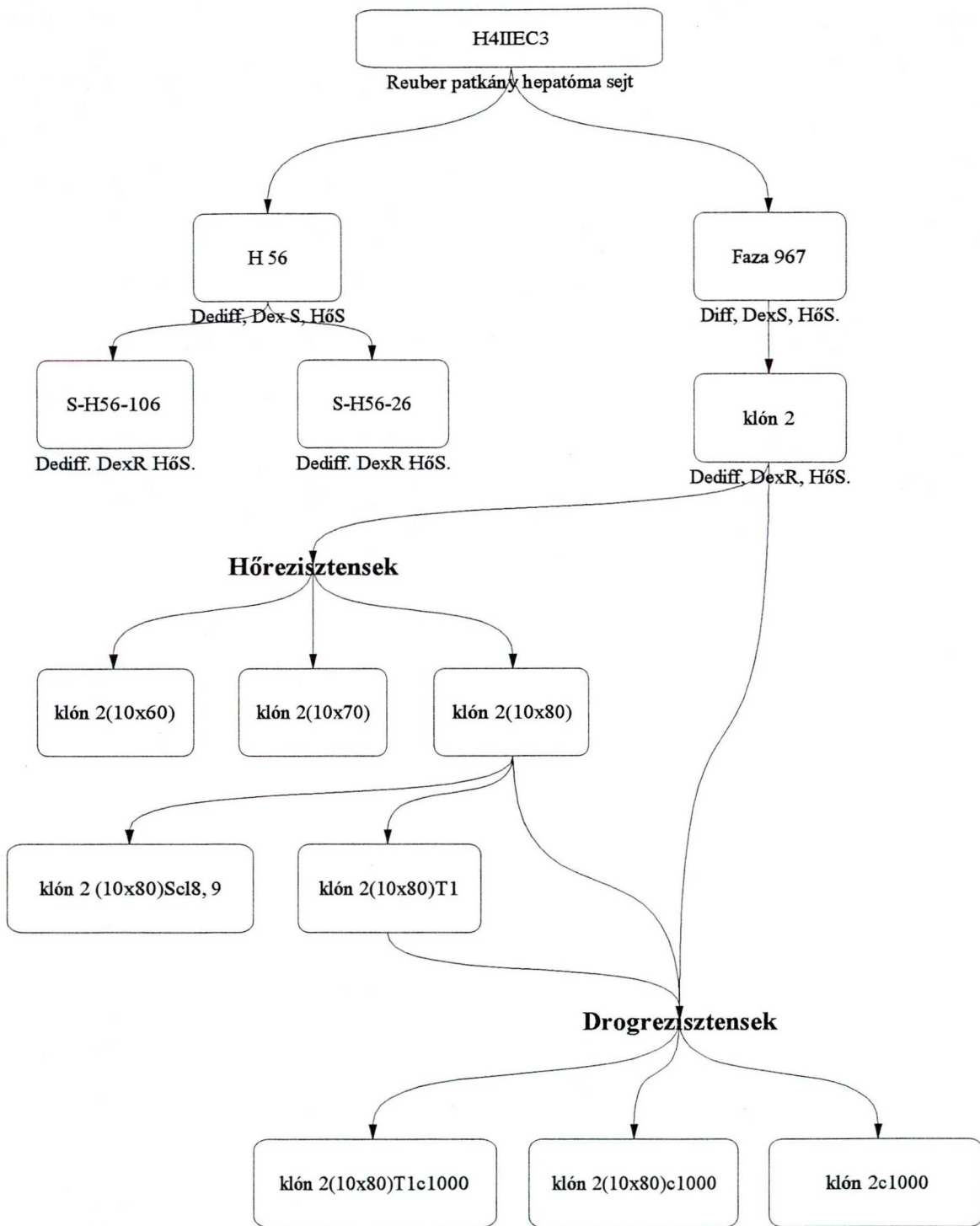
- [RWKH89] D.W. Rose, W.J. Welch, G. Kramer, and B. Hardesty. Possible involvement of the 90-kda heat shock protein in the regulation of protein synthesis. *J. Biol. Chem.*, 264:6239–6244., 1989.
- [SSS*82] G. Scherer, W. Schmid, C.M. Strange, W. Rowekamp, and G. Schutz. Isolation of cDNA clones coding for rat tyrosine aminotransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79:7205–7208., 1982.
- [SWG88] D.B. Straus, W.A. Walter, and C.A. Gross. Escherichia coli heat shock gene mutants are defective in proteolysis. *Genes. Dev.*, 2:1851–1858., 1988.
- [SZR*93] H.R. Saibil, D. Zheng, A.M. Roseman, A.S. Hunter, and G.M.E. Watson. ATP induces large quaternary rearrangements in a cage-like chaperonin structure. *Curr. Biol.*, 3:265–273., 1993.
- [TNSV87] I. Tratner, 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.
- [TNW*91] J.D. Tren, E. Nimmesgern, J.S. Wall, F.U. Hartl, and A.L. Horwich. A molecular chaperone from a thermophilic archaeobacterium is related to the eukaryotic protein t- complex polypeptide-1. *Nature*, 354:490–493., 1991.
- [TWMF82] G.P. Thomas, W.J. Welch, M.B. Mathews, and J.R. Feramisco. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 46:985–996., 1982.
- [VB83] A. Venetianer and Zs. Bösze. Expression of differentiated functions in dexamethasone-resistant hepatoma cells. *Differentiation*, 25:70–78., 1983.
- [VD90] A. Venetianer and D. David. Regulation of liver gene expression in dexamethasone resistant hepatoma cells. in: activation of hormone and growth factor receptors. 173–193., 1990.
- [VDSF83] A. Venetianer, T. Magin D.L. Schiller, and W.W. Franke. Cessation of cytokeratin expression in a rat hepatoma cell line lacking differentiated functions. *Nature*, 305:730–733., 1983.

- [VPG80] A. Venetianer, Z. Pintér, and A. Gál. Examination of glucocorticoid sensitivity and receptor content of hepatoma cell lines. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 28:280-83., 1980.
- [VPH94] A. Venetianer, M. Purity, and A. Hever-Szabo. The function of heat-shock proteins in stress tolerance. *Cell Biol. Int.*, 18:605-615., 1994.
- [Wu84] C. Wu. Activating protein factor binds in vitro to upstream control sequences in heat-shock gene chromatin. *Nature*, 311:81-84., 1984.
- [WWD*87] J.R. De Wet, 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.
- [YIK86] I. Yahara, 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.
- [YRBP87] J.C. Yalowich, D. Roberts, S. Benton, and E. Parganas. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 28:277., 1987.
- [ZWH88] Z.F. Zakeri, 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.

8. Ábrák



1.ábra. Különböző fenotípusú hepatóma sejtek túlélése 45°C-os hőkezelést követően. Azonos számú sejtet Petri-csészékben különböző idejű (45', 60', 90', 120', 150', 180') 45°C-os hőkezelésnek tettünk ki. A sejtek viabilitását a hőkezelést követően Tripán kék festési eljárással teszteltük. A szórás kisebb, mint 10%.



