

B 3626



*Bachrati Csanád:*

## **Sejtciklus ellenőrzőpontok vizsgálata malignusan transzformált rágcsálósejteken**

*Ph.D. értekezés tézisei*

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

1999.

## Tartalomjegyzék

1 Elméleti áttekintés.....	3
2 Célkitűzések.....	5
3 Alkalmazott módszerek.....	6
4 Eredmények.....	6
4.1 A REVERZ TRANSZFORMÁCIÓ HATÁSAI A GÉNEXPRESSZIÓRA .....	6
4.2 A REVERZ TRANSZFORMÁCIÓ HATÁSAI A SEJTCIKLUS ELLENŐRZŐPONTJAIRA .....	9
4.3 ONKOGÉNEK TÚLTERMELTETÉSÉNEK HATÁSAI A SEJTCIKLUS ELLENŐRZŐPONTJAIRA .....	10
4.3.1 <i>Onkogén túltermeltetésére alkalmas expressziós plazmidok építése, és stabil túltermelő sejtvonalak létrehozása.....</i>	10
4.3.2 <i>Az onkogének túltermeltetésének hatása a reverz transzformálhatóságra .....</i>	10
4.3.3 <i>A reverz transzformáció és az onkogének túltermeltetésének hatása az S és M fázisos ellenőrzőpont működésére.....</i>	10
4.4 A TRANSZFORMÁLT RÁGCSÁLÓSEJTEK SEJTCIKLUS ELLENŐRZŐPONTJAINAK HIBÁJÁT SZOMATIKUS SEJTHIBRIDEK BEN EGYES HUMÁN KROMOSZÓMÁK JELENLÉTE KOMPLEMENTÁLJA .....	11
5 Köszönetnyilvánítás.....	12
6 Idézett irodalom.....	13
7 Az értekezéshez kapcsolódó publikációk.....	15
7.1 KÖZLEMÉNYEK .....	15
7.1.1 <i>Poszterek.....</i>	15
7.1.2 <i>Előadások.....</i>	15
8 Az értekezés tárgyához nem kapcsolódó egyéb publikációk.....	16
8.1 KÖZLEMÉNYEK .....	16
8.1.1 <i>Poszterek.....</i>	16
8.1.2 <i>Előadások.....</i>	17

## 1 ÉLMÉLETI ÁTTEKINTÉS

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

A sejtciklus ellenőrzőpontokhoz kapcsolódó szabályozási mechanizmusok végső effektor molekulái a ciklin dependens protein kinázok [1,2]. A  $G_2$  fázisból mitózisba történő belépést a  $p34^{cdc2}$  kináz aktivitásának megemelkedése indítja be. A  $p34^{cdc2}$  az S fázis során a ciklin A, míg a ciklus későbbi fázisaiban a ciklin B regulátor alegységgel kapcsolódik. Ez utóbbi ciklin az S fázis végén illetve a  $G_2$  fázisban szintetizálódik. Szomatikus sejtekben mindkét ciklin működése szükséges a mitózisba való belépéshez. A  $p34^{cdc2}$  kináz regulációja négy szinten valósul meg: regulátor ciklin alegységek kötődése általi aktivációval; aktiváló és inaktíváló foszforilációval valamint inhibitor fehérjék kötődése következtében kialakuló gátlással. A sejtciklus ellenőrzőpontok által közvetített szignál a mitózis gátlását elsősorban a  $p34^{cdc2}$  inhibitor foszforilációján keresztül feje ki [3-6], bár más, közvetett mechanizmusok is szerepelhetnek [7], például a ciklin B szintézis szabályozásán keresztül [8]. Az egyes sejtciklus ellenőrzőpontok

működésében részt vevő fehérjék és a szabályozás összefüggései azonban jórészt felderítetlenek.

