B 5510

TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGEK, ÖSSZEFOGLALÓ TÉZISEK

Készítette:

Szelei József

MTA SZEGEDI BIOLÓGIAI KÖZPONT, BIOKÉMIAI INTÉZET

1997

SZEGED

TARTALOMJEGYZÉK

TÉZIS I. NAGY DNS TARTALMÚ LIPOSZÓMÁK KIFEJLESZTÉSE EUKARIÓTA SEJTEK HATÉKONY TRANSZFORMÁCIÓJÁRA 1
I. 1. BEVEZETÉS 1
I. 2. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK 5
I. 2. 1. Liposzómák készítése 5
I. 2. 2. Rekombináns DNS technológiák 6
I. 2. 3. Szövetkultúra, transzfekció 7
I. 3. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK 8
I. 3. 1. Szelekciós marker gént tartalmazó lambda fág klónozása 8
I. 3. 2. Nagy molekulatömegû DNS hatékony bezárása liposzómába 9
I. 3. 3. Emlôs sejtek hatékony transzfekciója LUV-ba zárt fággal 10
TÉZIS II. A LIPOSZÓMÁBA ZÁRT FÁGOK TOVÁBBI FELHASZNÁLÁSAI 13
II. 1. BEVEZETÉS 13
II. 2. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK 15
II. 2. 1. Rekombináns plazmidok és fágok készítése 15
II. 2. 2. DNS bejuttatása liposzómákkal a megtermékenyített hal petékbe 16
II. 2. 3. A neomicin-foszfotranszferáz aktivitásának mérése 17
II. 3. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK 19
II. 3. 1. Új, hatékony módszer kidolgozása az APTII enzim aktivitásának mérésére 19
II. 3. 2. A LUV-fág, LUV-plazmid liposzómás rendszer vizsgálata szövettenyésztett sejtekkel 20
II. 3. 3. Centromer képzôdés egér sejtekben, emberi DNS-sel és domináns marker génnel való együttes transzfekció után 23
II. 3. 4. Liposzómán alapuló génbevitel hal embriókba 25

TÉZIS III. ANDROGÉN ÉS ÖSZTROGÉN ÉRZÉKENY SEJTEK TANULMÁNYOZÁSA A TRANSZFEKCIÓ ÉS A KIVONÁSOS HIBRIDIZÁCIÓ MÓDSZEREIVEL 28
III. 1. BEVEZETÉS 28
III. 2. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK 31
III. 2. 1. Molekuláris biológiai módszerek 31
III. 2. 2. Szövettenyésztés, sejtekkel való kísérletek 33
III. 3. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK 35
III. 3. 1. A sejtosztódás és a transzkripció közötti összefüggés vizsgálata 35
III. 3. 2. Androgén és ösztrogén által indukált génekből származó szekvenciák izolálása 37
III. 3. 3. Az androgén receptor szerepe az androgén által indukált sejtosztódás gátlásában 39
ÖSSZEFOGLALÓ 42
A TÉZISEKHEZ FELHASZNÁLT SZAKIRODALOM 44
A TÉZISEKHEZ FELHASZNÁLT SAJÁT PUBLIKÁCIÓK 50
MELLÉKLET: SAJÁT PUBLIKÁCIÓK KÜLÖN LENYOMATAI 52

TÉZIS I. NAGY DNS TARTALMÚ LIPOSZÓMÁK KIFEJLESZTÉSE EUKARIÓTA SEJTEK HATÉKONY TRANSZFORMÁCIÓJÁRA

I. 1. BEVEZETÉS

A rekombináns DNS technológiával megváltoztatott DNS eukarióta sejtbe juttatása a molekuláris biológia egyik fontos eszközévé vált az utóbbi két évtized során. Ez tette lehetõvé a génexpresszió szabályozásának vizsgálatát és számos eukarióta gén funkciójának azonosítását. Napjainkban, amikor a génterápia limitált alkalmazása lehetõvé vált, az egyik legfontosabb akadály amivel meg kell birkózni, a DNS bevitel hatékonyságának és irányíthatóságának (célzott bevitel) megnövelése. Ugyanilyen fontos a hatékonyság növelése, a mezõgazdaságilag hasznos növények és állatok létre hozására.

1984-ben, amikor Dr. Duda Ernõ csoportjában elkezdtem dolgozni az egyetemi doktori tézisemen, ezen problémák már néhány éve megfogalmazódtak a szakirodalomban. A csoport korábbi tagjai tettek néhány sikeres lépést a létezõ módszerek meghonosítására és új módszerek kifejlesztésére a genetikai transzformáció (transzfekció) területén (1,2).

Akkoriban a legáltalánosabban használt transzfekciós módszer a kálcium-foszfát-DNS koprecipitáció (3,4) volt. Ezen technika elõnye, hogy viszonylag egyszerûen kivitelezhetõ és olcsó. A hátrányai közé tartozik, hogy jelentõs a variáció az egyes sejttípusok esetén a transzfekció hatékonyságát illetõen. Sok sejtvonalra egyáltalán nem alkalmazható, mert mérgezõ hatásának elkerülésére alkalmazott technikai módosítások esetén a hatékonyság szinte a nullára csökken. *In vivo* gén bevitelre nem használható. Sikeres génbevitel esetén, az általában képzõdõ konkatamerek miatt, a

kópiaszám változó, ami átrendezõdésre, inaktivációra (pl. metilációk) vezethet a bevinni kívánt génben amellett, hogy a domináns szelekciós marker gén müködõképes marad.

A mikroinjektálásos módszer nagy hatásfokú, de drága mûszerezettséget és a transzfektáló személy speciális ügyességét kívánja meg. Nagy mennyiségû sejt esetében nem nagyon használatos.

A DEAE-dextan módszer csak átmeneti expresszió kifejeztetésére alkalmas, egyes fogékony sejtvonalak esetén, mert a gazda sejt kromoszómális DNS-ébe csak nagyon ritkán történik beépülés.

A retro- és adenovirális módszerek nagyon hatékonyak, azonban a biztonsági megfontolások miatt speciális laboratóriumokat igényelnek és *in vivo* csak megfelelõ eljárások követése útján használhatók. Mindez költségessé teszi még most is a használatukat, nem is beszélve arról, hogy a megfelelõen biztonságos virális vektorok kidolgozása az 1980-as években még csak a kezdetén volt.

Napjainkban az elektroporáció a virális módszerek után a leghatékonyabb technika, de erre csak próbálkozások történtek az 1980-as évek elején. Hasonlóan más transzfekciós technikákhoz, különbözõ sejtvonalakban más és más a hatásfoka; *in vivo* nem használható.

Az a felfedezés, hogy a liposzómák (5) képesek képzõdésük során a vizes fázisban oldódó anyagok bezárására, s azokat a sejtmembránnal kölcsönhatva a sejtekbe bejuttatni, vetette fel a lehetõségét annak, hogy transzfekciós rendszerként használják fel õket. A liposzómák géntranszferhez való felhasználásánál elõnyösnek tûnt viszonylag egyszerû preparálásuk, az, hogy hosszú ideig tárolhatók stabilan, kevéssé toxikusak és védik a bezárt nukleinsavat a nukleázok degradáló hatásától. Mivel bizonyos paramétereik (pl.: nagyság/átmérõ, felületi töltés és a lipid kettõsréteg fluiditása) változtatható, különbözõ feltételek között alkalmazhatók. Az elképzelés az volt, hogy glikolipideket a membránjukba építve és lektineket felhasználva

növelhetõ lesz a sejtekhez való kötõdésük, a felszínükre ellenanyagot kötve pedig specifikus sejteket lehet velük megcélozni.

Mindezen biztató elõzmények ellenére, az 1984-86-ig kifejlesztett liposzómás géntranszfer módszerek, a modellként használt szövetkultúrás sejtekkel, kisebb transzfekciós frekvenciát értek el, mint a hagyományosan használt technikák. Ugyanakkor léteztek olyan kísérletek, amelyek igazolták azt az elvárást, hogy a más módszerekkel alig transzfektálható sejtvonalak liposzómás mechanizmussal megfelelõen transzfektálhatók (szuszpenzióban növõ sejtvonalakba való génbevitel (6), vagy a növényi sejtek transzfekciója liposzómával (7) volt az egyik legjobban mûködõ technika). Az alacsony transzfekciós hatásfok fõ okai valószínûleg a következõk voltak: a/ a liposzómába való DNS bezárás alcsony foka, b/ a liposzómába zárt DNS sokszor sérült állapotú, c/ a sejtbe juttatott liposzómák nagy része a lizoszómákban köt ki és így tartalmuk (ha nem jut ki a lizoszómákból) degradálódik.

Mindezeket figyelembe véve az egyetemi doktori dolgozat fõ célkitûzései a következõek voltak a liposzómás transzfekciós technika hatékonyságának növelése céljából:

1/ Új módszer kidolgozása a DNS liposzómába zárására, amelynek segítségével:

a/ a liposzómák túlnyomó többsége tartalmazni fog DNS-t,

b/ a nagy molekulatömegû DNS-nek is jelentõs százaléka lesz intakt állapotban beépíthetõ a liposzómákban.

2/ Megnövelni a liposzómákba zárt DNS védettséget a liposzómák sejten belüli kinyílása esetére.

3/ Megvizsgálni, hogy a nagyobb bezárási hatékonyság és a nagyobb védettség eredményez-e transzfekciós frekvencia növekedést és ez hogyan viszonyul a legáltalánosabban használt transzfekciós rendszerhez, a kálcium-foszfát-DNS koprecipitációs módszerhez.

SZEGED

Kiinduló elképzelésünk az volt, hogy a DNS liposzómába záródását a DNS térbeli szerkezetének megváltoztatásával (tömörebbé tételével) és a DNS töltéseinek leárnyékolásával (foszfátidil-szerin alapú liposzómák miatt) érhetjük el. Ilyen kompakt szerkezettel (a természetben) pl. a kromoszómák és a vírusok rendelkeznek. Ezért modellként, elõször a könnyen kezelhetõ l fágokat választottuk a liposzómás kisérleteink tárgyává.

I.2. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

I. 2. 1. Liposzómák készítése

Foszfátidil-szerint és a többi foszfolipidet marha agyból preparáltuk Folch (8) módszerével. Tisztaságukat kétdimenziós vékonyréteg kromatográfiával ellenõriztük, Dr. Horváth Ibolya (SZBK, Biokémiai Intézet) segítségével.

A nagy átmérõjû, egy lipid kettõsrétegû liposzómák (LUV) készítésénél Papahadjopoulos és munkatársai módszerét (9) követtük, módosítva az általunk bevezetett, l fágra alkalmazott bezárási technikával: a kloroformban oldott foszfolipidet vákuumban beszáriíottuk (Rotary evaporator), majd a kloroform maradékát N_2 gázzal eltávolítottuk. A lipidet felvettük (vortex néhány percig) NHT pufferben (150 mM NaCl, 2 mM L-His, 2 mM TES, pH=7.4), 10 mmol/ml-es végkoncentrációban. SUV-ot állítottunk elõ erõs ultrahang segítségével (Brandson típusú ultrahangozó, 5-15 °C közötti vízfürdõ, 5-20 perc). A megmaradt nagyméretû, több kettõsrétegû (MLV) vezikulumokat kicentrifugáltuk (Eppendorf centrifuga, 20 perc, hidegszoba). A felülúszóhoz CNHT puffert (0,1 M $CaCl_2$ NHT-ben) adtunk (10 mmol foszfolipidre 50-100 ml-t), és egy órán át inkubáltuk 37 °C-on, lezárt Eppendorf csõben. Az így képzõdõ fehér csapadékot Eppendorf centrifugában kiülepítettük (10 perc, hidegszoba), s a felülúszó eltávolítása után összekevertük 100 ml olyan pufferrel, amely tartalmazta a bezárni kívánt anyagot (DNS esetében NHTE: 0,4 mM EDTE NHT-ben; fág esetében MNHT: 5 mM $MgSO_4$ NHT-ben). Ezt követõen részletekben 500-1000 ml ENHT-t (0,2 M EDTA NHT-ben) adtunk hozzá úgy, hogy enyhén megkevertük és 37 °C-on inkubáltuk; az inkubálást a csapadék feltisztulása után 30 percig még folytattuk. A be nem zárt anyagokat a liposzómáktól differenciál centrifugálással választottuk el úgy, hogy a liposzómákat

meghígítottuk 20 ml NHTE-vel és steril centrifuga csövekben 38000 g-vel lecentrifugáltuk (30 perc, 5-15 °C). A mosást megismételtük és a liposzómákat legvégül 1 ml NHTE-ben vettük fel. Az ilyen módon készített liposzómák alacsony hõmérsékleten (5-10 °C-on) tárolva, egy hétig teljesen megõrizték aktivitásukat és egy hónapig biztosan használhatók maradtak a transzfekciós kísérletek céljára.

REV-et (fordított fázisú, nagy átmérõjû liposzómák) Szoka és munkatársai (10), valamint Straubinger és munkatársa (6) alapján preparáltuk.