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

Diff. - differenciált sejtvonalt

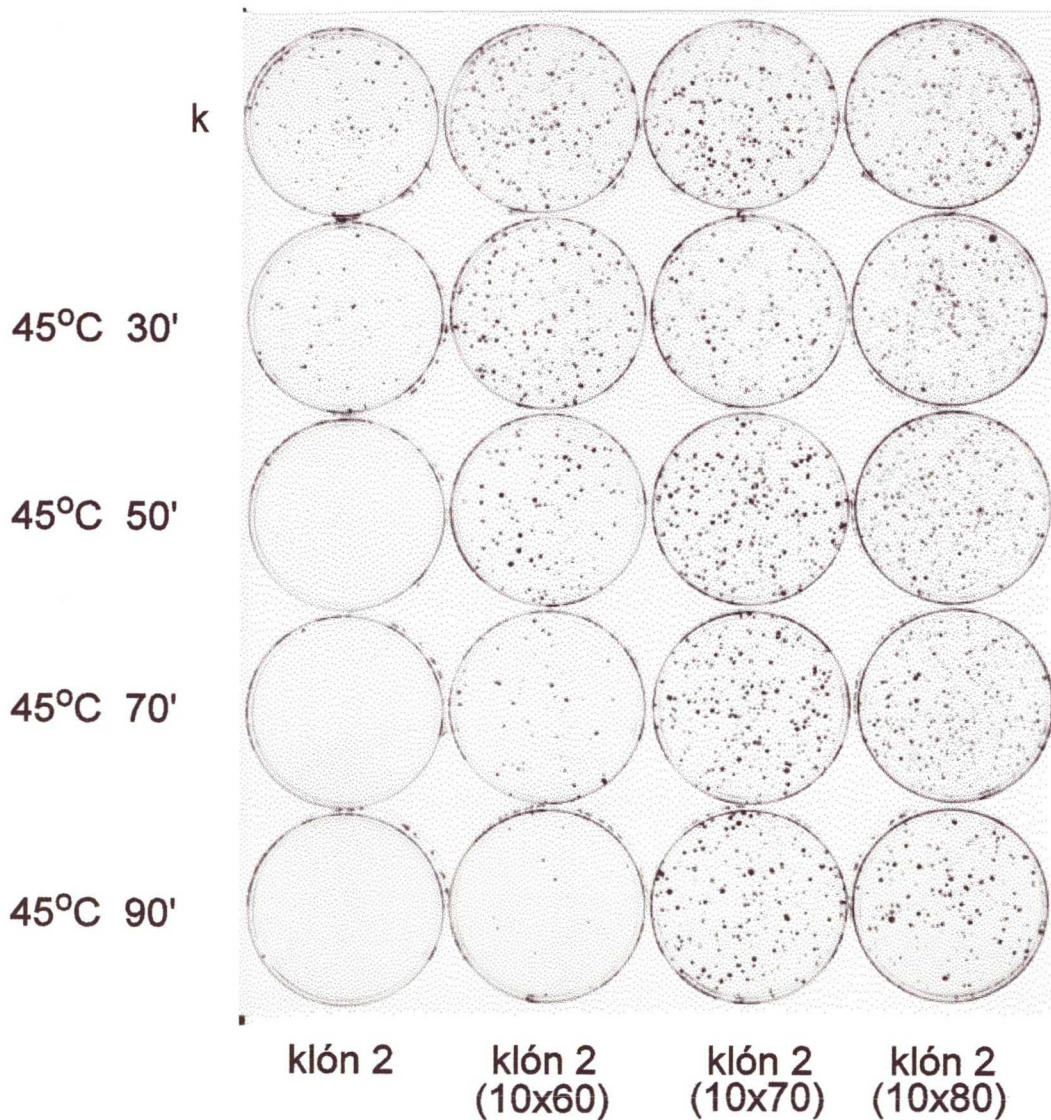
Dediff. - dedifferenciált sejtvonalt

DexS - dexametazon érzékeny sejtvonalt

DexR - dexametazon rezisztens sejtvonalt

H6S - hőérzékeny sejtvonalt

H6R - hőrezisztens sejtvonalt



3. ábra. A kolóniaképzés vizsgálata 45°C-os hőkezelést követően a klón 2 sejtnél 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.

	kontroll	30' 45°C		50' 45°C		70' 45°C		90' 45°C	
	tsz	tsz	tm	tsz	tm	tsz	tm	tsz	tm
klön 2	100%	58%	tkR	4%	kR	0%	S	0%	S
klön 2(10x60)	100%	73%	R	47%	R	18%	tkR	4%	tkR
klön 2(10x70)	100%	89%	R	78%	R	71%	R	58%	R
klön 2(10x80)	100%	87%	R	82%	R	69%	R	35%	R

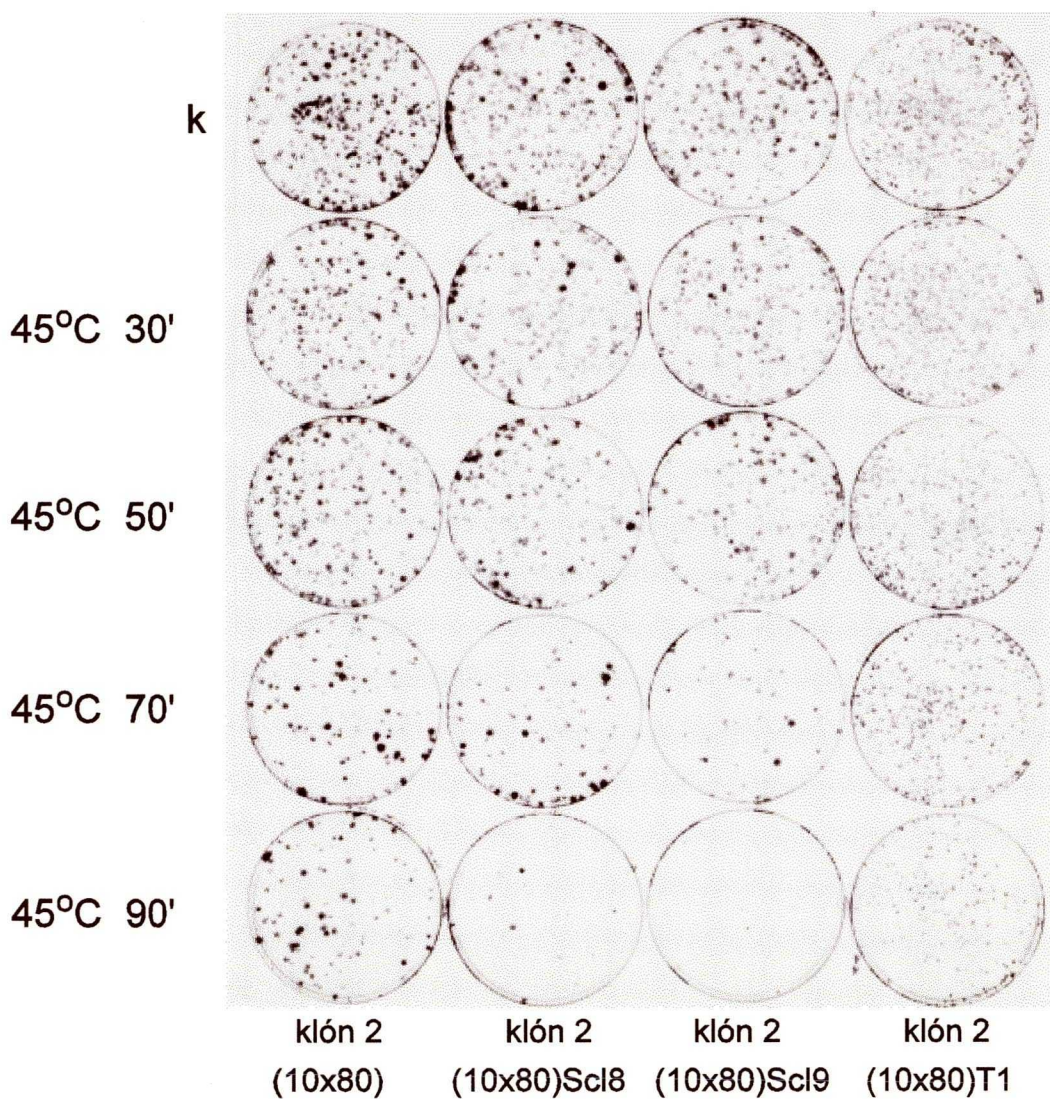
3.1. táblázat. A 3. ábra adatai táblázatosan összefoglalva. Az egyes Petri-csészéken található telepek számát a kontroll százalékában (tsz) tüntettük fel, illetve a telep méreteket (tm) jellemeztük a hőérzékenység szempontjából.