Malignusan transzformált rágcsősejteket a ciklikus AMP (cAMP) metabolizmust befolyásoló kémiai ágensekkel kezelve a transzformált fenotípus morfológiai, fiziológiai és biokémiai reverziója váltható ki, amely a drogok elvonása után eltűnik, tehát reverzibilis. A jelenséget Hsie és Puck írta le 1971-ben a laboratóriumukban előzőleg izolált CHO-K1 kínai hörcsög ovárium sejtvonal dibutilil-ciklikus-AMP ( $Bt_2cAMP$ ) és tesztoszteron kezelésre bekövetkező reverz transzformációjaként [9]. Azóta számos más sejtvonal reverz transzformálásával is sikerrel próbálkoztak [10-21], hozzájárulva a cAMP dependens protein kináz rendszer, a malignus transzformáció és sejt differenciáció közötti összefüggések felderítéséhez.

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

A jelentős morfológiai és fiziológiai változások molekuláris háttere még eléggé feltáratlan, és nagyrészt más rendszerekből kapott adatok interpretációján alapul.  $Bt_2cAMP$  kezelés hatására a ciklikus nukleotid foszfo-diészteráz (PDE) [22], az ornitin dekarboxiláz [23-25] és transzglutamináz [26] enzimaktivitása emelkedik. Májban [27] és H4-II-E sejtekben [28] a foszfoenol-piruvát karboxikináz, a máj tirozin aminotranszferáz [29], egér L sejtekben az alkalikus foszfatáz [30], C6 glióma sejtekben a laktát dehidrogenáz [31], CHO sejtekben az ornitin dekarboxiláz, a PDE, az I-es típusú kollagén [9], a fibronectin [32,33] és az aktin [34] génjének transzkripci-

onális aktiválását írták le. Ezzel párhuzamosan a nukleáris DNS érzékenyebbé válik a DNáz I emésztésre [19,35-37]. Ezen enzim- és génaktivitás változások azonban nem elégségesek a reverz transzformáció kísérő jelenségek magyarázatához, a malignus transzformációval közvetlen kapcsolatba hozható aktivitás változások mindenképpen várhatók.

## 2 CÉLKITŰZÉSEK

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

1. A normál humán és normál rágszálósejtek (primer fibroblasztok, vagy akár immortalizált fibroblasztok) sejtciklus ellenőrző pontjai épek, a sejtek válasza a vizsgált technikákkal teljesen normálisnak tekinthető.
2. A legtöbb transzformált humán sejt sejtciklus ellenőrző pontjai épek. Egy-egy ellenőrzőpont vonatkozásában azonban lehetnek kivételek [38].
3. A legtöbb transzformált rágszálósejt sejtciklus ellenőrzőpontjai hibásak. Egy-egy sejt vonal azonban egyes ellenőrzőpontok helyes működését mutatja.

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

4. Melyek lehetnek azok az onkogének, tumor szupresszorok vagy sejtciklus szabályozó faktorok, amelyek megváltozott működése a CHO sejtek transzformációját, sejtciklus szabályozásának megváltozását okozta?

5. A CHO sejtek reverz transzformálása hogyan befolyásolja az S és M fázisos ellenőrzőpont működését?
6. Lehet-e befolyásolni a CHO sejtek sejtciklus ellenőrzőpont szabályozásának sajátosságait egyes onkogének túlermelletésével? Befolyásolja-e a túlermelletés a reverz transzformáció képességét és a morfológiát?
7. Lehet-e olyan CHO/humán szomatikus hibridsejtet találni, amelyben az S és M fázisos ellenőrzőpontok működése helyreállt?

### 3 ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

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

### 4 EREDMÉNYEK

#### 4.1 A REVERZ TRANSZFORMÁCIÓ HATÁSAI A GÉNEXPRESSZIÓRA

2, 3, 8 és 15 napig reverz transzformáltatott; újratranszformált; csak Bt<sub>2</sub>cAMP-al kezelt; csak tesztoszteronnal kezelt; valamint kezeletlen kont-

roll CHO-K20 sejtekből származó minták Northern blott vizsgálatában sikerült kimutatnunk a *c-jun* és a *c-src* onkogének kifejeződését, azonban ezek expresszsiója a reverz transzformáció során nem változott. *v-sis*, *v-ERB-B* és *wnt1* próbákkal nem sikerült expressziót detektálnunk.