I. 2. 2. Rekombináns DNS technológiák

Valamennyi rekombináns DNS-sel való mûveletet (plazmid DNS, fág DNS, intakt fág tisztítás, plazmiddal baktérium sejtbe való transzformáció, *in vitro* fág pakoló elegy készítése és a fág DNS pakolása, restrikciós endonukleáz enzimek használata, DNS fragmentumok ligálása, ^{32}P-ATP-vel való DNS jelölés) a Maniatis és munkatársai által megírt kézikönyv (11) alapján végeztük el. ^{125}I-dal a DNS-t Commerford (12), a fág fehérjéit Greenwood és munkatársai (13) alapján jelöltük meg. A liposzómába zárt DNS mennyiségének meghatározását izotópos jelölés esetén (^{32}P ill. ^{125}I) aliquotok aktivitásának mérésével végeztük el PPO-POPOP-toluol szcintillációs koktélban (1% Triton X-100-at használva és 1 napot várva a liposzómák degradációjához). Nem jelölt DNS esetén a mintákból aliquotokat vettünk és brómfenolkék tartalmú mintapufferben (2% SDS-sel kiegészítve) 10 percen át 68 °C-on inkubáltuk, majd 0,7% agaróz tartalmú gélen megfuttattuk õket. EtBr festés után összehasonlítottuk az UV-fluoreszcencia intenzitásokat az ismert koncentrációjú plazmid ill. fág DNS hígítási sorával, s így kaptuk meg a bezárt DNS mennyiséget.

I. 2. 3. Szövetkultúra, transzfekció

Humán eredetû HeLa sejteket és egérbõl származó LMTK- sejteket használtunk a transzfekciós kísérletek céljára. A Ca-foszfát precipitációval történõ emlõs sejt transzformációt Graham és van der Eb (3), valamint Wiegler és munkatársai (4) alapján végeztük el figyelembe véve az azóta bevezetett kisebb módosításokat, amivel a transzfekció hatásfokát és megbízhatóságát növelték.

A liposzómákkal való transzfekció esetén a Ca-foszfáthoz hasonlóan az elõzõ napon $5x10^5$ sejtet raktunk ki tripszínezéssel 6 cm-es lemezekre. A sejteket fiziológiás sóoldattal mostuk meg a liposzómákkal való transzformáció elõtt. A liposzómákat 0,9% NaCl-dal megfelelõ koncentrációra hígítva 300 ml végtérfogatban adtuk a sejtekhez, a petri csészére óvatosan rétegezve. 20-30 perces, 37 °C-os inkubálás után vagy 2 ml tápoldatot mértünk rájuk és ezeket 3,5 órán keresztül hagytuk állni a 37 °C-os termosztátban, majd glicerin sokkot alkalmaztunk, vagy azonnal sokkoltunk glicerinnel (25% glicerin 1,5-2,5 perc). Stabil transzformáció esetén a sejteket két nap múlva áttripszíneztük 10 cm-es petri csészékre és 400-500 mg/ml G418 (GIBCO) jelenlétében szelektáltunk (14) a neomicin gént tartalmazó klónokra. Ha nem alkalmaztunk glicerin sokkot, akkor mind a Ca-foszfát, mind a liposzómás transzformáció esetében a sejteket a transzformáló anyag hozzáadása után 3,5-4 órával PBS-sel mostuk és a tápoldattal inkubáltuk tovább.

I. 3. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

I. 3. 1. Szelekciós marker gént tartalmazó lambda fág klónozása

Ahhoz, hogy mérni tudjuk a liposzómába zárt lambda fág vektorok transzfekciós hatékonyságát szükséges volt kifejleszteni olyan lambda vektort, amely tartalmazott legalább egy domináns marker (a transzfektált emlõs sejtnek szelekciós elõnyt nyújtó) gént. Laboratóriumunkban a neomicin-foszfotranszferáz gént tartalmazó pAG60 plazmidot (15) használtuk, mint szelekciós markert a Ca-foszfát koprecipitációs kísérletek során. Ezért, hogy a két módszer közötti összehasonlítás azonos kritériumokon alapuljon, az *EcoRI* enzimmel részlegesen emésztett pAG60 plazmidot beklónoztuk a lgtWES-lB vektorfág (16) *EcoRI* enzimmel elhasított és tisztított karjai közé a középsõ nem esszenciális fragment helyére. Mivel a kívánatos rekombináns lambda fág (lgtWESneo) DNS szinten kis méretû (42174 bp), az *in vitro* bepakolás kedvezményezte a nagyobb méretû fragmentek beépülését. Ezen kombinációk közül kiválasztottuk a lgtWESneo-10 klónt (48480 bp), ahol az *EcoRI* részleges hasítás a nem kívánatos helyen (a neomicin-foszfotranszferáz enzimet meghajtó timidin-kináz (TK) promotert inaktíválta) történt meg, és a linearizált plazmid duplán épült be. A fág klónok funkcionális analízisét 358 baktériumon végeztük el, amely a lgtWES fágok számára lízist nem megengedõ supE gazda. Együtt inkubálva kis mennyiségû fágot és baktériumot (folyadék kultúrában), egy-két nap múlva megjelentek olyan baktériumok, amelyek képesek voltak nôni ampicillin, kanamicin és tetraciklin jelenlétében. Ami azt jelentette hogy a három gén intakt maradt. A kontrollként használt lgtWES-lB nem adta ezt az eredményt.

I. 3. 2. Nagy molekulatömegû DNS hatékony bezárása liposzómába

Radioaktív izotóppal megjelölt, tisztított, különbözõ molekulatömegû, lineáris DNS-eket használva kimutattuk hogy a Ca-kohleatos LUV módszer (9) a közepes és nagy molekulatömegû DNS-eket elhanyagolható mértékben zárja be a liposzómákba. A DNS és a lipidek együttes ultrahangozásán alapuló REV módszer egyformán hatékony a különbözõ molekulatömegû DNS-ek esetén. Tisztított lambda fágot használva (lcI857Sam7) azt találtuk, hogy a LUV módszer bezárási hatásfoka nagyságrendekkel megnõ a csupasz DNS bezárhatóságához viszonyítva. Ugyanakkor ez a nagyobb hatásfok megmaradt 5 mg/ml lambda DNS koncentrációnál is.

Ha a LUV-ba való bezárhatóságot a különbözõ DNS molekulatömeggel rendelkezõ lambda fágok esetében nézzük, akkor azt találjuk, hogy a vad lambda (lcI857Sam7; 48502 bp) esetén a bezárhatóság a legkisebb, a nálánál kisebb molekulatömegû rekombináns fágokhoz képest. Ez arra utal, hogy a fág stabilitása alapvetõen fontos a liposzómába való beépülés szempontjából (LUV képzése során használt, átmenetileg magas EDTA koncentráció valószínûleg gyorsabban destabilizálja a fág fehérje szerkezetét, ha a fág DNS jobban kitölti a fág fejet). Így a kiszabaduló DNS már nem képes beépülni a képzõdõ liposzómákba. A másik (ezzel együtt ható) tényezõ az lehet, hogy a fágok asszociálnak a már kész LUV-okhoz; itt is a stabilabb fág tovább együtt tartja a DNS-t a liposzómákkal, mint a nagyobb molekulatömegû DNS-sel rendelkezõ fág. Érdekes hogy a lcI857Sam7-nel 22 bp-ral kisebb DNS-t tartalmazó lgtWESneo-10 fág esetén jelentõsen több DNS záródott be a LUV-ba, s ez a különbség még tovább nõtt a proteináz-K kezelt liposzómák esetén. Ez arra utal, hogy a vad lambdánál valamivel kisebb molekulatömegû rekombináns fágok esetén már 20% LUV-ba való beépülés is elképzelhetõ, míg adataink biztosan mutatják, hogy 42 Kb nagyságú rekombináns λ fágok kb. 50% DNS beépülést tesznek lehetõvé.

Cirkuláris DNS (plazmid) LUV-ba való bezárhatósága egy-két nagyságrenddel kisebb, mint a nagyobb DNS molekulatömegû intakt fágok DNS-ének bezárhatósága. A pAG60 plazmid REV-be való bezárhatósága hasonló értékeket mutat, mint a linearizált DNS fragmenteké.

Ezek után megvizsgáltuk, hogy mi történik a LUV-ba ill. REV-be bezárt DNS-ekkel, agaróz gélelektroforézissel. Kimutattuk, hogy a magas bezárási hatékonyságok a REV módszer esetén megtévesztõek, mert kb. a bezárt DNS-ek fele degradálódott. A nem szonikált kontroll DNS-ek molekulatömegével megegyezõ, REV-be zárt DNS-ek pedig valószínûleg szintén megsérülhettek, erre azonban direkt kísérleti bizonyítékokat nem szereztünk. A funkciós analízisre (emlõs sejtek transzfekciója) bíztuk a döntést, hogy a pAG60 plazmid kb. 20%-os REV-be záródási hatásfoka (kb. 12-13% maradt natív molekulatömegû a bezárás után) valóban nagyobb transzfekciós frekvenciát jelent-e, mint a lgtWESneo fág 50% bezárási hatásfoka (ami 7-8%-nyi pAG60 plazmidnak felel meg).

I. 3. 3. Emlõs sejtek hatékony transzfekciója LUV-ba zárt fággal

Az egér L sejtvonalának tk$^-$ típusa (LMTK$^-$) a szakirodalom alapján (14,17) egyike a Ca-foszfát módszerrel legjobban transzformálható sejtvonalaknak (Ca-foszfát-DNS csapadék még 16 óra inkubálás után sem toxikus, glicerin sokkot akár 5 percig is elviseli). Ezért elõször a liposzóma transzfekciós rendszerünk vizsgálatára az LMTK$^-$ sejteket használtuk fel. Megállapítottuk, hogy a pAG60 plazmiddal történõ Ca-foszfátos transzfekció átlagosan minden ötszázadik sejtet transzformálja genetikailag (G418 rezisztens klónok). Az általunk kialakított módszer, a LUV-ba csomagolt, intakt rekombináns lambda fággal történõ transzfekció pedig eléri a Ca-foszfát módszer legalább 50%-át. Ez pedig majdnem egy nagyságrenddel nagyobb, mint amit a szakirodalomban egy ehhez hasonló rendszerben

leközöltek (18), REV-et használva.

A következõ lépés volt a HeLa sejtek transzfektálhatóságának vizsgálata. Itt hasonlítottuk össze részletesen a Ca-foszfát-DNS koprecipitációs, a hagyományos (REV) módszert és a módosított LUV eljárást. A HeLa sejtek kb. egy nagyságrenddel kevésbé jól transzformálhatók, mint az LMTK- sejtek a Ca-foszfát módszerrel (15). Eredményeink ugyanezt mutatták: pAG60 plazmid DNS-sel a transzfekciós frekvencia $2\text{-}3\text{x}10^{-4}$ volt. Fág DNS-t használva ennek felét, ill. harmadát lehetett elérni. A REV-be beépített pAG60 plazmid maximum $3\text{-}4\text{x}10^{-5}$-es transzfekciós frekvenciát mutatott. A bevitt liposzóma-mennyiség csökkentésével a transzfekciós frekvencia (habár nem arányosan), de tovább csökkent.

Izolált fágokból (esetünkben lgtWESneo) jóval nagyobb DNS koncentrációjú, könnyen pipettázható szuszpenzió készíthetõ, mint izolált fág DNS-bõl. Így a LUV-ba beépült, ill. hozzá kötõdött fág DNS, fágok formájában, mennyisége nagyságrenddel nagyobb, mint a REV-be beépített DNS-é: 4 mg/ml-es fág szuszpenzióból kiindulva 220 mg fág DNS asszociált 4 mmol PS-LUV-hoz a mosások után, míg a REV-be 12 mg teljes hosszúságú lambda DNS volt beépíthetô fágok használata esetén (ennek kb. egyharmada volt elérhetõ tisztított fág DNS-sel). Ezáltal elérhetõ volt a LUV-ok transzfekciós hatásfokának tanulmányozása széles liposzóma koncentráció tartományban. Ezen kísérletek eredménye azt mutatta, hogy az optimális liposzóma sejt-arány függ attól, hogy glicerin sokkot alkalmazunk vagy sem. A glicerin sokk kezelés esetében a foszfolipid mennyiségének növelésével nõtt a transzfekciós frekvencia (200-400 nmol lipid/10^6 sejt volt általában az optimális: kb. 500 klón); ehhez hasonló volt a REV transzfekció sokk nélkül vagy glicerin sokkot alkalmazva, (alacsony frekvencia: 8-40 klón). A Ca-foszfát-DNS koprecipitációs technika eredményessége is javult a DNS mennyisége növelésével (5-20 mg DNS: 90-300 klón) mind sokk nélkül mind

sokkot alkalmazva. HeLa sejteknél a LUV-ok esetében a glicerin sokk volt csak hatásos, a Ca-foszfát transzfekciónál a 10%-os DMSO sokk is növelte a G418 rezisztens klónok számát. Ami igazán meglepõ volt, hogy ha nem alkalmaztunk glicerin sokkot, akkor a LUV-fág liposzómákkal elvégzett transzfekció egy kétfázisú optimum görbét mutatott, kettõs logaritmikus ábrázolásban, a kapott klónok száma és a DNS mennyisége (az alkalmazott lipid/sejtszám) között. Optimális esetben több, mint ezer klón is kinyerhetõ volt. Ennek jelentõsége igen nagy lehet, hiszen arra utaltak ezen eredmények, hogy a LUV-fágok *in vivo* is felhasználhatók lesznek a jövõben rekombináns DNS bejuttatására, hiszen nem kívánnak glicerin (vagy más) sokk eljárást a transzfekciós hatékonyság megnövelése céljára.