R- rezisztens, a telepek méretei hasonlóak a kontrolléhoz

tkR- többé-kevésbé rezisztens, a telepek kissé kisebbek, mint a kontroll sejtnél

kR- közepesen rezisztens, a telepek még kisebbek, mint az előző kategóriában

S- szenitív, egész kicsi, túszerű telepek



4.ábra. 45°C-os hőkezelés hatása a kolóniaképző képességre a hőrezisztens klón 2(10x80) sejtvonalnál és szubklónjainál. Hasonlóan az előző kísérlethez, a hő-sokkot követően 2 hét elteltével fixáltuk és festettük a sejteket.

	kontroll	30' 45°C		50' 45°C		70' 45°C		90' 45°C	
	tsz	tsz	tm	tsz	tm	tsz	tm	tsz	tm
klön 2(10x80)	100%	77%	R	71%	R	43%	tkR	20%	kR
klön 2(10x80)ScI8	100%	93%	R	75%	R	37%	tkR	5%	tkR
klön 2(10x80)ScI9	100%	98%	R	58%	R	21%	kR	3%	S
klön 2(10x80)T1	100%	89%	tkR	86%	tkR	64%	tkR	37%	tkR

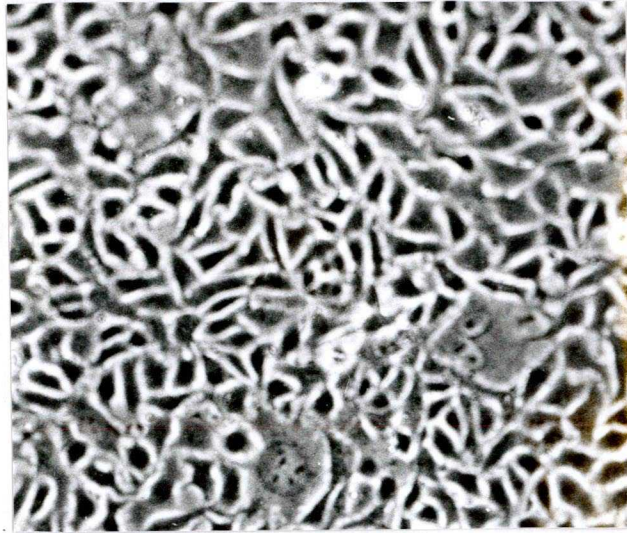
4.1. táblázat. A 4. ábra adatai táblázatosan. Tsz - telepszám a kontroll százalékában. Tm - telepméret

R - rezisztens

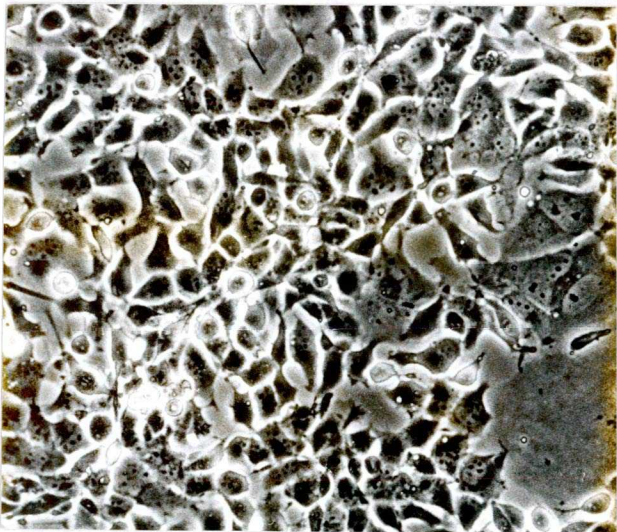
tkR - többé-kevésbé rezisztens

kR - közepesen rezisztens

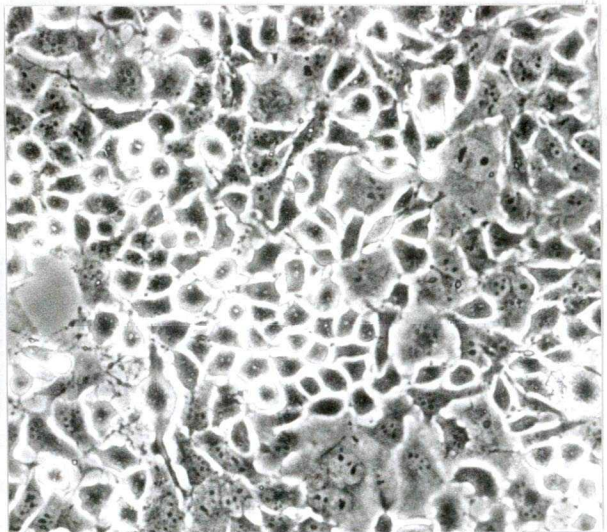
S - szenzitív



klón 2

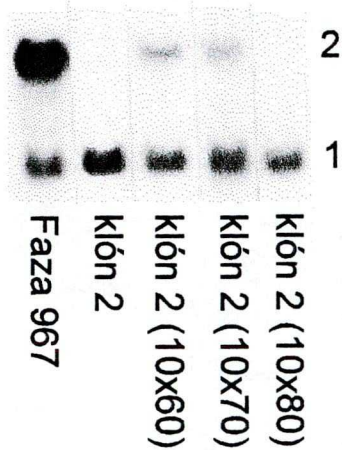


klón 2(10x80)



klón 2(10x80)T1

5. ábra. A klón 2 patkány hepatóma sejt és hõrezisztens variánsai, a klón 2(10x80) és klón 2(10x80)T1.



6. ábra. Tirozin aminotranszferáz (TAT) enzim mRNA alapszintje a különböző hepatóma sejtekben.

Össz-RNS preparálást követően Northern-blot analízis segítségével vizsgáltuk a sejtvonalak TAT mRNA alapszintjét.

1. Gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz mRNA
2. TAT mRNA

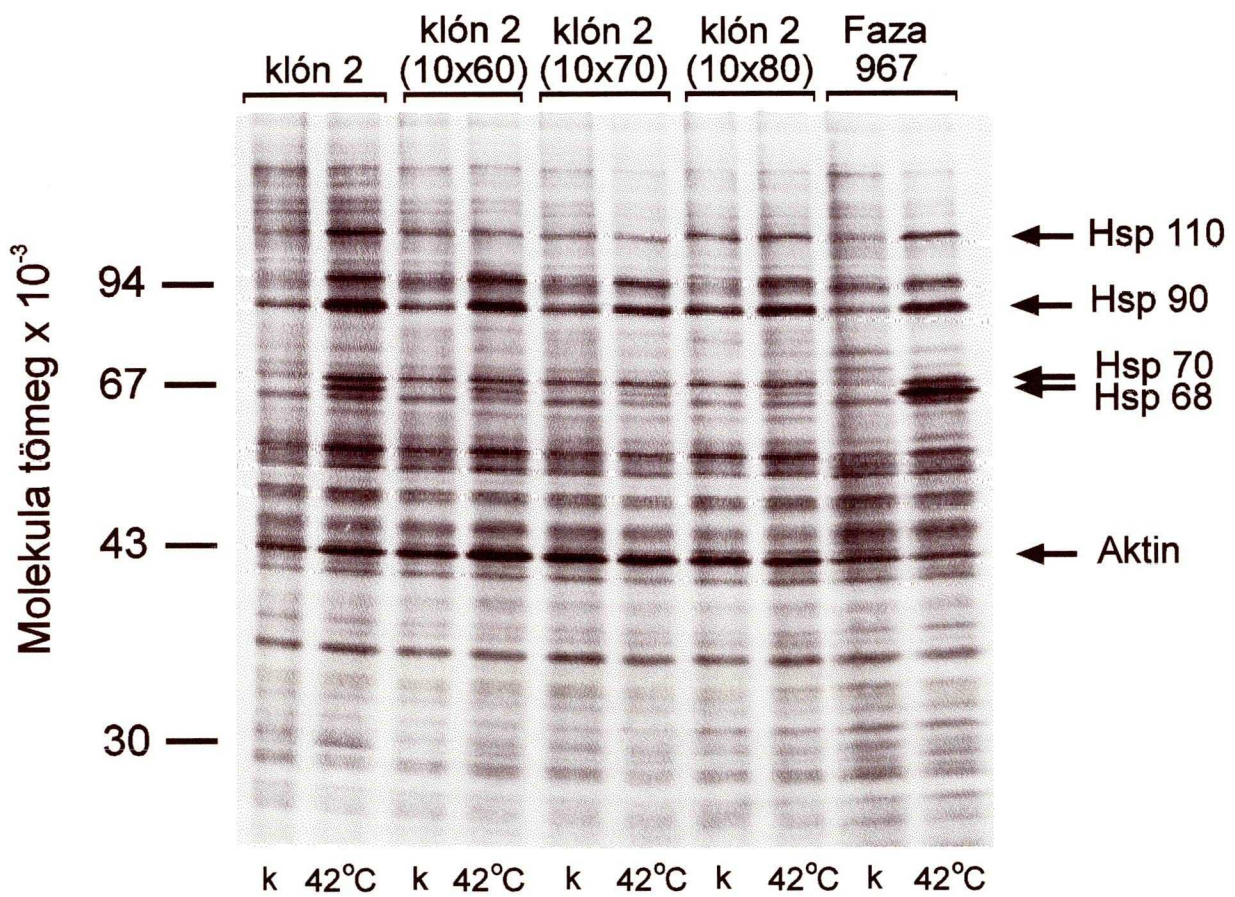
		ESA (mU/mg protein)
Faza 967	k	41.4
	ind.	415.7
klón 2	k	nem mérhető
	ind.	nem mérhető
klón 2(10x60)	k	4
	ind.	7.6
klón 2(10x70)	k	3.6
	ind.	10
klón 2(10x80)	k	nem mérhető
	ind.	nem mérhető
klón 2(10x80)T1	k	nem mérhető
	ind.	nem mérhető

6.1. táblázat. TAT enzim aktivitás mérésének adatai

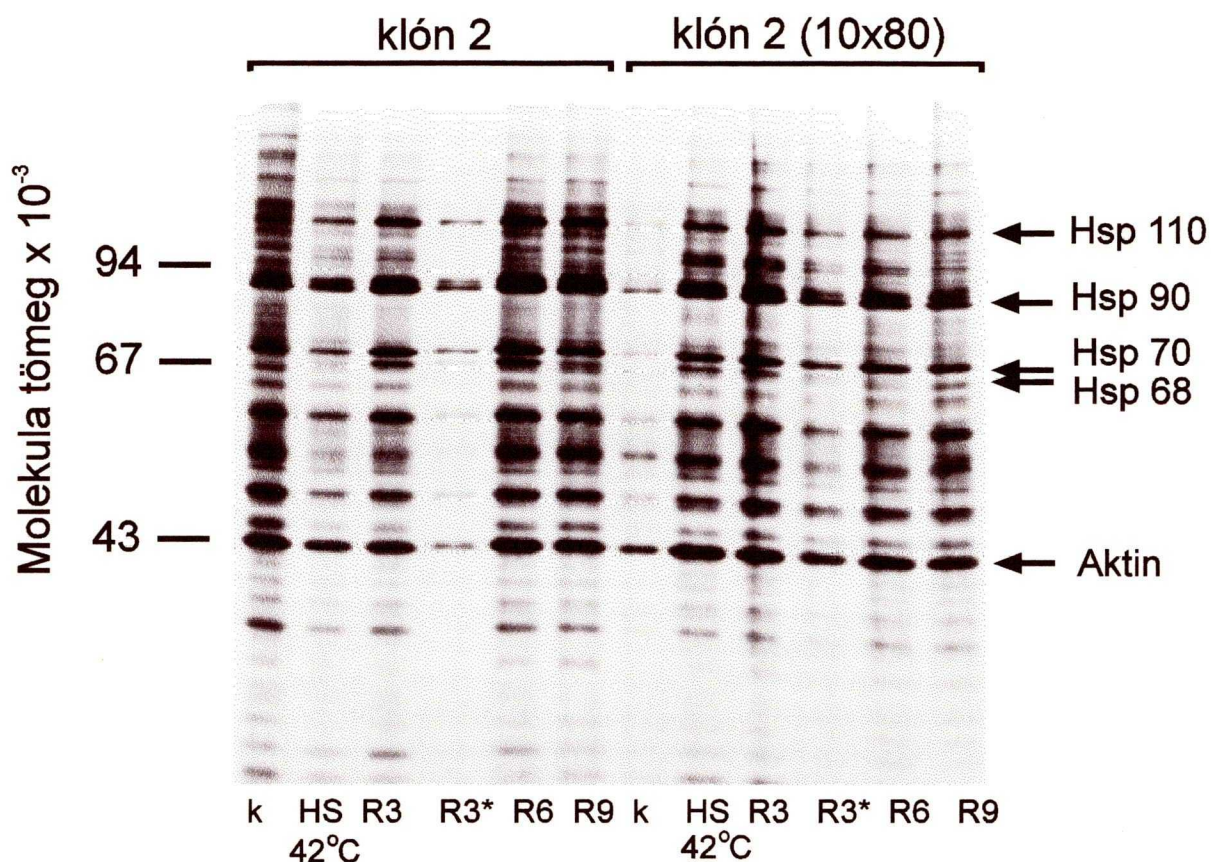
ESA - Enzim specifikus aktivitás

k - kontroll

ind - 10^{-6} M 18 órás dexametazon indukció



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



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

A fehérjék jelöléséhez ³⁵S-metionint adtunk 3 órás pulzusokban a hő-sokk és a felgyógyulás ideje alatt.