A reverz transzformáció során bekövetkező génexpressziós mintázatbeli változások kimutatásához a Northern blott hibridizációs kísérletek nem bizonyultak elég hatékonyak. Az irodalomban erre többféle módszert írtak le, ezek közül a mi rendszerünkre a *differential display* [39,40] látszott a legkönnyebben alkalmazhatónak. Részleges *differential display* kísérletsorozatunk 69 az intenzitásban, és ezzel a génexpresszióban változást mutató cDNS fragmentumot eredményezett. Ezekből 39-et ellenőriztünk Northern blott hibridizációban; kezeletlen, csak tesztoszteron kezelt, csak Bt<sub>2</sub>cAMP kezelt és teljesen reverz transzformált RNS mintákon. Ezekből 8 bizonyult olyan cDNS fajtának, amelyek expressziós változást mutató mRNS fajtákat detektálnak. A cDNS fragmentumokat Northern blott-ban újból leellenőrizve 4 klónozott fragment detektált szignifikáns expresszióváltozást mutató RNS fajtát.

A **K7C3** szekvencia a patkány 40S riboszómális alegység S18 jelű fehérjéjével mutat homológiát (EMBL *accession no.* X57529). A detektált mRNS mennyisége jelentősen lecsökken a reverz transzformáció során. E csökkenés a fehérjeszintézis általános intenzitáscsökkenésével magyarázható. Korai trofoblasztokban, amelyek sok tulajdonságukban a transzformált sejtekre hasonlítanak, az S18 fehérje magas expresszióját mutatták ki [41], hasonlóan egyes prosztatarák sejtekhez [42].

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

is a normál sejtekéhez hasonlít, amennyiben a glükolízissal szemben az oxidatív foszforilációt részesítik előnyben [43-45].

Az **R7A** klón 73 %-os homológiát mutat a p27<sup>BBP/aiF6</sup> fehérjét kódoló cDNS szekvenciával. mRNS-ének szintje a reverz transzformáció során megemelkedik. A p27<sup>BBP/aiF6</sup> fehérje meglepő módon két, egymástól meglehetősen távolálló funkciót lát el. Evolúciósan konzervált funkciója a szabad 60S riboszómális alegység *steady state* szintjének fenntartása [46]. Feladata ennek megfelelően, a reverz transzformáció során tapasztalható alacsonyabb intenzitású fehérjeszintézis következtében megemelkedett mennyiségű szabad 60S riboszómális alegység megkötése lenne. Ennek azonban komolyan ellentmond, hogy a hízósejtek indukciója során is megemelkedik a szintje, mely folyamat viszont a fehérjeszintézis intenzitásának emelkedésével jár [47,48]. Epiteiális eredetű sejtvonalakban a p27<sup>BBP/aiF6</sup> fehérje erős és specifikus kölcsönhatásba lép a  $\beta 4$  integrin citoplazmatikus alegységével, és az intermediate filament citoskeletonnal [49,50], ami az intermediate filament citoskeleton és a hemidezmoszómák közötti kapcsolatok létrehozásában játszott szerepére utal. Úgy gondoljuk, hogy egy hemidezmoszómális integrin kötő fehérje, amelynek citoplazmatikus és magi jelenlétét is leírták, a reverz transzformáció számos jelenségéhez aktívan hozzájárulhat.