TÉZIS II. A LIPOSZÓMÁBA ZÁRT FÁGOK TOVÁBBI FELHASZNÁLÁSAI

II. 1. BEVEZETÉS

A liposzómába zárt lgtWESneo sikeresen felhasználható volt a jól transzfektálható (egér fibroblaszt LMTK-) és a közepes hatékonysággal transzfektálható (humán HeLa) sejtvonalak esetén. Azonban a liposzómák remélt felhasználása ott volt igazán várható, ahol más génbeviteli technikák alkalmazhatósága igen korlátozott. A laboratóriumunk elõtt álló feladatok több esetben megkívánták az ilyen specifikusan alkalmazott, nagyobb hatásfokú, ill. kevésbé toxikus génbeviteli eljárást. Ilyen volt például a több magyarországi kutató intézetet magába foglaló, transzgénikus halak elõállítására irányuló pályázat. Az egyes kutató csoportok, a különbözõ intézetekbõl és egyetemekrõl, különbözõ típusú géntranszfer technikák (elõbb mikroinjekció, majd késõbb egyre inkább elektroporáció) hasznosításával próbálkoztak. A mi csoportunk a liposzómák alkalmazását tûzte ki. Ennek megvalósítása kezdetben azzal a problémával járt, hogy a csoportunk nem tartott fenn halat, a liposzómák fél országon keresztül való szállítását a megfelelõ hõmérsékleten (5-10 °C) kellett végezni; nem beszélve arról, hogy a megtermékenyített halikrákra is idõnként várakozni kellett (szaporodás biológiai okokból); de mindezen kezdeti nehézségeket sikerült kiküszöbölni, s a liposzómák aktivitását hosszabb idõn át fenntartani.

Két olyan sejtvonal is létezett a laboratóriumunkban, amelyek egyáltalán nem voltak genetikailag traszformálhatók sem a Ca-foszfátos, sem a DEAE-dextranos módszerrel (humán eredetû, szuszpenzióban növõ, leukémiás egyénbõl származó sejtvonal: K562; és a gliasejt eredetû LL30A sejtvonal; dr. Laczkovics Lászlótól kaptuk). Ezen sejtvonalak transzfekciójával teszteltük a liposzómás géntranszferünk lehetõségeit.

A neomicin-foszfotranszferáz enzim génjenek eukarióta sejtekbe való transzfekciója, G418 szelekció után, rezisztens klónokat eredményez. Azonban a gén közvetlen környezete átrendezõdhet, így a szelekciós marker gén mellett bevinni kívánt gén inaktíválódhat (ez történik például a Ca-foszfát és más DNS beviteli technikák esetének jelentõs részében), vagy szabályozatlan expressziót mutathat az átrendezõdéstõl függõen. A beintegrálódott gének kópiaszáma is befolyásolja az átrendezõdést, az expressziót és az inaktívációt. Ezért a LUV-fág transzfekció esetében is meg kellett vizsgálni a beintegrálódás után kialakult DNS szerkezetek sorsát. Ennek vizsgálata elvégezhetõ direkt módon (Southern hibridizációval) és indirekt módon (a szelekciós gén mellett bevitt egyéb gén(ek) expressziójának vizsgálatával). Ennek céljából olyan új rekombináns fágok és plazmidok kialakítása volt a cél, ahol több gén aktivitását együttesen vizsgálhattuk. A neomicin-foszfotranszferáz aktivitása emlõs sejtekben nehezen mérhetõ, ezért arra új módszert kellett kidolgoznunk.

II. 2. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

II. 2. 1. Rekombináns plazmidok és fágok elkészítése

pNMSV2-CAT: a pAG60 plazmidban *EcoRI* részleges emésztés után megszüntettük a TK promoterben lévõ *EcoRI* helyet, s ezután eltávolítottuk a tetraciklin rezisztencia gént (*PvuII*/részleges/-*SphI* emésztés) és beépítettük a Rous sarkoma vírus (RSV) enhanszerét (*ClaI* emésztés, tompa végre való feltöltés, *SphI* emésztés) a TK promoter elé. Ezután a pUC18 plazmidból beépítettük a több restrikciós enzim által hasítható szekvenciát (polilinker) az enhanszer elé (mindkét plazmidon *SphI-EcoR*I emésztés). Az így kialakult plazmid (pN) *EcoRI* és *BamHI* helyei közé bevittük a pBR322 plazmidból az *EcoRI-BamHI* fragmentet (pN2). Ezután a *HindIII* helyre bevittük a 3 Kb nagyságú egér metallotionein gént (19), (ellentétes orientációban, mint a neo gén), a saját promoterének irányítása alatt: pN2M2. A pSV2-cat plazmidot (20) részlegesen emésztve (a pBR322 és az SV40 polyA szekvenciák között, *EcoRI* enzimmel) a klóramfenikol-acetil-transzferáz gént (SV40 promoter irányítása alatt) beépítettük a pN2M2 plazmidba (*EcoRI* részleges emésztés után), úgyhogy a CAT gén orientációja azonos a metallotionein génével. Az elkészült plazmid nagysága 12,9 Kb.

Hasonlóképpen készült el a pNMF-cat (neomicin-foszfotranszferáz marker gén, metallotionein gén és a Friend egér leukémia vírus végein elhelyezkedõ szekvenciával, FMuLV-LTR (21), irányított CAT gén; 11,4 Kb) és a pNGF-cat (neomicin-foszfotranszferáz gén, guanin-foszforibozil-transzferáz gén, SV40 promoter irányiítása alatt (22) és a FMuLV-LTR szabályozta CAT gén; 14,7 Kb).

lENMSV2cat: a pNMSV2-cat plazmidot *SalI* enzimmel linearizáltuk és beépítettük az EMBL4 fág középsõ fragmentje helyére, a *SalI* restrikciós endonukleáz enzimet használva (42,4 Kb).

lENMGFcat: a pNGF-cat plazmidot (*HindIII* részleges, *SalI* teljes emésztés) együtt építettük be a metallotionein génnel (*HindIII*) az EMBL4 fág *SalI* helyei közé (44,3 Kb).

lENMFcat: a pNMF-cat plazmidot ligáltuk be az EMBL4 fágba *(SalI)* (40,9 Kb).

lENMFTcat: az SV40 vírus korai promotere által szabályozott humán tumor nekrózis alpha (TNF-a) gént (*BamHI* enzimmel való emésztés után izolálva) építettük be a lENMFcat fágba (*BamHI* részleges emésztés); 44,1 Kb nagyságú fágot kaptunk.

II. 2. 2. DNS bejuttatása liposzómákkal a megtermékenyített hal petékbe

Afrikai harcsák (*Clarias gariepinus*) ivarérett ikrás egyedeiben ponty hipofízis kivonattal, peteérést indukáltunk. Az ikrásokból lefejt ikrákat a hímek sebészeti úton eltávolított heréiből kiszedett spermiumaival hoztuk össze. A megtermékenyülés után a petékről proteázos emésztéssel eltávolítottuk az ikrahéjat (23) és Holtfreter (24) oldatban háromszor megmostuk őket. Amikor az embriók elérték a 2-4 sejtes állapotot, akkor kb. 200-400 petét (3 ml só oldatban) összehoztunk 8-40 nmol liposzómával. 20 perc szobahőmérsékleten történő inkubálás után az embriókat megmostuk Holtfreter oldatban és ezután petri csészékbe helyeztük őket, amíg az úszó lárvák ki nem keltek. A különböző időpontokban kivett embriókból ill. lárvákból mértük a riporter gének által kódolt enzimek aktivitását. Ehhez elöször steril fogpiszkálóval összetörtük őket, majd fagyasztásos-felolvasztásos módszerrel sejtkivonatot készítettünk (lárvánként 50ml 150mM Tris/HCl, pH=7,0). A kivonatok -20 °C-on voltak tárolva az enzimaktivitások méréséig.

II. 2. 3. A neomicin-foszfotranszferáz aktivitásának mérése

A neomicin-foszfotranszferáz (más néven aminoglikozid-foszfotranszferáz II; APTII) állati sejtekbôl, szövetekbôl való mérésére a következõ eljárást dolgoztuk ki: a sejteket 150 mM-os Tris/HCl pufferben (pH=7,0), 3-5-szori fagyasztási (folyékony nitrogénben) és felolvasztási ciklusnak vetettük alá. A sejtkivonatot centrifugálással (Eppendorf centrifuga, 4 °C) elválasztottuk a sejttörmeléktôl. Az APT reakcióelegy a következõket tartalmazta: 75 mM Tris, 42 mM $MgCl_2$, 400 mM NH_4Cl, 10 mM ^{32}P-gATP (5-10 kBq), 50 mM kanamicin-szulfát, 10 mM NaF. A pH-t maleinsavval 7,1-re állítottuk és 200 mM $Na_2S_2O_5$-t adtunk, amely vizes oldatban nátrium-metabiszulfittá ($NaHSO_3$ alakult át). A reakciót 37 °C-on végeztük el 20 ml sejt kivonatnak (általában 50 mg körüli fehérjének felel meg), 20 ml reakcióelegyhez való adásával (a reakció ideje váltakozhat a várt NPTII aktivitás erôsségétôl; átlagosan 2,5 óra). A reakciót 50 ml DOC (deoxikolsav) és 50 ml TCA (triklórecetsav) oldat adásával állítottuk le (végkoncentrációk: DOC-0,12%, TCA-10%). A mintát 20 percig jégen tartottuk és a csapadékot kicentrifugáltuk (12000 g). A felülúszóhoz 75 ml, 50 mM-os nátrium-pirofoszfátot (pH= 7,5) adtunk és ezt a keveréket bepipettáztuk a Schleicher-Schuell-96 miniblot készülék egyik lyukába. A készülékbe elôzetesen belehelyeztünk egy nitrocellulóz membránból, egy foszfocellulóz papírból és egy Whatman 3MM papírból álló szendvicset; az egyes rétegeket az összeállítás elôtt nátrium-pirofoszfátban (100 mM, pH=7,5) áztattuk. A minta (vagy minták) lassú átszivatása után, a lyukakat 400 ml 50 mM-os nátrium-pirofoszfáttal, lassú átszivatással megmostuk. A készülék szétszedése után a filtereket kétszer megmostuk 10 mM nátrium-pirofoszfátban (70 °C; 10 perc) és háromszor 10 mM-os nátrium-foszfátban (pH=7,5; szobahômérséklet; 5 perc). Ezután desztillált vízben való leöblítés után megszárítottuk a filtereket (szobahômérséklet). A reakció eredményét

autoradiográfiával vizsgáltuk (kisebb aktivitások esetén a film mellé hatásnövelô /screen/ lemezt is helyeztünk és -70 °C-on exponáltunk). Esetenként a filmek elôhívása után a foltoknak megfelelô mintákat a filterekbôl kivágtuk és folyadék szcintillációs módszerrel megmértük.