k - kontroll minta

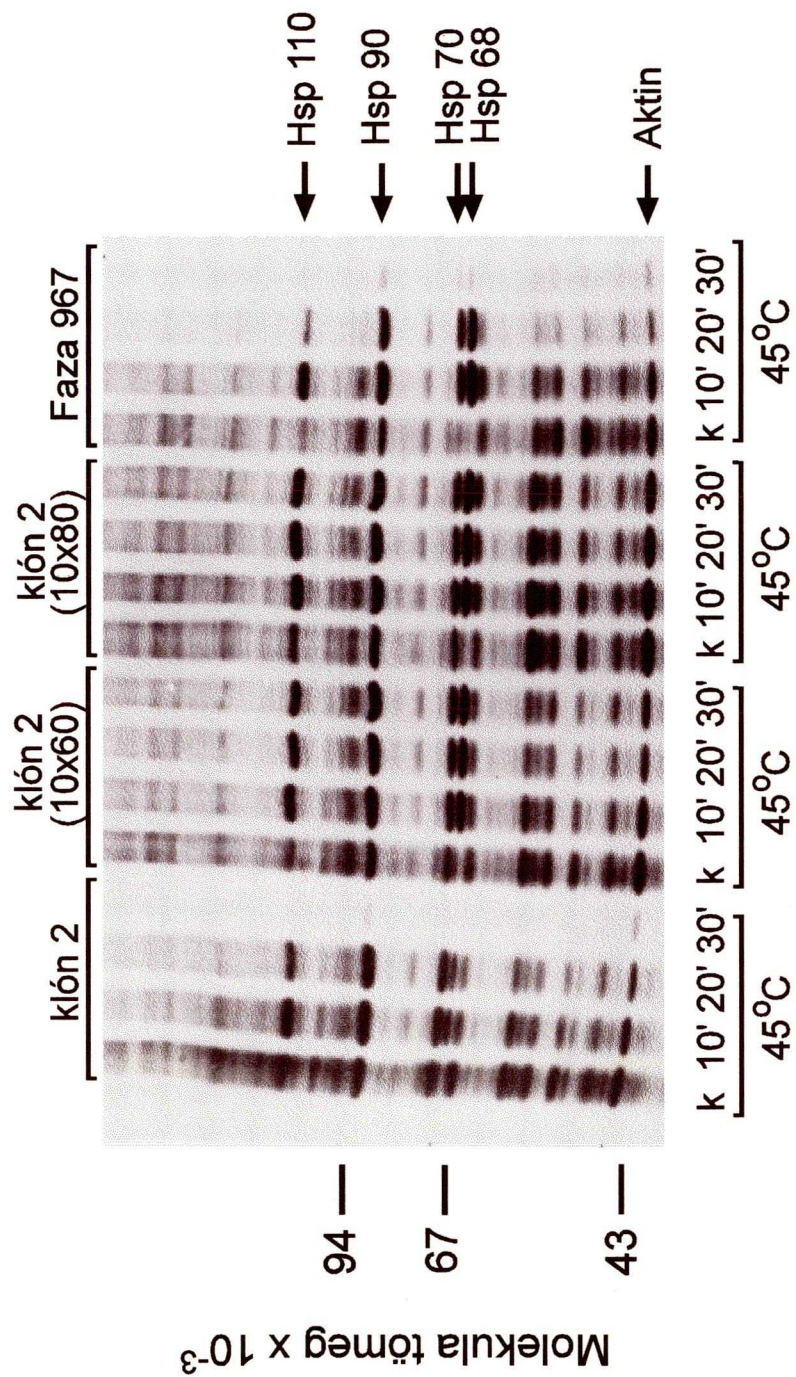
HS 42°C - A hő-sokk ideje alatt jelölt minta

R3 - A felgyógyulás első 3 órájában jelölt minta

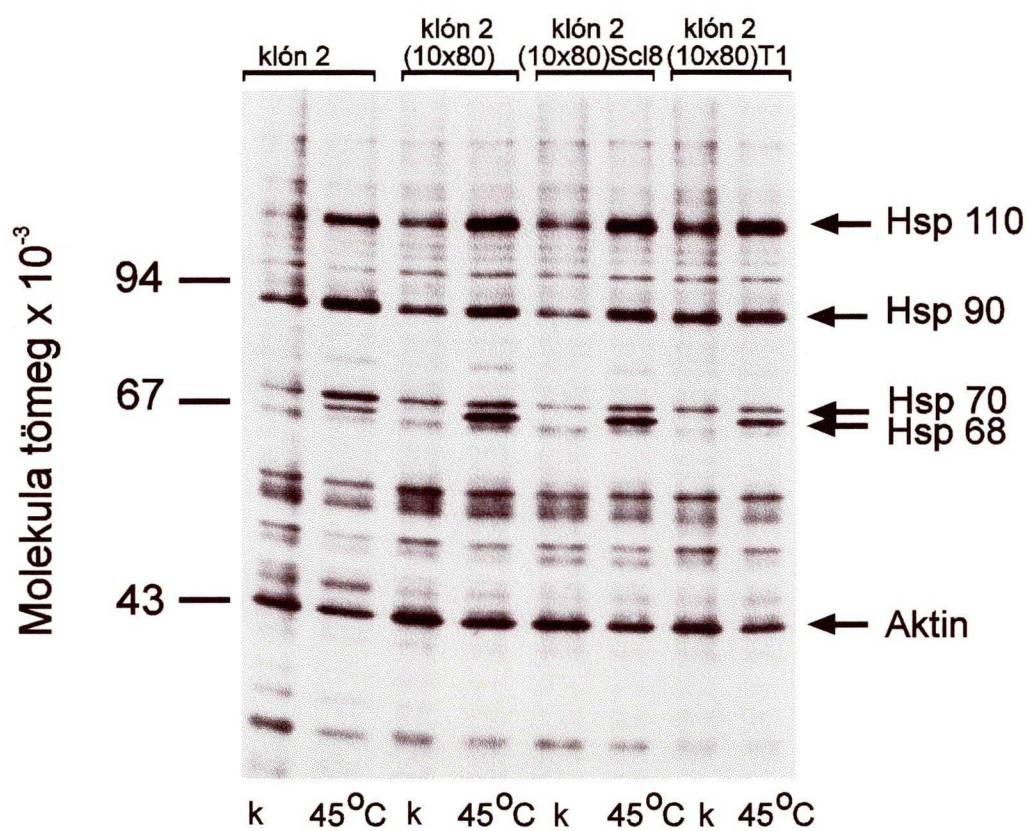
R3* - A felgyógyulás 2.5-3. órájáig jelölt minta