A **K7C2** cDNS fragmentum a humán 7-es kromoszóma 7q21-q22 -es régiójába eső, 130 kbp -os szekvenciában mutatott homológiát. Erre a régióra több *expressed sequence tag* (EST) is térképeződik, amelyek segítségével egy feltételezett gén kódoló szekvenciáit lehetett összeállítani. A teljes cDNS szekvenciát nemrég közzölték, az a *ras* családba tartozó Krev-1/rap1a GTPáz fehérje interakciós partnerét, a Krit1-et kódolja [51]. A Krev-1/rap1a fehérjéről az irodalom valószínűsíti, hogy maga is tumor szupresszor, bár az egyes vélemények eltérnek [51-62]. A Krit1 viszont olyan citológiai régióba esik, amelyről kimutatták hogy valószínűleg tumor szupresszor gént hordoz



[63]. Itt kapott eredményeink az első bizonyítékai annak, hogy a 7q21-q22 régióba eső tumor szupresszor gén a Krit1 [64].

## **4.2 A REVERZ TRANSZFORMÁCIÓ HATÁSAI A SEJTCIKLUS**

### **ELLENŐRZŐPONTJAI**

Izoleucin éheztetéssel késői  $G_1$  fázisra előszinkronizált sejteket blokkoltunk S fázisban hidroxürea, vagy afidikolin kezeléssel legalább 18 óra hosszan. Ez a kezelés egyes sejtek sejtciklusát a  $G_2$ -nek megfelelő állapotra állítja be, holott a DNS szintézis blokkolása miatt a replikáció nem játszódhatott le. A maradék sejtciklus kontroll ezt követően koffein kezeléssel könnyen tönkretethető, a sejtek korai kromoszómakondenzációba kezdenek, végzetes következményekkel [65]. Az S fázisos ellenőrzőpont ezen hibája csak transzformált rágszálósejtekben (BHK-21, CHO, 10a2b) jelenik meg, a normál rágszálósejtekben (pl. primer fibroblasztok, 3T3), illetve az összes vizsgált humán sejtben (293, AT5BIVA, HeLa) működése normális. A reverz transzformációval párhuzamosan az S fázisos ellenőrzőpont integritása helyreáll.

A sejtciklus hosszan tartó blokkolása metafázisban a mikrotubulusok szerveződését befolyásoló ágensekkel (kolhicin, kolcemid, nokodazol, taxol,  $N_2O$ ) egyes sejteknél abortív mitózishoz vezet: a sejtek az anafázis, telofázis és citokinézis kihagyásával kilépnek  $G_1$  fázisba, miközben ploidiá-fokuk megkétszereződik. Ez minden transzformált rágszálósejtre és néhány humán vonalra is jellemző [66]. Az S fázisos ellenőrzőpont kísérletekhez hasonlóan megvizsgáltuk, hogy a reverz transzformációnak van-e hatása az M fázisos ellenőrzőpont működésére. Azt találtuk, hogy a reverz transzformáció a mitotikus ellenőrzőpont működését nem állítja helyre.

## **4.3 ONKOGÉNEK TÚLTERMELTETÉSÉNEK HATÁSAI A SEJTCIKLUS**

### **ELLENŐRZŐPONTJAIRA**

#### **4.3.1 Onkogén túltermeltetésére alkalmas expressziós plazmidok építése, és stabil túltermelő sejtvonalak létrehozása**

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

#### **4.3.2 Az onkogének túltermeltetésének hatása a reverz transzformálhatóságra**

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

#### **4.3.3 A reverz transzformáció és az onkogének túltermeltetésének hatása az S és M fázisos ellenőrzőpont működésére**

A reverz transzformáció hatásával ellentétes változást reméltünk az onkogének három csoportját reprezentáló modell onkogének túltermeltetésétől. A *src* onkogén túltermeltetése valóban fokozta a hosszantartó DNS szintézis blokk és koffein kezelés hatására bekövetkező mitotikus katasztrófát. A