II. 3. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

II. 3. 1. Új, hatékony módszer kidolgozása az APTII enzim aktivitásának mérésére

A neomicin-foszfotranszferáz enzim aktivitás mérése azon alapul, hogy az enzim képes a ^{32}P-gATP legvégi, radioaktív foszfátjának a kanamicinre való átvitelére. Ezen antibiotikum hozzákötheto a foszfocellulózhoz, így választva el az enzim által átalakított ATP-t az át nem alakulttól (ATP és a szervetlen foszfát nem kötodik a foszfocellulózhoz). Azonban a sejtekben elôforduló kináz aktivitás a jelölt gATP jelenlétében, foszforizálja a fehérjék egy részét. Ezeknek némelyike képes kötodni a foszfocellulózhoz, ezáltal jelentôs hátteret okoz az APTII aktivitás mérésében (alacsony enzim aktivitás esetén elfedi a valós jelet). A sejtben szintén elôforduló foszfatázok viszont radioaktív ATP csökkentést okoznak (indirekt módon), ami az APTII enzimaktivitás (látszólagos) csökkentéséhez vezet. Ezen problémák elkerülésére kidolgozott technikák vagy túl bonyolultak voltak (25) vagy csökkent az érzékenységük a háttér lecsökkentésével (26) vagy nem oldották meg teljesen a háttér problémáját (27,28); különösen ami az állati sejteket, szöveteket illeti. Az általunk bevezetett módszer részben kombinálta az irodalomban létezô módszereket (minifold készülék (29), nitrocellulóz filter alkalmazása (27), NaF a reakcióelegyben (28)). Mindezen tényezôk bevezetése mellett azonban még mindig jelentôs háttér volt a foszfocellulóz filtereken. A nátrium-biszulfit alkamazása azonban már nagyon jelentôsen megnövelte a módszer érzékenységét (gátolva a protein kinázok és foszfatázok által végzett jelölt ATP felhasználást). A háttér abszolút lecsökkentését pedig a DOC/TCA fehérje kicsapással oldottuk meg. Azt tapasztaltuk hogy nagyon alacsony enzimaktivitások esetén (különösen ha pl. halszövetbôl vagy többször használt emlôs sejt kivonatból mérünk)

szükséges nitrocellulóz filter használata is. Összehasonlítottuk az általunk kidolgozott APTII aktivitás mérés hatékonyságát az irodalomban általában használt egyik legérzékenyebb módszerrel, a CAT aktivitásának mérésével. pNMSV2-cat és pNMF-cat plazmidokat (Ca-foszfátos tranziens transzfekció, HeLa sejtek) valamint lENMTFcat és lENMSV2cat fágokat (LUV-fág stabil klónok, HeLa és L929 sejtek) használva kimutattuk, hogy módszerünk eléri a szilikagél vékonyréteg kromatográfiás CAT próba érzékenységét. Jelentôs számú minta esetén pedig sebessége meghaladta a CAT enzim aktivitásának mérésére szolgáló módszert.

II. 3. 2. A LUV-fág, LUV-plazmid liposzómás rendszer vizsgálata szövettenyésztett sejtekkel

A LUV-ba beépített lgtWESneo fág HeLa sejtekbe való beintegrálódását a transzfekció után elôször Southern-hibridizációval (11) vizsgáltuk. A *PvuII-SmaI* neomicin-foszfotranszferáz próba az *EcoRI* emésztett, különbözõ klónokból származó DNS-ekkel egy-egy közel azonos nagyságú hibridizáló jelet adott. Amikor a pAG60-nal transzfektált (Ca-foszfát módszer) klónokat hibridizáltuk azonos körülmények között, akkor több különbözõ nagyságú csíkot kaptunk az autoradiogramon. A jelek erôssége a Ca-foszfát módszer esetében sokkal nagyobb volt mint a LUV módszernél. Megnéztük a Southern hibridizációval vizsgált klónok esetében a sejt kivonat neomicin-foszfotranszferáz aktivitását. Ezek mértéke nem mutatott jelentôs különbséget a kétféle módszer között. Mindezekbôl arra következtettünk, hogy a LUV-val bevitt fág DNS (legalább is a domináns szelekciós marker gén közelében) kevésbé rendezôdik át mint a Ca-foszfáttal transzfektált plazmid DNS. A Ca-foszfáttal bevitt plazmid kópiaszám nagyságrend(dek)kel felülmúlhatja a LUV-os módszert. Ez lehet az egyik oka pl. az átrendezôdéseknek.

Ahhoz, hogy a sejtekbe bevitt domináns marker gén távolabbi környezetében milyen változások zajlanak le, az általunk létrehozott, több marker gént tartalmazó plazmidokat és fágokat használtuk fel. A lENMTFcat fágban a CAT és a NEO gén egymástól a legtávolabbra esik, így a 14,6 Kb-os fágba épített inszertet körülhatárolják. Az inszert belsejében helyezkedik el a TNF és a metallotionein gén. A többi általunk készített fág esetében a metallotionein gén választotta el egymástól a CAT és a NEO gént (11,4 Kb-t fednek le).

A plazmidok esetében (a cirkuláris elrendezôdés miatt) a CAT és a NEO gén egymás mellett helyezkedik el (kivéve a pNMSV2-cat-ot, ahol közöttük van az ampicillin rezisztencia gén), így az általuk lefedett régió kb. 6 Kb. L929 (egér eredetû) sejtekbe LUV-fág módszerrel a fágokat, Ca-foszfát módszerrel a plazmidokat transzfektáltuk be. G418-cal szelektáltunk a mûködô NEO gént tartalmazó, túlélô klónokra. Ezután az egyes klónokban megmértük a CAT enzim aktivitását. Az összes megvizsgált, LUV-fággal transzfektált klón rendelkezett CAT aktivitással is. Amikor a lENMTFcat fágot alkalmaztuk a transzfekcióban, a sejtkivonatból mért CAT aktivitás mellett TNF aktivitást (sejtölô hatása van az L929 sejteken, különösen aktinomicin-D jelenlétében) is ki tudtunk mutatni. Érdekes jelenséget figyeltünk meg: a TNF-a fehérje toxikus az L929 sejtekre. Ha tranziens transzfekciót végzünk a Ca-foszfát módszerrel, akkor egy, de inkább két nap múlva a sejtek jelentôs része elpusztul. A TNF gén elé helyezett szekréciós szekvencia (dr. Mai Antal munkája) kivezeti a TNF fehérjét a tápoldatba, ahol megtámadja a sejteket. Valószínû, hogy a LUV-fágok transzfekciója során a tranziens expresszió mértéke jóval kisebb, ezért nem figyelhetô meg jelentôs sejtelhalás a transzfekció elsô napjaiban. Késôbb, amikor a gén beintegrálódott a gazda sejt kromoszómáiba, sejt rezisztenciát fejlesztett ki a TNF ellen. Igy, amikor már (két-három hét múlva) izoláltuk a klónokat, és egyenként, elkülönítve növesztettük ôket, már minden sejt ellenálló a

(minden sejt által termelt) nagyobb koncentrációjú TNF-fel szemben. A Ca-foszfát transzfekció után kapott klónok egy részében nem mûködött a CAT gén. Ami még érdekesebb, hogy a LUV-fág esetében a klónokból mérhetô CAT aktivitás közel egyforma volt, míg a Ca-foszfáttal transzfektált klónokban változott a CAT aktivitás mértéke. Mindez szintén arra utalt, hogy az átrendezôdés mértéke a Ca-foszfát transzfekció esetén sokkal nagyobb mint a LUV-fág transzfekció esetén.

A rekombináns fág konstrukciók létrehozása idônként meglehetôsen bonyolult lehet. Elôfordulhat hogy a transzfektálni kívánt konstrukció túl nagy ahhoz, hogy a vektor fágokba beépítsék. Ilyenkor pl. kozmidot használnak a klónozásra, amely sok tekintetben a plazmidokhoz hasonló tulajdonságú, de meglehetôsen nagy cirkuláris DNS. Kidolgoztunk egy eljárást (az általunk létrehozott plazmidokat használva), plazmid DNS-ek LUV-ba való bezárására. Az eljárás lényege, hogy protamin-szulfát oldat plazmidhoz adásával (lépcsôzetesen, lassan) a negatív töltésû DNS komplexbe vihetô a pozitív töltésû protaminnal. A kicsapódó DNS-protamin csapadék eltávolítása után (Eppendorf centrifuga, 4 °C, 5000 g) a DNS-protamin szuszpenziót LUV-ba zárhatjuk, a fágokhoz hasonló módszerrel. Ily módon, közel 20-30%-os bezáródás érhetô el a plazmid DNS-ekre nézve. Ez nagyságrendekkel hatékonyabb mint a LUV-ba való csupasz plazmid bezárás és hasonló mint a REV-be való beépítés. Azonban a plazmid intaktságát nem lehetett agaróz gélen lemérni, mivel a DNS-protamin komplex a LUV-ból való kivonás után is együtt marad és nem vándorol úgy, mint a csupasz DNS (a beépülést is csak radioaktívan jelölt DNS-el lehetett nyomon követni).

Megvizsgáltuk a LUV-fág és a LUV-plazmid transzfekció hatásfokát a laboratóriumunkban elôforduló, nehezen transzfektálható sejteken. K562 sejteket transzfektáltunk a LUV-fág módszerrel és néhány kísérletben kaptunk (három hét szelekció) után G418 rezisztens sejteket (a nem

transzfektált kontrollok ennyi idô után pusztultak el). Azonban ezen klónokat nem sikerült sem G418 jelenlétében, sem hiányában felszaporítani. Ezen sejtek normális növekedés esetén is megkívánnak egy megfelelô sejtsûrûséget, így az abortív transzfekció mellett nem kizárható, hogy a szelekció során történô sejtszám csökkenés volt az oka a sejtek elhalásának. Talán a növekedési körülmények változtatásával elérhetô lesz a sikeres szelekció. LUV-ba zárt pNMF-cat plazmidot használtunk a K562 sejtek tranziens transzfekciójára és két nap múlva CAT aktivitást mértünk. A Ca-foszfát módszer esetében nem, a DEAE-dextran módszerrel éppen csak hogy mérhetô aktivitást kaptunk. A LUV-plazmid módszer nagyságrendekkel meghaladta a DEAE-dextran hatékonyságát.

Ca-foszfáttal stabilan nem transzformálható LL30A sejteket LUV-fág (lENMTFcat) és LUV-plazmid (pNGF-cat) módszerrel transzfektáltunk. A transzfekció frekvenciája mindkét esetben alacsony volt (megközelítôleg 10^{-5}), azonban ez is jelentôs elôrelépés volt a Ca-foszfát módszerhez képest. Minden G418 rezisztens lENMTFcat klón kiválasztotta a TNF-et a tápoldatába, míg ha a pNGF-cat klónok között, a HAT szelekciót elvégeztük mikofenolsav és xantin jelenlétében, akkor a három vizsgált klón közül egy nem élte túl; ez arra utal, hogy a LUV-ba zárt DNS-protamin komplex hajlamosabb az átrendezôdésre, mint a LUV-fág komplex.

II. 3. 3. Centromer képzôdés egér sejtekben, emberi DNS-sel és domináns marker génnel való együttes transzfekció után

A lambda fágba beépített neomicin-foszfotranszferáz marker gén a liposzómás módszer mellett felhasználható (pl. a Ca-foszfát-DNS koprecipitációs módszerrel) más rekombináns fágok által tartalmazott nagy gének, "szabályozott konkatamerként", magasabb rendû sejtekbe való bevitelében. A kétféle fág DNS megfelelô arányban való összekeverése után a

fágok ragadós végei stabilan összetartják a szelekciós és a bevinni kívánt gént. Dr. Hadlaczky Gyula csoportja a kromoszómák centromeron régiójának vizsgálatán dolgozott. A centromeronra specifikus ellenanyagot (30) készítettek és az ebbôl elôállított affinitás oszloppal, összetört metafázisos kromoszómákból, DNS próbákat izoláltak. Ezen próbák segítségével szondázták meg a humán eredetû genomikus könyvtárat (l Charon 4A vektorfág). A szûrés végeredménye egy 14 Kb nagyságú (CM8) fragment volt, amely a benne lévô Alu ismétlôdô (repetitív) szekvenciától eltekintve nem hasonlított semmilyen ismert szekvenciára a génbankban. Meg kellett határozni ezen ismeretlen szekvencia funkcióját. A lgtWESneo fág kétszeresen is alkalmasnak látszott ezen feladat végrehajtására. Egyrészt a konkatamerizáció révén, Ca-foszfát módszerrel számos CM8 szekvenciát be lehet építeni. A másik (ebben az esetben) megfontolandó dolog az volt, hogy ha a CM8 szekvenci(ák) mint lehetséges centromeron elkezdenének funkcionálni, akkor inaktíválnák a szomszédságukban lévô géneket (mint a természetes centromeronok esetében), így az APTII génjét is; ezáltal viszont elveszne a szelekciós elôny a G418 jelenlétében. Mivel a lambda fágkarok legalább 35 Kb távolságra tartják a NEO gént a CM8-tól, (konkatamer esetén pedig figyelembe vehetjük, hogy több inaktív lgtWESneo fág helyezkedik el a CM8 és az aktívan maradt NEO gén között) várható volt, hogy egy ilyen rendszer lehetôvé teszi mind a centromeron, mind a NEO gén mûködését. Több sejtvonal (egér LMTK-, hörcsög CHO, egér L929 és emberi HeLa) transzfekciója (és számos klón vizsgálata) végül is két érdekes LMTK- klónhoz vezetett, amelybôl az egyik nagyon nagy instabilitást mutatott az egér kromoszómába integrálódott humán szekvenciákat illetôen (pl. két-, három- és többcentromerikus kromoszómák váltakoztak a klónból származó egyes sejtekben); a másik klón azonban stabil volt, sejtjei vagy kétcentrikus (85%) vagy minikromoszómákat (10%) tartalmaztak. Ezen klón sejtjeibe átlagosan több mint 30 CM8 szekvencia épült be. A klón sejtjeinek további

klónozásával sikerült olyan klónokat kapniuk, amelyekben a beépült domináns marker gént tartalmazó fágszekvenciákból, az emberi kromoszóma eredetû CM8 régióból (és fág karokból) valamint ismeretlen egér DNS szekvenciákból kialakult egy stabil minikromoszóma. Ezen sejtekben tehát a minikromoszóma G418 szelekció nélkül is fennmaradt, ugyanakkor a centromeron régiótól kellô távolságra lévô domináns markergének némelyike is megôrizte aktivitását (a sejtek magas koncentrációjú G418-ban is fenntarthatók voltak).