R6 - A felgyógyulás 3-6. órájáig jelölt minta

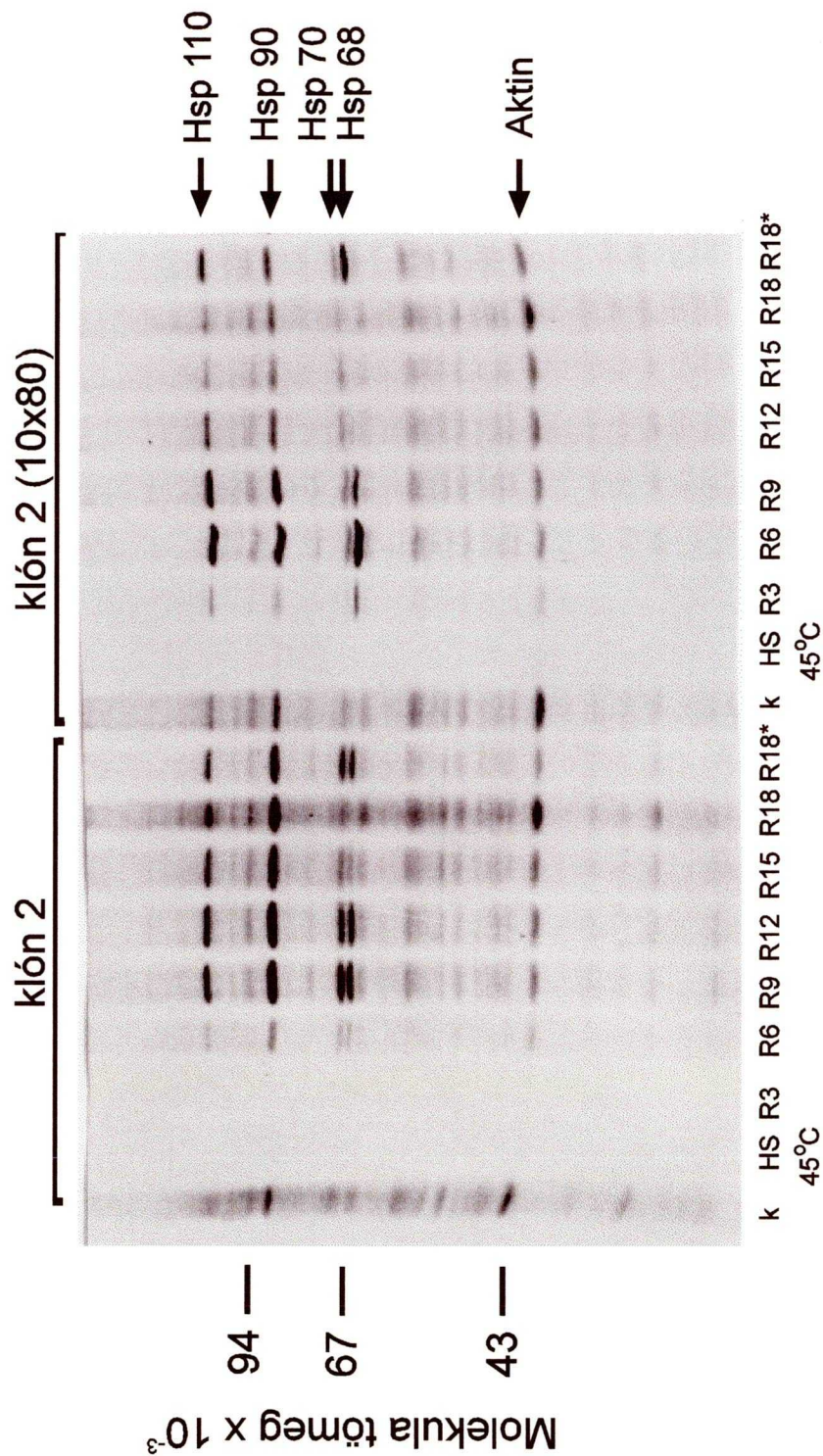
R9 - A felgyógyulás 6-9. órájáig jelölt minta



9. 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'-



10. ábra. 45°C-os 15' hőkezelés hatása a hepatóma sejtek fehérje szintézisére. A radioaktív jelölést a hő-sokkot követően 18 órán keresztül alkalmaztuk.
 k - kontroll minták
 45°C - 15' 45°C hőkezelt minták



11. 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,

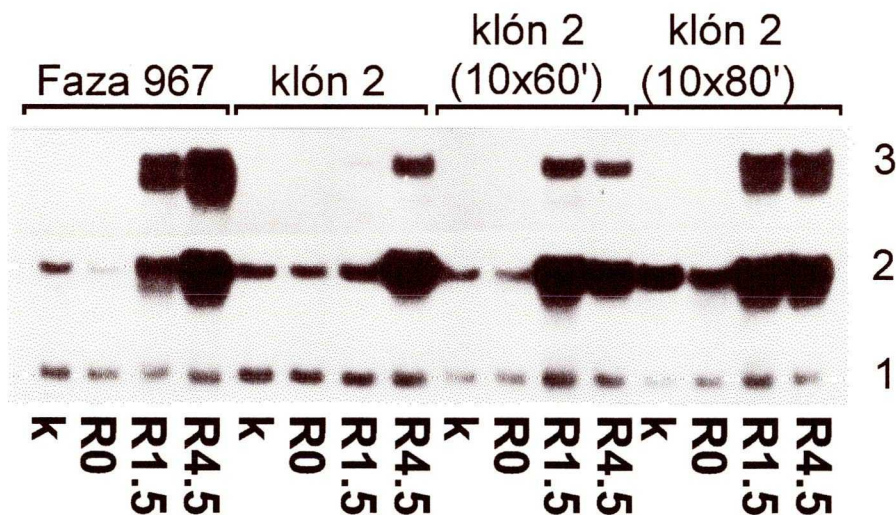
R18 - A hőkezelést követő 15-18. óra közötti időszakban,