koffeinnel nem kezelt, csak DNS szintézis blokk alatt tartott sejtekben is magasabb a spontán mitotikus katasztrófát mutató sejtek aránya. A *wnt1* onkogén túltermeltetésével ugyanakkor az S fázisos ellenőrzőpontot olyan hatás éri, melynek következtében a mitotikus katasztrófát mutató sejtek aránya alacsonyabbá válik. A *jun* onkogén az S fázisos ellenőrzőpontra nincs hatással. A *c-src* koffein indukálta korai kromoszómakondenzációt moduláló hatása nem meglepő: a pp60<sup>src</sup> a p34<sup>cdc2</sup> mitotikus kináz foszforilációs targetje [67]; a *src* család kinázairól tudott, hogy a mitózisba való belépéshez szükségesek [68]. A *wnt1* ellentétes hatása már inkább meglepő. A *wnt* géncsalád tagjai az egyedfejlődés számos aspektusában szerepet játszanak [69], és úgy tűnik, hogy a CHO sejtekben normálisan nem expresszáldó *wnt1* az S fázisos ellenőrzőpont integritását egy differenciáltabb állapot felé tolja el anélkül, hogy a sejtek morfológiáját befolyásolná. Ez egybeesik azzal a megfigyeléssel, hogy a *wnt1* expressziója megemelkedik differenciálódó sejtekben [70]. A mitotikus ellenőrzőpont működésére egyik onkogén deregulált kifejeztetése sem volt hatással.

#### **4.4 A TRANSZFORMÁLT RÁGCSÁLÓSEJTEK SEJTCIKLUS**

##### **ELLENŐRZŐPONTJAINAK HIBÁJÁT SZOMATIKUS SEJTHIBRIDEKBEK EGYES**

##### **HUMÁN KROMOSZÓMÁK JELENLÉTE KOMPLEMENTÁLJA**

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

## 5 KÖSZÖNETNYLVÁNTÁS

Eddigi pályafutásom, a dolgozat megírása és a hozzá kapcsolódó kísérletek elvégzése során nyújtott segítségükért hálás köszönettel tartozom:

Raskó Istvánnak, aki csoportvezetőként megteremtette a csoportban folyó munkák anyagi hátterét, és tudományosan összefogta a sokszor ropant szerteágazó munkát,

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

Lehócz Istvánné és Radóné Dudás Mária asszisztenseknek,

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

Hadlaczky Gyulának, hogy a monoszómikus sejtvonalatok rendelkezésünkre bocsátotta,

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

Páy Anikónak és Kószó Zsuzsának a cDNS klónok szekvenálásáért,

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

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

Munkánkat az Európai Közösség **INCO-COPERNICUS CIPA-CT93-0259** és az OTKA F 019961 számú pályázatai támogatták.