II. 3. 4. liposzómán alapuló génbevitel hal embriókba

A megtermékenyített ikrák és az abból kikelô lárvák viszonylag nagy száma egy hatékony tesztelési módszer alkalmazását kívánta meg. Mivel a homogenizált hal lárvák jelentôs lipid tartalommal rendelkeztek, szükséges volt megvizsgálni a nagy számú emlôs sejt mintára jól alkalmazható, általunk kidolgozott APTII mérés hatékonyságát. Ezért az elsô génbeviteli kísérletekben (LUV-ba zárt lENMFcat fággal) összehasonlítottuk mind a két marker gén (NEO és a CAT) expresszióját. Hét napos úszó lárvák vizsgálatánál azt kaptuk, hogy ugyanaz a hét egyed (31-bôl) expresszálta mindkét enzimet és további két egyed még mutatott CAT aktivitást. Mivel ebben az esetben a szokásos CAT aktivitás vizsgálat érzékenységét jelentôsen megnöveltük azáltal, hogy a 40 perces inkubációs idôt 4 órára terjesztettük ki (friss acetil-koenzimA többszöri hozzáadása mellett), azt határoztuk el a továbbiakban, hogy a nagyszámú tesztelésekre az APTII esszét használjuk. Egyébként a két enzim aktivitásának szintje is jelentôs korrelációt mutatott a különbözõ egyedekben, s ez hasonló mint amit az emlôs sejtek esetében tapasztaltunk LUV-fág módszerrel végzett transzfekció során. Ahhoz, hogy optimalizáljuk módszerünket, meghatároztuk a 6 napos lárvákban kifejezôdô enzim aktivitást, különbözõ mennyiségû liposzómát adva a két sejtes állapotú embriókhoz: 200-400 petéhez (3 ml pufferben) 8-40 nmol

foszfolipidet adva kaptuk a legjobb expressziót (az úszó lárvák kb. 75%-a termelte az APTII enzimet; lENMTFcat fágot használtunk), de a kísérletekben használt legkisebb és legnagyobb mennyiségû (1 nmol ill. 500 nml foszfolipid) is 60% körüli aktivitást eredményezett. Ha a tranziensen kifejezôdô APTII aktivitást az úszó lárvák korának függvényében ábrázoltuk, akkor azt kaptuk, hogy a két napos lárvák több mint 80%-a termeli az enzimet. Ez a magas kifejezôdési arány az idô függvényében csökkent, hat nap után 55%-os, míg három hét után már csak 27%-os volt. A megtermékenyített pete különbözõ fejlôdési állapotainál is megkíséreltük a LUV-fág génbeviteli módszert és az kaptuk hogy a 2-4 sejtes állapot a leghatásosabb, a 32 sejtes állapot esetén már jelentôsen toxikussá vált a kezelés és az APTII enzim aktivitást mutató egyedek száma is jelentôsen csökkent. Liposzómához kevert fágokkal elvégezve a génbeviteli kísérleteket nem kaptunk enzim expresszáló úszó lárvát (20 egyed volt megvizsgálva). Ez hasonló volt az emlôs sejtek transzfekciójánál kapott adatokkal. A LUV-ba zárt, protamin-szulfáttal kezelt pNMSV2-cat plazmidot is hatékonyan fel lehetett használni a 2-4 sejtes állapotú, megtermékenyített hal ikrákba való génbevitelre (a két napos úszó lárvák több mint 90%-a termelt neomicin-foszfotranszferáz enzimet). Azonban, eltérôen az emlôs sejtektôl, nem sikerult stabil génbevitelt kimutatni a felnôtt halak szerveibôl (sem Southern hibridizációval, sem pedig enzim aktivitás mérésekkel). Ezen jelenségnek több magyarázata lehet: mozaikos beépülés, a beintegrálódott DNS alacsony kópiaszáma, ill. inaktivációja. Mindezt alátámasztja az úszó lárvákból mérhetô aktivitás csökkenése az életkoruk növekedésével. A kísérletek során megfigyeltük, hogy a lárvákban jelentôs számban elôfordult fejlôdési rendellenesség és csökkent életképesség. Elpusztuláshoz közel álló egyedekbôl többet szedtünk mint az egészségesnek kinézôkbôl az enzim aktivitásának vizsgálatára. Ezek az egyedek sokszor mutattak magas APTII enzim aktivitást. Az üres liposzómákkal kezelt kontroll kísérletekben, az úzó

lárvák jóval kevesebb pusztulást és fejlôdési rendellenességet mutattak. Mindezek alapján a kifejezôdô marker gének valószínûleg szelekciós hátrányban részesítették az ôket expresszáló sejteket.

TÉZIS III. ANDROGÉN ÉS ÖSZTROGÉN ÉRZÉKENY SEJTEK TANULMÁNYOZÁSA A TRANSZFEKCIÓ ÉS A KIVONÁSOS HIBRIDIZÁCIÓ MÓDSZEREIVEL

III. 1. BEVEZETÉS

Androgén és ösztrogén nemi hormonok háromféle módon szabályozzák a sejtszámot a nekik megfelelõ célszövetekben (epiteliális sejtek a prosztatában, emlõben, endometriumban, stb): a/ elõsegítik a sejtosztódást; b/ gátolják a sejthalált; c/ gátolják a sejtosztódást. Mindezeket a jelenségeket elõször olyan állatokon észlelték (és késõbb vizsgálták), amelyeknek nemi hormon termelõ ivarszerveit (here, petefészek) eltávolították. Azonban az állati modellek meglehetõsen bonyolultak, sokféle kölcsönhatás játszódik le bennük. A stabil laboratóriumban megalapozott sejtvonalak lényegesen egyszerûbbé teszik a nemi hormonok sejtszámot megváltoztató hatásának tanulmányozását.

Külföldi tanulmányutamon (Prof. Carlos Sonnenschein & Prof. Ana Soto laboratóriumaiban) az androgén és ösztrogén hormonok sejtosztódásra gyakorolt gátló hatásának vizsgálata volt a munkám tárgya. Humán prosztata eredetû LNCaP sejteket (31) és emlõ eredetû MCF7 sejteket (32) használtunk modellként. A szakirodalom szerint ez a két sejtvonal az, amelyik a legjobban hasonlít a prosztata, illetve az emlõ androgénre ill. ösztrogénre érzékeny epiteliális sejtjeire. A laboratóriumunkban felállított elmélet (33,34) alapján ezen sejtek viselkedése a nekik megfelelõ hormon jelenlétében, ill. hiányában tükrözi az androgén, ill. ösztrogén hatására bekövetkezõ változásokat az azok által megcélzott szövetekben. Nemi hormon hiányában a sejtek nem osztódnak a szérumban jelenlévõ gátló faktor (inhibitor) miatt. Ha fiziológiás mennyiségû hormont adunk a tápoldathoz, akkor az eltörli az inhibitor gátló hatását és a sejtek elkezdenek

osztódni. Ha több hormont adunk a sejtekhez (magas, de a szervezetben a hormonszint változások miatt még szintén fiziológiás mennyiségût), akkor a sejtek osztódása leáll, mert a hormon kiváltja új inhibitor(ok)nak a sejtek által való termelését. Ezen a nemi hormonok által direkt úton kiváltott sejtosztódás gátlást nevezték "proliferatív shutoff"-nak (33,34,35,36). Feltételeztük, hogy az androgének (ill. ösztrogének) által kiváltott gátló hatás mechanizmusa a sejtosztódást gátló fehérjék (inhibitorok) génjeinek transzkripciós aktiválásán keresztül valósul meg. Mindeddig egyetlen ismert sejtosztódás inhibitorról (vagy ún. tumorszupresszorról) sem sikerült másoknak bebizonyítani, hogy szerepet játszik a nemi hormonok által kiváltott sejtosztódás gátlásában. Csoportunk feladatának tûzte ki ezen (valószínûleg új) inhibitor(ok) génje(i)nek klónozását.

Ahhoz, hogy a különbözõ hormon koncentrációk jelenlétében bekövetkezõ változásokat (indirekt és direkt sejtosztódás gátlás; maximális sebességû sejtosztódás) könnyebben lehessen vizsgálni, laboratóriumunkban kiszelektálták az LNCaP sejtek és az MCF7 sejtek ún. variánsait. LNCaP sejtek (és az általunk használt LNCaP-FGC (31), gyorsan növõ LNCaP variáns) hormon hiányában nem osztódnak. 0,1-1 nM R1881 (metiltrienolon; szintetikus androgén, amely nem inaktiválódik a sejtek jelenlétében; a természetes androgén, tesztoszteron kb. 1 napos felezési idejû LNCaP sejtekhez adva) jelenlétében maximálisan osztódnak. Ennél nagyobb koncentrációjú R1881 gátolja a sejtosztódást. LNCaP-TAC variáns, amely magas koncentrációjú androgén jelenlétében is osztódik, az LNCaP-FGC-bõl származik, magas androgén koncentráció mellett lett kiszelektálva (37). Az eredeti LNCaP-FGC klón mellett ugyanabból a betegbõl kiizoláltak egy olyan prosztata eredetû sejtvonalat is (LNCaP-LNO), amely csak hormon hiányában volt képes osztódni (31). 0,3 nM R1881 már gátolta az osztódását. Ebbõl a sejtvonalból klónozta Dr. Sonnenschein az LNCaP-TJA-t (38), amely mindenféle hormon koncentráció mellett is jól osztódik. Az MCF7 sejt sem

osztódik ösztrogén (E_2) hiányában. Ha az ösztrogén koncentrációt emelni kezdik a tápoldatban, akkor 0,01 nM E_2 jelenlétében már 50%-át is eléri a maximális osztódási sebességnek (0,1-1 nM), míg 10 nM E_2 jelenlétében és annál magasabb koncentrációknál ez csökken (34). Az E_8CASS variáns úgy származott az MCF7-bõl, hogy azt nagyon hosszú ideig ösztrogén nélküli tápoldatban tartották fenn és miután a legtöbb sejt kihalt, megvizsgálva a megmaradó klónokat azt választották, amely ösztrogén hiányában maximálisan 0,3 nM vagy annál magasabb E_2 koncentráció mellett nem osztódik. Ezen sejtekbõl szelektált ki (0,3 nM E_2 jelenlétében) Dr. Sonnenschein egy olyan klónt (A_2E_8CASS), amely hasonló hormon koncentráció függést mutatott, mint az MCF7 sejtek (39). Ezen LNCaP és MCF7 sejtvonal variánsok sejtosztódási tulajdonságainak vizsgálata mellett tanulmányozni kellett, hogy vajon bekövetkezett-e változás a hormonok hatását közvetítõ receptorok (androgén receptor /AR/, ill. az ösztrogén receptor /ER/) aktivitásában. Ehhez a vizsgálathoz az adott szteroid hormonok által specifikusan aktivált ún. marker géneket használtuk fel.

III. 2. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

III. 2. 1. Molekuláris biológiai módszerek

Az SV40 korai promoter által szabályozott humán androgén receptor cDNS-t tartalmazó plazmidot (pSG-hAR) Dr. Chawnshang Changtól kaptuk (40). A CAT reporter gént használtuk az MMTV-LTR (Moloney egér tumor vírusból) irányítása alatt az androgén receptor által közvetített transzkripció vizsgálatára (tranziens transzfekció). Androgén hatására a prosztatában (és az LNCaP sejtekben) indukálódó marker gént (PSA, prosztata specifikus antigén) használtuk fel, hogy direkt módon vizsgáljuk az androgének által kiváltott transzkripciós változásokat:

a/ Northern analízis (a PSA cDNS-t Dr. Donald Tindalltól kaptuk (41), pGEM-be klónozva);

b/ kvantitatív RT-PCR (reverz transzkripció és PCR-reakció egymás utáni alkalmazása mRNS-eken /vagy össz-RNS preparátumokon/ specifikus primerekkel, az adott RNS mennyiségi arányának meghatározására a különbözõképpen kezelt sejtek között).

Az SV40 promoter által szabályozott humán ösztrogén receptor cDNS-t, pHEGO (42), a pS2-CAT (43) reporter gént (az ösztrogén által indukált pS2 (44) gén promoterét tartalmazza) és a pS2 cDNS-t (pBR322-be klónozva) Prof. Pierre Chambon bocsátotta rendelkezésünkre.