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



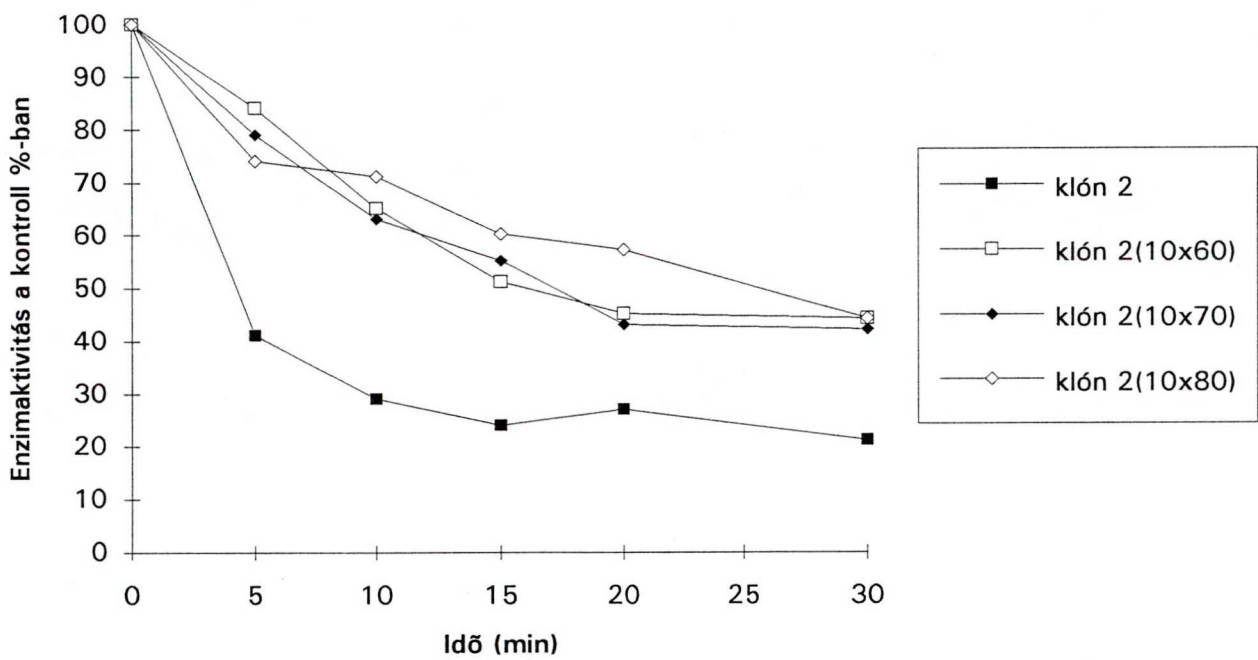
12/a. ábra. A hepatóma sejtek mRNS szintézisének vizsgálata 42°C-os 3 órás hő-sokk kezelést követően. Northern-blot analízis segítségével választottuk szét az RNS mintákat, majd radioaktívan jelölt cDNS próbákkal hibridizáltuk őket.

- | | |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 1. Gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz mRNS | k - kontroll minta |
| 2. Hsp68 mRNS | R0 - A hő-sokk után közvetlenül preparált minta |
| 3. Hsp90 mRNS | R3 - A hő-sokk után 3 órával készült minta. |

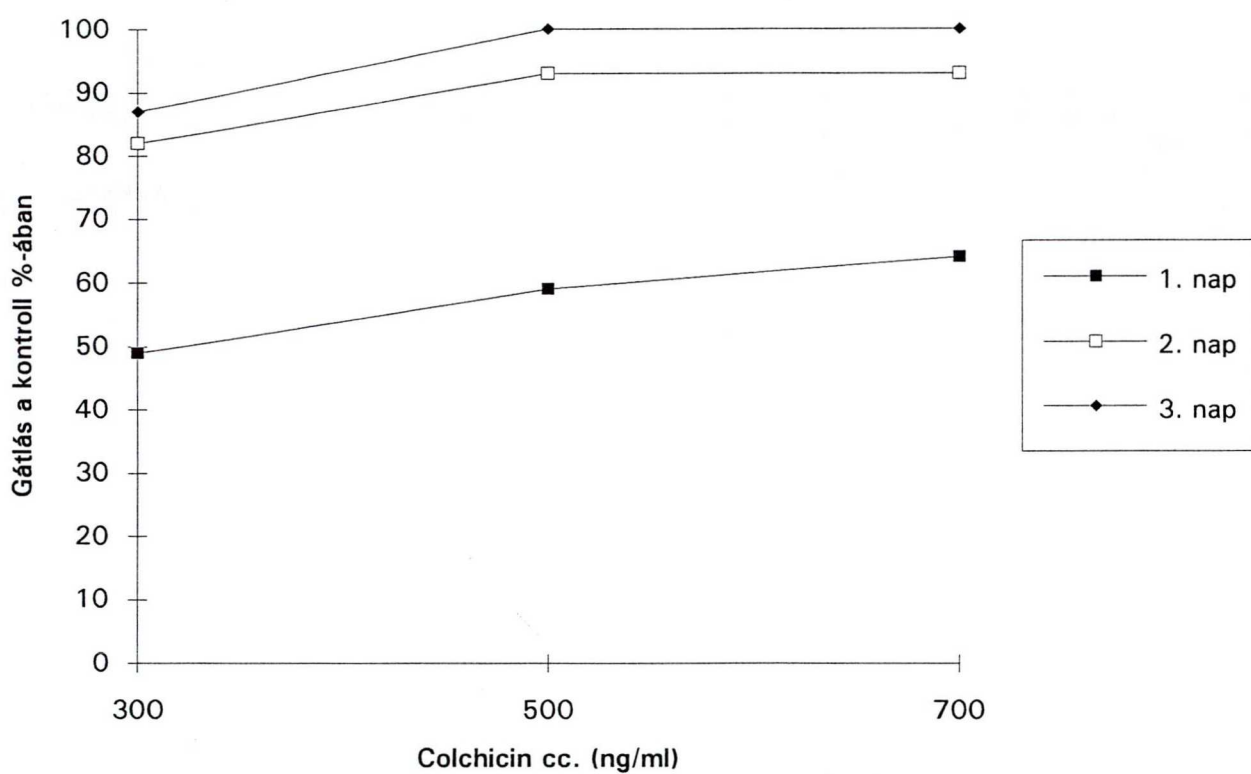


12/b. ábra. Hepatóma sejtek stressz válaszáának vizsgálata mRNS szinten 45°C-os 15 perces hőkezelést követően. Az ábrán Northern-blot analízis eredménye látható a specifikus DNS próbákkal való hibridizálás után.

- | |
|----------------------------------------------------|
| 1. Gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz mRNS |
| 2. Hsp90 mRNS |
| 3. Hsp68 mRNS |
| 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. |



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



14. ábra. A klón 2 sejtet colchicin különböző koncentrációival kezeltük 1, 2 és 3 napig. A túlélő sejtek számát Tripán késsel határoztuk meg. A gátlás értékét a kontroll százalékában adtuk meg. Látható, hogy ennél a kísérletnél már az általunk választott legalacsonyabb koncentráció (300ug/ml) is több, mint 50%-os gátlást váltott ki.

	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

15/a. táblázat. A klón 2 sejt és hõrezisztens variánsainak LD50 értékei.
A szórás kisebb mint 10 %.

	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

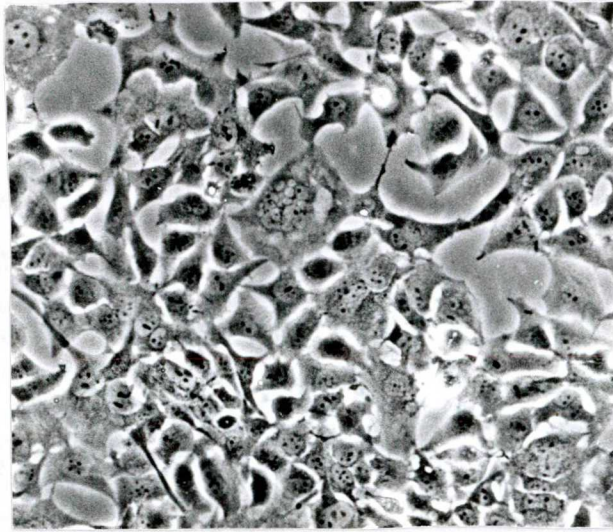
15/b. táblázat. Relatív rezisztencia értékek.