## 6 | DÉZETT IRODALOM

1. Nurse, P. (1994). *Cell* **79**: 547-550.
2. Murray, A. W. (1995). *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**: 5-11.
3. Poon, R. Y. C., *et al* (1996). *J. Biol. Chem.* **271**: 13283-13291.
4. Barth, H., *et al* (1996). *Cancer Res.* **56**: 2268-2272.
5. O'Connell, M. J., *et al* (1997). *EMBO J.* **16**: 545-554.
6. Rhind, N., *et al* (1997). *Genes Dev.* **11**: 504-511.
7. Jin, P., *et al* (1996). *J. Cell Biol.* **134**: 963-970.
8. Kao, G. D., *et al* (1997). *Cancer Res.* **57**: 753-758.
9. Hsie, A. W., *et al* (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 358-361.
10. Puck, T. T., *et al* (1981). *J. Cell. Physiol.* **107**: 399-412.
11. Gabrielson, E. G., *et al* (1982). *Exp. Cell Res.* **142**: 63-68.
12. Rajaraman, R., *et al* (1984). *Exp. Cell Res.* **154**: 342-356.
13. Clair, T., *et al* (1987). *FEBS Lett.* **224**: 377-384.
14. Trepel, J. B., *et al* (1987). *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2644-2648.
15. Tagliaferri, P., *et al* (1988). *J. Biol. Chem.* **263**: 409-416.
16. Felder, C. C., *et al* (1989). *FEBS Lett.* **245**: 75-79.
17. Bunn, P. A., *et al* (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2162-2166.
18. Biedler, J. L., *et al* (1994). *Cancer Metastasis Rev.* **13**: 191-207.
19. Haag, M. M., *et al* (1994). *Cancer Invest.* **12**: 33-45.
20. Tigyi, G., *et al* (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 1908-1912.
21. Estival, A., *et al* (1996). *Biochem. J.* **315**: 619-624.
22. Wells, J. N., *et al* (1977). *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **8**: 119-143.
23. Costa, M. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**: 832-840.
24. Meloni, M., *et al* (1980). *Exp. Cell Res.* **126**: 465-469.
25. Lichti, U., *et al* (1982). *J. Cell. Physiol.* **113**: 433-439.
26. Milhaud, P. G., *et al* (1980). *Biochim. Biophys. Acta* **630**: 476-484.
27. Beale, E. G., *et al* (1982). *J. Biol. Chem.* **257**: 2022-2028.
28. Chrapkiewicz, N. B., *et al* (1982). *J. Biol. Chem.* **257**: 14428-14432.
29. Ernest, M. J., *et al* (1978). *J. Biol. Chem.* **253**: 319-322.
30. Firestone, G. L., *et al* (1981). *J. Biol. Chem.* **256**: 1396-1403.
31. Derda, D., *et al* (1980). *J. Biol. Chem.* **255**: 11112-11121.
32. Kao, F.-T., *et al* (1967). *Genetics* **55**: 513-524.
33. Sterner, J. M., *et al* (1989). *Cell Biophys.* **15**: 159-171.
34. Miranti, C., *et al* (1990). *Somat. Cell Mol. Genet.* **16**: 67-78.
35. Ashall, F., *et al* (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3908-3912.
36. Puck, T. T., *et al* (1991). *Somat. Cell Mol. Genet.* **17**: 489-503.
37. Krystosek, A., *et al* (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6560-6564.
38. Cahill, D. P., *et al* (1998). *Nature* **392**: 300-303.
39. Liang, P., *et al* (1992). *Science* **257**: 967-971.
40. Liang, P., *et al* (1993). *Nucleic Acids Res.* **21**: 3269-3275.
41. Chassin, D., *et al* (1994). *Cancer Res.* **54**: 5217-5223.
42. Vaarala, M. H., *et al* (1998). *Int. J. Cancer* **78**: 27-32.
43. Warburg, O., *et al* (1924). *Biochem. Z.* **152**: 309-344.
44. Faure Vigny, H., *et al* (1996). *Mol. Carcinog.* **16**: 165-172.
45. Capuano, F., *et al* (1997). *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**: 379-384.
46. Si, K., *et al* (1999). *Mol. Cell. Biol.* **19**: 1416-1426.
47. Cho, S. H., *et al* (1998). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **252**: 123-127.

48. Cho, J. J., *et al* (1998). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**: 226-230.
49. Biffo, S., *et al* (1997). *J. Biol. Chem.* **272**: 30314-30321.
50. Sanvito, F., *et al* (1999). *J. Cell Biol.* **144**: 823-838.
51. Serebriiskii, I., *et al* (1997). *Oncogene* **15**: 1043-1049.
52. Su, Z. Z., *et al* (1993). *Oncogene* **8**: 1211-1219.
53. Bos, J. L., *et al* (1997). *FEBS Lett.* **410**: 59-62.
54. Kondoh, N., *et al* (1996). *Biochim. Biophys. Acta* **1313**: 41-46.
55. Beranger, F., *et al* (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 1606-1610.
56. Burney, T. L., *et al* (1994). *Prostate* **25**: 177-188.
57. Damak, S., *et al* (1996). *Mol. Carcinog.* **17**: 84-91.
58. Frech, M., *et al* (1990). *Science* **249**: 169-171.
59. Jelinek, M. A., *et al* (1992). *Oncogene* **7**: 1687-1698.
60. Kitayama, H., *et al* (1989). *Cell* **56**: 77-84.
61. Leach, S. D., *et al* (1998). *Pancreas* **16**: 491-498.
62. Young, J., *et al* (1992). *Cancer Res.* **52**: 285-289.
63. Luna-Fineman, S., *et al* (1995). *Blood* **85**: 1985-1999.
64. Bachrati, C., *et al* (1999). *Eur. J. Cell Biol.* **78**: 561-566.
65. Downes, C. S., *et al* (1990). *J. Cell Biol.* **110**: 1855-1859.
66. Kung, A. L., *et al* (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9553-9557.
67. Stover, D. R., *et al* (1994). *J. Biol. Chem.* **269**: 26885-26889.
68. Roche, S., *et al* (1995). *Science* **269**: 1567-1569.
69. Adamson, M. C., *et al* (1994). *Genomics* **24**: 9-13.
70. Raskó, I., *et al* (1993). *Somat. Cell Mol. Genet.* **19**: 245-255.