A kivonásos (szubsztrakciós) hibridizáció: a módszert Prof. Donald D. Brown laboratóriumában dolgozták ki elõször (45), s a tõle kapott részletes eljárást alkalmaztuk az LNCaP sejtek esetén, majd a módszert kissé módosítva az E_8CASS sejtekbõl is preparáltunk egy az ösztrogén által indukált génekre feldúsított cDNS fragmentekbõl álló könyvtárat. A módszer két különbözõképpen kezelt (**A** és **B**), de azonos eredetû sejtpopulációból (vagy kétféle sejttípusból) indul ki: oligo-dT primerrel cDNS-t szintetizáltunk

(InVitrogen cDNS szintézis Kit) az oligo-dT oszlopon tisztított mRNS-ekbõl (**A** és **B** sejtekbõl). Az adott cDNS-eket felét *AluI*-el, másik felét *RsaI*-el kisebb fragmentekké emésztettük, az enzimeket hõvel inaktiváltuk és ezután egy-egy Eppendorf csõbe hoztuk õket össze (**A** és **B** csõ). A cDNS fragmentekhez olyan adaptert ligáltunk (tompavég-ligálás), amelyben a hosszabb linkert elõször elláttuk egy 5'-végi foszfát csoporttal (linker-kináz reakció), majd ehhez a linkerhez hibridizáltunk egy nem foszforilált, komplementer DNS szekvenciát tartalmazó linkert. Az adapter tartalmazott egy *EcoRI*-t helyet a foszforilált linker 5'-végéhez (tompavég) közel. (Ezt az eljárást késõbb úgy módosítottuk, hogy különbözõ adaptert használtunk a kétféle cDNS populációhoz úgy, hogy az adapterek ragadós végén egy *HaeIII* hely legyen; ekkor természetesen a cDNS-eket *HaeIII*-mal kellett emészteni és a ragadós végén elhelyezkedõ 5'-véget foszforilálni). A 150-1000 bp terjedõ cDNS fragmenteket alacsony olvadáspontú agaróz gélen izoláltuk (és így elválasztottuk õket a szabad linkerektõl is). Az izolált cDNS-eket *TAQ* polimerázzal szaporítottuk fel (PCR) annyi csõben, hogy legalább 150 mg-ot kapjunk mind a kétféle (**A** és **B**) cDNS fragment populációból. A DNS-ek tisztítása (fenol/kloroform extrakció, etilalkoholos kicsapás) után 100-100 mg-ot (**A** és **B** típusból) *EcoRI*-el megemésztettünk és biotinnal alaposan megjelöltünk (Vector Laboratory reagensek). Ezek után a biotinnal jelölt **A** cDNS-t (50 mg) összehoztuk 2 mg *EcoRI*-el nem emésztett és biotinnal nem jelölt cDNS-sel (**B** eredetû) és ugyanez történt a másik irányban is (50 mg jelölt **B** cDNS 2 mg nem jelölt **A**-val összehozva). A DNS-eket 68 °C-on, 20 órán át hibridizáltuk (hosszú hibridizáció), majd a biotinnal jelölt DNS-eket sztreptavidinnel eltávolítottuk (fenolos extraktcióval). Mivel az **A**-ban és **B**-ben közös cDNS-ek egymással hibridizálni képesek a hibrid molekulák kivonása után, a közös cDNS molekulák aránya csökken az egyes **A** ill. **B** típusúakhoz képest. A megmaradó cDNS-t újra összehoztuk a másik 50 mg biotinnal jelölt (másik sejtpopulációból származó) cDNS-sel és a hibridizációt

megismételtük (rövid hibridizáció); a hosszú hibridizáció az alacsony koncentrációban elõforduló közös cDNS-ek eltávolítására szolgált, a rövid idejû hibridizáció a nagy koncentrációban elõforduló közös DNS-ek kivonását célozta meg. A két hibridizáció után megmaradt kis mennyiségû (A - B) ill. (B - A) cDNS-ek mennyiségét PCR-ral megnöveltük és a fenti mûveleteket (biotinnal jelölés, hibridizációk, PCR) háromszor megismételtük és az így kapott cDNS-eket klónoztuk be a pSK(-) plazmid *EcoRI* helyére. A kétféle cDNS fragment könyvtárat, (A - B) és (B - A), ugyanezen cDNS fragmentekbõl készített radioaktív próbákkal szondáztuk és az A-ra ill. B-re specifikus fragmenteket izoláltuk. A fragmentek szekvencia analízisét elvégeztük (dsDNA Sequencing Kit; Gibco-BRL) és a génbankokban a FASTA és a BLAST programokkal hasonló szekvenciák meglétét kerestük. Azon fragmenteket, amelyek nem tartalmaztak hasonlóságot ismert szekvenciához, Northern analízissel vagy RT-PCR-ral vizsgáltuk a sejt specifikus kifejezõdés (ill. hormon által indukált transzkripció) meglétére. Azon fragmenteket, amelyek a hormonok által indukált sejtosztódás gátlásával megegyezõ kifejezõdést mutattak, használtuk fel a továbbiakban a teljes hosszúságú cDNS-ek klónozására.

A legtöbb molekuláris technikát Sambrook és munkatársai kézikönyve alapján végeztük el (46). A különbözõ cégektõl vásárolt kit-ek esetén a cégek által mellékelt eljárásokat követtük.

III. 2. 2. Szövettenyésztés, sejtekkel való kísérletek

A sejtek (LNCaP-FGC, LNCaP-TAC, LNCaP-TJA, MCF7, A_2E_8CASS) általában DME-ben nõttek, amelyet 5% FBS-sel egészítettünk ki. A hormon nélküli tápoldat (5% CDFBS): FBS-bõl aktív szénnel kivonták a hormonokat (34), és ezt adtuk a fenolvörös-mentes DME-hez. Az LNCaP-LNO és az E_8CASS sejtek a 5% CDFBS-ben voltak fenntartva. A sejtosztódási

kísérletekben a szérummentes tápoldat ITDME volt (100 ng/ml inzulin és 2 mg/ml transzferrin DME-ben). A szérumot tartalmazó tápoldat CDFBS vagy CDHuS (emberi szérum) volt és a megfelelõ hormon mennyiségét a kísérletek elõtt mértük be. A sejtek számát közvetlenül állapítottuk meg a sejtek lízise után a sejtmagok számlálásával (Coulter Counter Model Zfi).

A sejtciklus kinetikáját Beckton-Dickinson FACSCAN flow cytometerrel vizsgáltuk. A sejteket propidium-jodiddal jelöltük és a DNS tartalom meghatározása után a sejtszámot a propidium-jodid fluoreszcencia függvényében ábrázolva meghatároztuk a G_0-G_1, G_2-M és az S fázisoknak megfelelõ sejtszámok százalékos arányait (Hewlett-Packard 346 számítógép; Beckton-Dickinson Lysis és Cell Fit programok).

A transzfekciókat a Ca-foszfát-DNS koprecipitációval (46), majd lipofectinnel (Gibco-BRL) végeztük el; a tranziens transzfekciók esetén pRSV-ß-GAL (47) plazmidot alkalmaztunk a transzfekció hatásfokának megbecsülésére. A kloramfenikol-transzacetiláz gén aktivitás értékeket a ß-galaktozidáz enzim aktivitás értékeinek megfelelõen hoztuk egy szintre.

III. 3. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

III. 3. 1. A sejtosztódás és a transzkripció közötti összefüggés vizsgálata

Az LNCaP és MCF7 sejtekbôl kiszelektált különbözô sejtvariánsok által felvetett nagyon fontos kérdés: ha a sejtek ilyen különbözôképpen reagálnak a nekik megfelelô hormonok jelenlétére, akkor vajon megsérültek-e a hormon receptorok által közvetített, a hormonok által aktivált transzkripciós útvonalak. A PSA-t az androgének mind RNS, mind fehérje szinten aktiválják a prosztatában és az általánosan használt LNCaP-FGC sejtvonalban. Northern analízissel és RT-PCR-ral kimutattuk, hogy az LNCaP-FGC és LNCaP-LNO sejtvonalakban a PSA mRNS szint 5-10-szeresére megnõ, ha a CDFBS tápoldathoz 0,3 nM R1881-t adunk. Ha a hormon koncentrációt 30 nM-ra növeltük, a PSA mRNS szint ugyanolyan magas maradt, mint a 0,3 nM R1881 koncentrációnál. Az LNCaP-TAC és TJA varánsok esetében a transzkripciós aktiválás jóval kisebb, fôleg azért, mert jelentôs a PSA mRNA alapszint a hormon hiányában is. Fehérje szinten kimutatták, hogy a TJA kb. 10-szer kevesebb PSA-t szekretál a tápoldatba, mint az LNCaP-FGC vagy az LNO, ha androgén jelenlétében növesztik (38). Az LNCaP-TAC hasonló szinten expresszálta a PSA fehérjét mint az FGC sejtek. Az androgén által indukálható pMSG-CAT plazmiddal tranziens expressziót végeztünk el a sejtvariánsokon és azt kaptuk, hogy valamennyi sejtvariánsban megmaradt az AR által közvetített, androgén által kiváltott transzkripciós aktiváció, habár az LNCaP-TAC-ban jelentôs volt az alapaktiválás (hormon nélkül) és az LNCaP-TJA-ben a maximális aktiválás 4-6-szor kevesebb volt mint a többi variánsban. Mindezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a magas androgén koncentráció által kiváltott sejtosztódás gátlás nem valósul meg az androgénre specifikus gének lecsökkent transzkripcióján keresztül, hiszen az LNCaP-FGC és LNO

sejtekben az R1881 által kiváltott transzkripciós aktiválás ugyanúgy megvalósul a maximális sejtosztódást okozó hormon koncentrációnál, mint a shutoff-ot kiváltó magasabb androgén szintnél (a sejt saját génjén (PSA) és a kivülrôl bevitt marker génen vizsgálva). A különbözô eredmények az LNCaP-TAC és TJA esetén azt jelzik, hogy az androgén kiváltotta sejtosztódás gátlás valószínûleg másféleképpen szûnt meg a két variánsban.

Ugyanilyen módon vizsgáltuk az MCF7 sejtvonalban és annak variánsaiban az ösztrogén indukálta transzkripciós változásokat. A pS2 gén, ösztrogén hatású molekulákkal aktiválható a transzkripció szintjén. Mindez az ösztrogén receptor aktiválódása útján megy végbe (43). A pS2 mRNS szinteket vizsgáltuk hormon hiányában (10% CDFBS) és 10 nM E_2 jelenlétében. A pS2 mRNS szintje mindhárom MCF7 sejt variánsban jelentôsen (3-5-szörös) megnôtt az E_2 hozzáadása után. A pS2-CAT aktiválhatóságát különbözô E_2 koncentrációk jelenlétében összehasonlítottuk három MCF7 variánsban és azt kaptuk, hogy az aktiválási görbék lefutása hasonló (maximális aktiválás 0,1-1 nM tartományban következett be). A 10 nM E_2 koncentráció nem okozott jelentôs változást az 1 nM E_2-szinthez képest. Hasonlóan az LNCaP sejtek esetéhez, az E8CASS sejtek számának növekedése már 0,03-0,3 nM-nál megállt, de az ösztrogén által aktivált transzkripció nem csökkent (ezen esetben inkább félmaximális volt, ami tovább növekedett a hormon koncentráció növekedésével). Ezen kísérletek is alátámasztották, hogy a nemi hormonok által kiváltott sejtosztódás gátlás (magasabb hormon koncentrációknál, mint ami például az egyedek szervezetében létrejön a nemi érés ideje után; kísérlet során pedig elôidézhetô a kasztrált állatokba való hormon tabletta beültetésével) valószínûleg egy aktív folyamat.

III. 3. 2. Androgén és ösztrogén által indukált génekbôl származó szekvenciák izolálása

Az androgén által indukált cDNS fragmentekre feldúsított könyvtárat LNCaP-FGC sejtekbôl izolált RNS-ekbôl készítettük úgy, hogy a sejtek vagy hormon nélkül (5% CDHuS; **A** sejtek) vagy 30 nM R1881 (**B** sejtek) jelenlétében növesztettük egy napot. A laboratóriumban korábban megállapították (hormon hozzáadásos és elvonásos kísérletekkel), hogy a sejtosztódás irreverzibilis leállításához a sejteket legalább 22 óráig ki kell tenni az androgén hatásának.

A 230 megvizsgált androgén indukálta shutoff klónból (AS) a cDNS próbákkal való hibridizáció után 14 AS specifikus klónt találtunk, amelyekbôl az egymással való keresztbe hibridizálás, szekvenálás után öt egyedi fragment maradt. Ezekbôl két klónt nem találtunk meg az LNCaP-FGC sejtekbôl (30 nM R1881 kezelés után, oligo-dT primerrel indított cDNS szintézis, klónozás a lZAPII *EcoRI-XhoI* helyeire) készített cDNS könyvtárunkban. Ezen két klón egyike sem mutatott szignifikáns hasonlóságot a génbankokban lévô szekvenciákhoz. A másik három szekvencia esetében sikerült a közel teljes hosszúságú cDNS-eket a cDNS könyvtárból kiszedni. A CDHuS-ban növô LNCaP-FGC sejtekre specifikus (SA) cDNS fragmentekbôl kettôt izoláltunk: SA1-re (119 bp) nem találtunk hasonló szekvenciát a génbankokban, az SA3 97,5%-os homológiát adott az emberi trk-2h onkogénnel. A fenti klónok esetében az AS ill. SA specifikus expressziót elôször RT-PCR-ral bizonyítottuk, mivel a klónok egy része, a fragmentek rövidsége (és valószínûleg az alacsony mRNS kópiaszám) miatt nem adott jelet a Northern analízissel. Megjegyezendô, hogy találtunk olyan fragmenteket is, amelyek mind a két állapotban (AS, SA) egyformán fejezôdtek ki.