	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

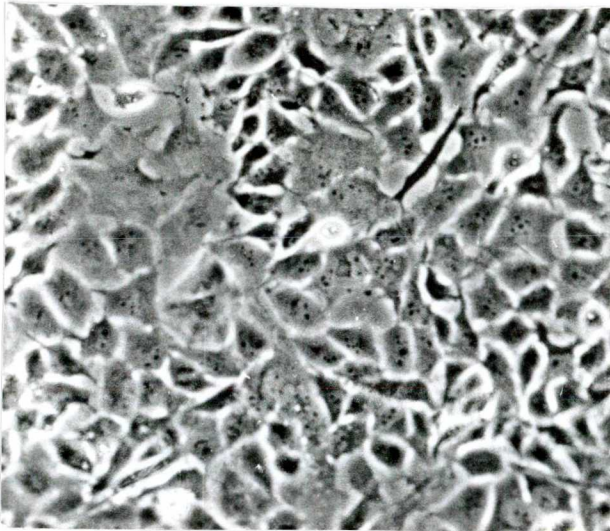
16/1. táblázat. A klón 2 és a drogrezisztens sejtvonalak LD50 értékei
A szórás kisebb mint 10 %.

	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

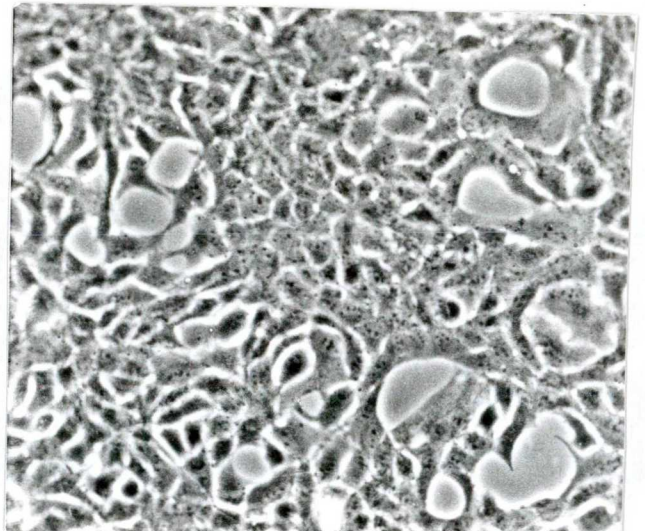
16/2. táblázat. Relatív rezisztencia értékek



Klón 2c₁₀₀₀

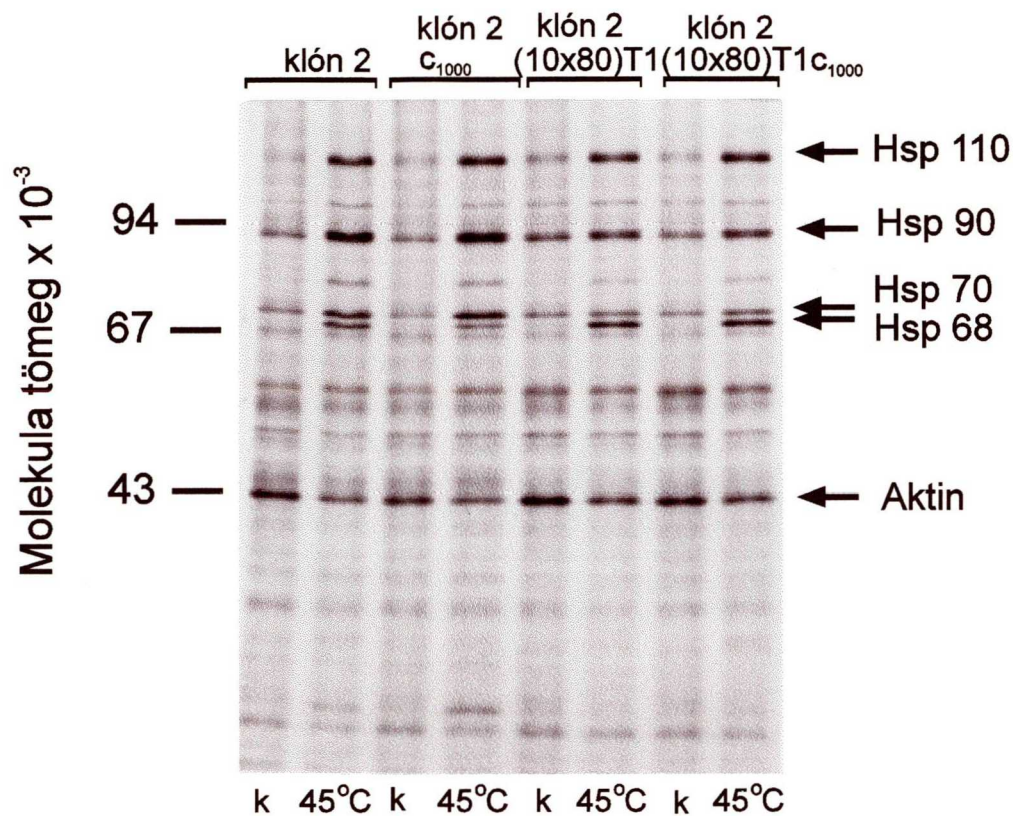


Klón 2(10x80)c₁₀₀₀

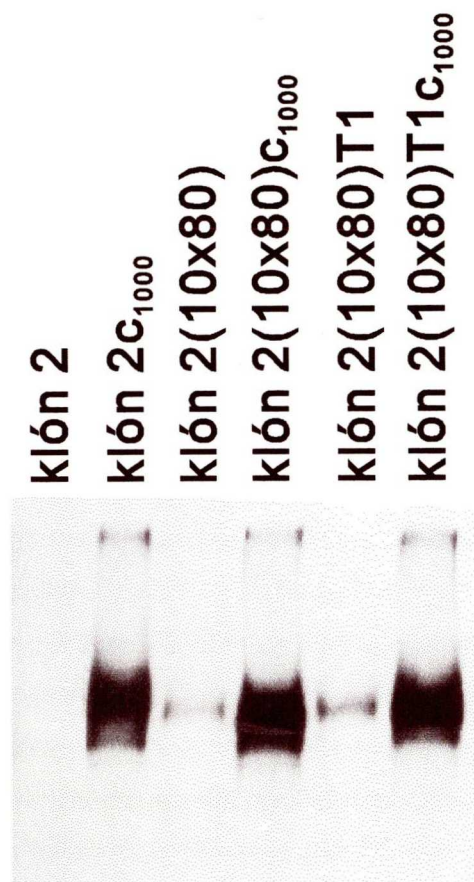


Klón 2(10x80)T1c₁₀₀₀

17. ábra. Colchicin rezisztens sejtvonalak 25x nagyítás.



18. ábra. Hepatóma sejtek fehérjeszintézise 45°C-os 15 perces hőkezelést követően. A sejteket a hőstressz után 18 órán keresztül ³⁵S-metioninnal jelöltük, a fehérjemintákat 1 dimenziós gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk.



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