## 7 AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

### 7.1 KÖZLEMÉNYEK

- Bachrati, C.Z., Downes, C.S., Raskó, I. (1996) Cell cycle related differences of gene expression in malignant and reverse transformed CHO cells. *Cell Biol. Int.* 20: 227. Absztrakt.
- Bachrati, C., Downes, C. S. and Raskó, I. (1996) Transformation state related alterations of gene expression in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Biol. Cell* 7: 1002 Absztrakt.
- Downes, C. S.; Tommasino, M.; Bachrati, C.; Cutts, T. J. R.; Devlin, S. J.; Watson, J. V.; Raskó, I. and Johnson, R. T. (1999) Slippage of cell cycle control in S-phase arrest accompanies rodent cell transformation and is opposed by purine deoxyribonucleosides. *J. Cell Sci.* In Press
- Csanád Z. Bachrati, C. Stephen Downes, and István Raskó (1999) Chemical Reverse Transformation of CHO-K1 Cells Induces Changes in Expression of Genes Not Previously Characterised as Transformation-Related. *Eur. J. Cell Biol.* 78: 561-566.

#### 7.1.1 Poszterek

- Bachrati, C.Z., Downes, C.S., Raskó, I.: Malignus transzformáció függő génexpressziós változások kínai hőrcsőg ovárium sejtekben. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 2. Munkaértekezlete. Lillafüred, 1997. május 13-16.
- Pálmai-Pallag Tímea, Bachrati Csanád, C. Stephen Downes, Raskó István: Mitotikus ellenőrzőpont vizsgálatok normál és malignusan transzformált emlőssejtekben. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 3. Munkaértekezlete. Sárospatak, 1998. május 11-14.

#### 7.1.2 Előadások

- Bachrati, Cs., Downes, C.S., Raskó, I.: Sejteiklus ellenőrző-pont kontroll és a malignus transzformáció. Fiatal Magyar Kutató Gyermekegyógyászok 2. Kongresszusa. Szeged, 1996. március 22-23.
- Bachrati, Cs., Downes, C.S., Raskó, I.: Sejteiklus ellenőrző-pont kontroll és a malignus transzformáció. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 1. Munkaértekezlete. Seregélyes, 1996. április 16-18.
- Bachrati, C.Z.: Transformation dependent changes of gene expression in CHO cells. International Cell Research Organization Symposium on Modern Aspects of Cell Biology, Szeged, Hungary 22 July 1996.
- Pálmai-Pallag Tímea, Bachrati Csanád, C. Stephen Downes, Raskó István: Mitotikus ellenőrzőpont vizsgálatok normál és malignusan transzformált emlőssejtekben. VI Sejt és Fejlődésbiológiai Napok. Szeged, 1998 január 18-21.
- Bachrati C.Z., Downes C.S., Raskó I. Az S-fázis ellenőrzőpont a rágcsőssejtek transzformálódása során elvész. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 3. Munkaértekezlete. Sárospatak, 1998. május 11-14.