A három közel teljes hosszúságú AS cDNS szekvenciáját meghatároztuk és azt találtuk, hogy mind a három tartalmaz lehetséges fehérje kódoló (ORF) régiót. Az AS1 gén egy 3,9 Kb nagyságú mRNS-t kódol és a lehetséges ORF (631 aminosav) tartalmaz egy sejtmagba irányító szekvenciát (NLS), valamint ún. chaperon elemeket. A maximális aktiválást (30 nM androgén jelenlétében) 18 óra múlva éri el és folyamatosan expresszálódik ezután (72 óráig mérve). Az AS2-nek a 7,5 Kb-os mRNS-e mellett van két másik érési változata (6,0 és 4,4 Kb). Az mRNS szint növekedése négy óra múlva látható és miután a négyszeresére emelkedett (6 óra után), a szintjét megtartja (72 óráig vizsgáltuk). Ezen génrôl a vizsgálataink közben leközölték mások (48), hogy a szem albinizmusában játszik szerepet, de ennek további bizonyítása még várat magára. Az AS3 gén 7,0 és 4,7 Kb mRNS-eket mutatott a Northern analízissel, ORF-jében (1217 aminosav) megtalálható volt többek között egy lehetséges leucin-cipzar domen, egy androgén receptoréhoz homológ NLS és a C-terminális végén egy savas ill. bázikus aminosavakbol álló, egymást váltogató, ismétlôdô szekvencia (hétszeresen). Az AS3 esetében már két óra múlva kétszeresére nô az mRNS szintje az androgén hozzáadása után, de 18 óra múlva éri csak el a több mint ötszörös aktiválódását. Az AS gének kifejezôdése jó megegyezést mutatott a különbözô LNCaP variánsokban az androgén által gátolt sejtosztódással (LNCaP-FGC és LNO esetén aktiválódtak, míg TJA és TAC esetében nem változott a szintjük). A közelmúltban, amikor a génbankokat újra vizsgáltuk, megállapítottuk, hogy két, az AS3-mal azonos szekvencia került bevitelre. Az egyik (49) egy genom szekvencia (a 267p19-es kozmidból), amely a 13-as kromoszóma 13q12-13-as részébôl származik. Majd késôbb bevittek egy lehetséges mRNS szekvenciát is (CG008), amelynek azonban szerintünk rosszul határozták meg a méretét, egy a szekvenciában elkövetett hiba miatt. Ezen adatok alapján megállapítottuk, hogy az AS3 a centromer irányában elhelyezkedô

retinoblasztoma gén (RB1) és a telomer irányában elhelyezkedô BRCA2 (a családi öröklôdésû emlôrákban tételezik fel szerepét) gén között helyezkedik el. Errôl a régióról feltételezik (50,51,52,53), hogy az RB1 és BRCA2 mellett más olyan tumor szupresszor is van, melynek funkcióvesztése esetén, a daganatok kialakulásának megnô az esélye.

A Wang és Brown által kidolgozott módszer egy igen hatásos eljárás közepes (pl. AS1) és alacsony (pl. AS2 és AS3) kópiaszámú, különbözôképpen kifejezôdô gének cDNS-enek klónozására. Azonban az *EcoRI* kezelés és a biotinos jelölés nem elég ahhoz, hogy tökéletesen hatástalanítsa a kivonásra használt (driver) cDNS fragmenteket a hibridizáció után következô PCR reakció szempontjából. Ezért a kivonásra használt cDNS töredék része is megsokszorozódik a PCR reakció során, amikor a kivonásra ítélt (kis mennyiségû) cDNS-nek akarjuk a mennyiségét megnövelni. Ezért vezettük be az "Alkalmazott módszerek" fejezetben megemlített változtatásokat. Így a kétféle cDNS-nél kétféle primert használunk a PCR reakciókhoz, elkerülve a keresztbe szennyezõdést. Ezzel a módszerrel sikerult az E_8CASS sejtekbõl (E_2 hiányában szaporodó és E_2 jelenlétében leálló) ösztrogén indukált cDNS-ekre specifikus könyvtárat készíteni.

III. 3. 3. Az androgén receptor szerepe az androgén által indukált sejtosztódás gátlásában

A nemi hormonok által indukált sejtosztódás gátlás vizsgálatanál az volt a munka hipotézisünk, hogy a hormonok aktív módon, specifikus inhibitor gén(ek) transzkripciós aktiválásán keresztül fejtik ki hatásukat. Ezen elképzelés további vizsgálatára elhatároztuk, hogy az androgén receptor MCF7 sejtbe juttatásával tanulmányozzuk az androgén receptor aktiválásának és a sejtosztódás gátlásának összefüggését. A humán mutációt

nem tartalmazó androgén receptor MCF7 sejtekbe való transzfektálása után, több az androgén receptort különbözõ szinten kifejezõ klónt kaptunk. Az androgén hatására bekövetkezõ sejtosztódás gátlás ott volt a legkifejezettebb, ahol az AR aktivitása a legnagyobb értéket mutatta. Az eredeti MCF7-ben is jelen volt az AR, azonban annak aktivitása 5-10-szer kisebb volt mint az AR-t legjobban kifejezõ MCF7-AR1 klónban. Az MCF7 nem mutatott sejtosztódás gátlást androgén jelenlétében. Ugyanakkor azok a klónok, amelyek az MCF7-nél már kétszer nagyobb AR aktivitást mutattak (pMSG-CAT plazmiddal elvégzett tranziens transzfekciós vizsgálatokban), már jelentôsen gátlódtak (30%) a sejtosztódást illetõen. Az MCF7-AR1 sejteket 30 nM R1881 jelenlétében (G418 mellett) szelektáltuk és két hónap múlva, a gátlást leküzdõ klónokat kaptunk. A klónok egyedi vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy androgénnel nem gátolhatók a növekedésükben. Ugyanakkor valamennyi klónban az AR elvesztette az aktivitását. Ha összehasonlítottuk az androgén receptoron keresztül megvalósuló pMSG-CAT aktiválást a sejtosztódás gátlásával az R1881 koncentráció függvényében, azt tapasztaltuk, hogy jelentôs összefüggés található közöttük. Arra vonatkozólag, hogy a túlságosan megnövelt AR szint okozta volna a sejtosztódás gátlását, megvizsgáltuk az AR fehérje szintjét. Azt találtuk mind Western analízissel (AR ellenanyagot használva) mind receptor-kötési vizsgálatokkal (radioaktív androgént használva a nem radioaktívval szemben), hogy az AR fehérje szintje MCF7-AR1-ban kb. négyszerese az MCF7 sejtekben levõnek. Ez körülbelül az LNCaP-FGC sejtek AR szintjének felel meg és kevesebb mint az LNCaP-LNO-ban található AR fehérje mennyiség. Megjegyzendõ, hogy az AR bevitele MCF7-be, nem tette lehetõvé az alacsony koncentrációjú androgénnek a sejtosztódás aktiválását. Ehhez hasonló jelenséget mutattak ki ösztrogén receptornak az ösztrogén receptor nélküli, de emlõ tumorból származó sejtekbe (54) és androgén receptornak az androgén receptor nélküli, de

prosztata tumorból származó sejtekbe (55) való bevitelénél. Az általunk létrehozott klónban létrejövõ sejtosztódás gátlás azonban sokkal kifejezettebb, mint az irodalomban leírt eseteknél. A sejtciklus vizsgálata során megállapítottuk, hogy már 24 óra múlva jelentôs változások történtek: az S fázisban lévõ sejtek aránya 34%-ról kb. 6%-ra csökken. Két nap múlva az S fázisú sejtek aránya 3% alá esik (kb. 44 óra, az optimális körülmények között növõ MCF7 és MCF7-AR1 sejtek megkettõzõdésének ideje). Az androgén specificitást mutatja az is, hogy anti-androgének gátolták az androgének hatására bekövetkezõ sejtosztódás gátlást, más szteroid hormonok pedig nem váltották ki ezt a jelenséget. Az androgének által indukált sejtosztodás gátlás domináns volt az ösztrogének által okozott sejtosztódás aktiválás felett, ha a sejteket CDFBS jelenlétében növesztettük.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az egyetemi doktori dolgozat célja egy az akkoriban alkalmazott liposzómás módszereknél hatékonyabb, de a liposzómákon alapuló módszer kidolgozása volt. A liposzómák ugyanis változtathatók kémiai komponenseiket illetõen (ezáltal tulajdonságaik szabályozhatók), ezért nagy reményeket fûztek hozzájuk, mint a transzfekcióban használatos anyagokhoz. Azáltal, hogy kidolgoztunk egy olyan eljárást, amikor a fehérjébe beburkolt (elõször fágot, majd késõbb a protaminnal komplexet képezõ plazmidot használva) DNS-t használtunk a liposzómába zárásra, megnöveltük a módszer lehetõségeit; több DNS-t, hosszabb gént ill. géneket lehetett, a létezõ módszereknél jóval nagyobb hatékonysággal liposzómába zárni. Ennek eredménye az volt, hogy nõtt a szövettenyésztett sejtek transzfekciójának hatékonysága, ill. a nehezen transzfektálható sejteknél is sikerrel lehetett próbálkozni. A fágok alkalmazása a LUV-ba zárás útján azt mutatta, hogy a bevitt DNS kevésbé rendezõdik át, alacsonyabb kópiaszámban kerül a sejtekbe, mint a Ca-foszfát módszer esetében, ezért a bevinni kívánt gének kifejezõdése jobban szabályozható. A domináns markergént tartalmazó lgtWESneo fág, a hagyományos Ca-foszfát-DNS koprecipitációs módszerrel felhasználható volt, valószínûleg nagy mérete és a lambda DNS végein lévõ ragadós végek miatt, a feltételezett humán centromer eredetû szekvenciák egér sejtekbe juttatására, aminek eredményeképpen minikromoszómák jöttek létre. A LUV liposzómák ikrákhoz való affinitása valószínûleg szerepet játszott abban, hogy a kifejlõdõ lárvák jelentõs részében tudtuk mérni a bevitt marker gének aktivitását. A LUV liposzómák mezõgazdasági jelentõsége így a jövõben is elképzelhetõ. Az egyre jobban fejlõdõ hal-genetika is hasznát tudja venni a nagy hatásfokú tranziens transzfekciónak az új gének vizsgálatánál. A módosított neomicin-foszfotranszferáz aktivitás méréssel gyorsan és olcsón

vizsgálhatók a transzfektált sejtek, ill. transzgenikus állatok, növények.

A szervezeten belül lezajló bonyolult változások vizsgálata egyszerûbbé tehetõ, ha megfelelõen választott szövettenyésztett sejteket használunk, mint modell rendszert. A nemi hormonok a szervezetben többféleképpen befolyásolják a célszöveteikben lévõ sejtek állapotát. Az androgének és ösztrogének egyik fontos szerepe az, hogy a sejtszámot változtatják az élõ egyed szükségleteinek megfelelõen. Feltételezhetõ, hogy a hormonoknak nemcsak a jelenléte, hanem a koncentrációja is fontos ezen szabályozás szempontjából. Az LNCaP sejtekbõl, amelyeknél magas koncentrációjú androgénnel leállítottuk a sejtosztódást, klónoztunk olyan most (már részben ismert) szekvenciákat, amelyeknek lehetséges, hogy az a funkciójuk, hogy részt vesznek az androgének által indukált sejtosztódás gátlásban. Mindenesetre ezen szekvenciák viselkedése magas androgén koncentráció jelenlétében arra utal, hogy a sejtosztódás gátlás inkább a transzkripció aktiválásán, mintsem csökkenésén alapul. Valószínûleg az androgén receptor mellett más transzkripciós faktorok is szükségesek, hogy az adott gének transzkripciója magasabb hormon koncentrációnál induljon be, mint pl. a PSA vagy a pS2 géneké. A különbözõ LNCaP és MCF7 sejt variánsoknál igazoltuk, hogy az a magasabb hormon koncentráció, amely a sejtosztódás gátlását kiváltja, nem csökkenti az androgén ill. ösztrogén receptor aktiválhatóságát, mind a kivülrõl bevitt, mind a sejt saját génjei esetében. Ugyanakkor lehetséges, hogy a nemi hormonok által szabályozott sejtosztódás esetében nem a hormon receptor, hanem más elemek alkalmazkodnak, akár reverzibilis módon is, mint pl. az MCF7 variánsok esetében, ahol kétszeri szelekció után visszajött az eredeti fenotípus. Az androgén receptor bevitelével MCF7 sejtekbe, sikerült igazolni az androgén receptor szerepét az androgének által kiváltott sejtosztódás gátlásában.

A TÉZISEKHEZ FELHASZNÁLT SZAKIRODALOM

1/ Kondorosi, E. and Duda, E. /1980/ Introduction of foreign genetic material into cultured mammalian cells by liposomes loaded with isolated nuclei. FEBS Lett. 120: 37-40.

2/ Somlyai, G., Kondorosi, E., Kariko, K., Duda, E. /1985/ Liposome mediated DNA-transfer into mammalian cells. Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 20: 203-212.

3/ Graham, F.L. and van der Eb, A.J. /1973/ A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology 52: 456-467.

4/ Wigler, M.S., Silverstein, S., Lee, L.S., Pellicer, A., Cheng, T., Axel, R. /1977/ Transfer of purified Herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. Cell 11: 223-232.

5/ Bangham, A.D., Standish, M.M., Watkins, J.C. /1965/ Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phopholipids. J. Mol. Biol. 13: 238-252.

6/ Straubinger, R.M. and Papahadjopoulos, D. /1983/ Liposomes as carriers for intracellular delivery of nucleic acids. Meth. Enzymol. 101: 512-527.

7/ Deshayes, A., Herrera, L. and Caboche, M. /1985/ Liposome-mediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts by an *Escherichia coli* plasmid. EMBO J. 4: 2731-2737.

8/ Folch, J. /1942/ Brain cephalin, a mixture of phosphatides. Separation from it of phosohatidyl serine, phosphatidol ethanol-amine and a a fraction containing an inositol phosphatide. J. Biol. Chem. 146: 35-44.

9/ Papahadjopoulos, D., Vail, W.J., Jacobson, K. and Poste, G. /1975/ Cochleate lipid cylinders: Formation by fusion of unilamellar vesicles. BBA 394: 483-491.

10/ Szoka, F. and Papahadjopoulos. D. /1978/ Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4194-4198.

11/ Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. /1982/ Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

12/ Commerford, S.L. /1971/ Iodination of nucleic acids *in vitro*. Biochemistry 10: 1993-2000.

13/ Hunter, W. and Greenwood, F. /1964/ A radio-immunoelectrophoretic assay for human growth hormone. Biochem. J. 91: 43-51.

14/ Southern, P.J. and Berg, P. /1982/ Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. J. Mol. Appl. Genet. 1: 327-341.

15/ Colbere-Garapin, F., Horodniceanu, F., Kousilski, P., Garapin, A.-C. /1981/ A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. J. Mol. Biol. 150: 1-14.

16/ Leder, P., Tiemeier, D., Enquist, L. /1977/ EK2 derivatives of bacteriophage lambda useful in the cloning of DNA from higher organism: the lambda gtWES system. Science 196: 175-17.

17/ De Jonge, A.J.R. and Bootsma, D. /1984/ Chromosome and DNA mediated gene transfer in cultured mammalian cells. Int. Rev. Cytol. 92: 133-158.

18/ Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P.H. /1982/ Liposomes as gene carriers: Efficient transformation of mouse L cells by thymidine kinase gene. Science 215: 166-168.

19/ Durman, D.M., Perrin, F., Gannon, F. and Palmiter, R.D. /1980/ Isolation and characterization of the mouse metallothionein gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6511-6515.

20/ Gorman, C.F., Moffat, L.F. and Howard, B.H. /1982/ Recombinant genes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 2: 1044-1051.

21/ Bosze, ZS., Thiesen, H.J. and Charnay, P. /1986/ A transcriptional enhancer with specificity for erythroid cells is located in the LTR of Friend murine leukemia virus. EMBO J. 5: 1615-1623.

22/ Mulligan, R.C., Berg, P. /1980/ Expression of a bacterial gene in mammalian cells. Science 209: 1422-1427.

23/ Grand, C.G., Gordon, M. and Cameron, G. /1941/ Neoplasm studies VII. Cell types in tissue culture of fish melanotic tumours compared with mammalian melanomas. Cancer Res. 1: 660-666.

24/ Holtfreter, J. /1931/ Uber die isolierterTeile des Amphibien-keimes. 11. Zuchtung von Keimen und Keimteilen in Salzosung. Wilhelm Roux'Arch. Entwickl. Org. 124: 404-466.

25/ Reiss, B., Sprengel, R., Will, H. and Schaller, H. /1984/ A new sensitive method for qualitative and quantitative assay of neomycin phosphotransferase in crude cell extracts. Gene 30: 211-218.

26/ Cabanes-Bastos, E., Day, A.G. and Lichtenstein, C.P. /1989/ A sensitive and simple assay for neomycin phosphotransferase II activity in transgenic tissue. Gene 77: 169-176.

27/ Platt, S.G. and Yang, N.S. /1987/ Dot assay for neomycin phosphotransferase activity in crude cell extracts. Anal. Biochem. 162: 529-535.

28/ McDonell, R.E., Clark, R.D., Smith, W.A. and Hinchee, M.A. /1987/ A simplified method for the detection of neomycin phosphotransferase II activity in transformed plant tissues. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 380-386.

29/ Haas, M.J. and Dowding, J.E. /1975/ Aminoglycoside-modifying enzymes. Methods in Enzymology (Hash, J.H., Ed.), 43: 611-633, Academic Press, New York.

30/ Hadlaczky, Gy., Praznovszky, T., Rasko, I., Kereso, J. /1989/ Centromere proteins. I. Mitosis specific centromere antigen recognized by anti-centromere autoantibodies. Chromosoma 97: 282-288.

31/ Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Chu, T.M., Mirand, E.A., Murphy, G.P. /1983/ LNCaP model of human prostatic carcinoma cell line LNCaP and its derivatives. An overview. Urol. Res. 17: 71-77.

32/ Soule, H.D., Vasquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M.J. /1973/ A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J. Natl. Cancer Inst. 51: 1409-1413.

33/ Sonnenschein, C., Olea, N., Pasanen, M.E., Soto, A.M. /1989/ Negative controls of cell proliferation: human prostate cancer cells and androgéns. Cancer Res. 49: 3474-3481.

34/ Soto, A.M., Sonnenschein, C. /1985/ The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7). J. Steroid Biochem. 23: 87-94.

35/ Bruchovsky, N., Lesser, B., Van Doorn, E., Craven, S. /1975/ Hormonal effects on cell proliferation in rat prostate. Vitam. Horm. 33: 61-102.

36/ Wiklund, J., Wertz, N., Gorski, J. /1981/ A comparison of estrogen effects on uterine and pituitary growth and prolactin synthesis in F344 and Holtzman rats. Endocrinology 109: 1700-1707.

37/ Lin, T.M., Sonnenschein, C., Soto, A.M. /1991/ Proliferative patterns of androgen-resistant human prostate cell variants. Program of the 73rd Annual Meeting of The Endocrine Society, Washington DC, pg. 168 (Abstract).

38/ Soto, A.M., Lin, T.M., Sakabe, K., Olea, N., Damassa, D.A. and Sonnenschein, C. /1995/ Variants of the human prostate LNCaP cell line as tools to study discrete components of the androgen-mediated proliferative response. Oncology Res. 7: 545-558.

39/ Sonnenschein, C., Szelei, J., Nye, T.L. and Soto, A.M. /1994/ Control of cell proliferation of human breast MCF7 cells; Serum and estrogen resistant variants. Oncology Res. 6: 373-381.

40/ Chang, C., Kokontis, J., Liao, S. /1988/ Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7211-7215.

41/ Qui, S., Young, C.Y.F., Bilhartz, D.L., Prescott, J.L., Farrow, G.M., He, W.W. and Tindall, D.J. /1990/ *In situ* hybridization of prostate-specific antigen mRNA in human prostate. J. Urol. 144: 1550-1556.

42/ Tora, L., Mullick, A., Metzger, D., Poglikitmongkol, M., Park, I. and Cambon, P. /1989/ The cloned human oestrogen receptor contains a mutation which alters its hormone binding properties. EMBO J. 8: 1981-1986.

43/ Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J.R. and Chambon, P. /1987/ Functional domains of the human estrogen receptor. Cell 51: 941-951.

44/ Masiakowski, P., Breathnach, R., Bloch, J., Gannon, A., Krust, A. and Chambon, P. /1982/ Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. Nucleic Acid Res. 10: 7895-7902.

45/ Wang, Z., Brown, D.D. /1991/ A gene expression screen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 11505-11509.

46/ Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. /1989/ Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

47/ Gorman, C.M., Rigby, P.W., Lane, D.P. /1985/ Negative regulation of viral enhancers in undifferentiated embrionic stem cells. Cell 42: 519-526.

48/ Schiaffino, M.W., Bassi, M.T., Galli, L., Renieri, A., Bruttini, M., De Nigris, F., Bergen, A.A., Charles, S.J., Yates, J.R. et al. /1995/ Analysis of the OA1 gene reveals mutation only one-third of patients with x-linked ocular albinism. Hum. Mol. Gen. 4:2319-2325.

49/ Couch, F.J., Rommens, J.M., Neuhausen, S.L., Belanger, C., Dumont, M., Abel, K., Bell, R., Berry, S. et al. /1996/ Generation of an integrated transcription map of the BRCA2 region on chromosome 13q12-q13. Genomics 36: 36-86-99.

50/ Cleton-Jansen, A.M., Collins, N., Lakhani, S.R., Weissenbach, J., Devilee, P., Cornelisse, C.J. and Stratton, M.R. /1995/ Loss of heterozygosity in sporadic breast tumours at the BRCA2 locus on chromosome 13q12-q13. Br. J. Cancer 72: 1241-1244.

51/ Gudmundsson, J., Johannesdottir, G., Bergthorsson, J.T., Arason, A., Ingvarson, S., Egilsson, V. and Barkadottir, R.B. /1995/ Cancer Res. 55: 4830-4832.

52/ Garcia-Marco, J.A., Caldas, C., Price, C.M., Wiedemann, L.M., Ashworth, A. and Catovsky D. /1996/ Frequent somatic deletion of the 13q12.3 locus encompassing BRCA2 in chronic lymphocytic leukemia. Blood 88: 1568-1575.

53/ van der Berg, J., Johansson, O., Hakansson, S., Olsson, H. and Borg, A. /1996/ Allelic loss at chromosome 13q12-q13 is associated with poor prognosis in familial and sporadic breast cancer. Br. J. Cancer 74: 1615-1619.

54/ Jiang, S.Y., Jordan, V.C. /1992/ Growth regulation of estrogen-receptor negative breast cancer cells transfected with cDNSs for estrogen receptor. J. Natl. Cancer Inst. 84: 580-591.

55/ Yuan, S., Trachtenberg, J., Mills, G.B., Brown, T.J., Xu, F., Keating, A. /1993/ Androgen-induced inhibition of cell proliferation in an androgen-insensitive prostate cancer cell line (PC-3) transfected with a human androgen receptor complementary DNA. Cancer Res. 53: 1304-1311.

A TÉZISEKHEZ FELHASZNÁLT SAJÁT PUBLIKÁCIÓK

Tezis I.

1/ Szelei, J. and Duda, E. /1989/ Entrapment of high-molecular-mass DNA molecules in liposomes for the genetic transformation of animal cells. Biochem. J. 259: 549-553.

2/ Szelei, J. and Duda, E. /1989/ Efficient transformation of animal cells with liposomes of high DNA density. Biol. Zent. bl. 108: 25-29.

3/ Nagy DNS tartalmú liposzómák kifejlesztése eukarióta sejtek hatékony transzformációjára (egyetemi doktori értekezés /1989/; készítette: Szelei József)

Tezis II.

1/ Hadlaczky, Gy., Praznovszky, T., Cserpan, I., Kereso, J., Peterfy, M., Kelemen, I., Atalay, E., Szeles, A., Szelei, J., Tubak, V. and Burg, K. /1991/ Centromere formation in the mouse cells cotransformed with human DNA and a dominant marker gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8106-8110.

2/ Szelei, J., Szlanka, T. and Duda, E. /1992/ Detection of the neo^r gene expression in animal cells after genetic transformation. Anal. Biochem. 203: 166-168.

3/ Szelei, J., Varadi, L., Muller, F., Erdelyi, F., Orban, L., Horvath, L. and Duda, E. /1994/ Liposome-mediated gene transfer in fish embryos. Transgenic Res. 3: 116-119.

Tezis III.

1/ Sonnenschein, C., Szelei, J., Nye, T.L. and Soto, A.M. /1994/ Control of cell proliferation of human breast MCF7 cells; Serum and estrogen resistant variants. Oncology Res. 6: 373-381.

2/ Geck, P., Szelei, J., Jimenez, J., Soto, A. and Sonnenschein, C. /1996/ Androgen induced proliferative shutoff in prostate cancer cells. Program of the 87th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington DC, pg. 223, #1524 (abstract).

3/ Szelei, J., Jimenez, J., Soto, A.M., Luizzi, M.F. and Sonnenschein C. /1997/ Androgen-induced inhibition of proliferation in human breast cancer MCF7 cells transfected with androgén receptor. Endocrinology 138: 1406-1412.