## 8 AZ ÉRTEKEZÉS TÁRGYÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

### 8.1 KÖZLEMÉNYEK

- Alföldi, L., Bachrati, Cs. (1993) Genetic experiments with model populations: Fallacies in genetic analysis performed from samples of recombinants selected for two markers. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 315-324.
- Bachrati, Cs., Dozin, B., Cancedda, R. and Kiss, I. (1994) Expression of cartilage specific link protein and cartilage matrix protein genes in differentiating chondrocytes. *Cell Biol. Int.* 18: 587. Absztrakt.
- Muratoglu, S., Bachrati, Cs., Deák, F., Kiss, I. (1994) Analysis of cartilage specific transcripts during chondrogenesis. *Cell Biol. Int.* 18: 439. Absztrakt.
- Kiss-Tóth, E., Unk, I., Bachrati, Cs., Czibula, Á. (1994) Regulation of the bovine leukemia virus basal transcription. *J. Cell. Biochem. Supplement* 18C: 48. Absztrakt.
- Muratoglu, S., Bachrati, Cs., Malpeli, M., Szabó, P., Neri, M., Dozin, B., Deák, F., Cancedda, R., Kiss, I. (1995) Expression of the cartilage matrix protein gene at different chondrocyte developmental stages. *Eur. J. Cell Biol.* 68: 411-418.
- Czibula, Á., Gerencsér, Á., Bachrati, C., Borda, S., Johnson, R. T., Raskó, I. (1996) Changes of DNA repair during *in vitro* cellular differentiation. *Cell Biol. Int.* 20: 220. Absztrakt.
- Deák, F., Piecha, D., Bachrati, C., Paulson, M., Kiss, I. (1997) Primary structure and expression of matrilin-2, the closest relative of cartilage matrix protein within the von Willebrand factor type A-like module superfamily. *J. Biol. Chem.* 272: 9268-9274.
- Bachrati, C.Z., Somodi, Z., Endreffy, E., Kalmár, T., Raskó, I. (1998) Carrier detection by microsatellite analysis of Duchenne/Becker muscular dystrophy in Hungarian families. *Ann. Hum. Genet.* 62(6): 511-520.
- Jakab, K.; Gárdián, G.; Endreffy, E.; Kalmár, T.; Bachrati, C.; Vécsei, L., Raskó, I. (1999) Analysis of CAG Repeat Expansion in Huntington's Disease Gene (IT 15) in a Hungarian Population. *Eur. Neurol.* 41(2): 107-110.
- Bachrati, C.Z., Pocsai, G and Raskó, I. (1999) RET/PTC fusion gene products in patients suffering from thyroid carcinomas. *Laryngoscope* 109: 1011-1015.

#### 8.1.1 Poszterek

- Kiss-Tóth, E., Czibula, Á., Bachrati, Cs., Unk, I.: The 67 bp long sequence in the bovine leukemia virus LTR-R region enhances the transcriptional activity of the virus promoter independently to p34 tax. 1st International Conference of the Hungarian Biochemical Society; Debrecen, Hungary, 29 August - 1 September 1993.
- Bachrati, Cs., Deák, F., Kiss, I.: Computer analysis of the von Willebrand factor type A-like modules: sequence comparison, secondary structure prediction, and evolution. International workshop on "Extracellular protein modules: Sequence, structure, function and evolution"; Margaretetorp, Sweden, 24-28 September 1994.
- Bachrati, Cs., Dozin, B., Malpeli, M., Neri, M., Kiss, I., Cancedda, R.: Expression of chicken CMP and LP genes. 2nd European Conference on Cartilage & Bone: Molecular and Cellular Mechanisms of Cartilage and Bone Remodelling; Giens, France, 1-6 October 1994.



- Mórocz, M., Czibula, Á., Bachrati, Cs., Raskó, I.: Gyors, egyszerű módszer génspecifikus DNS reparáció vizsgálatára sejtenyészeten. A Magyar Genetikusok Egyesülete III. Konferenciája; Debrecen, 1994 december 8-9.
- Neri, M., Dozin, B., Bachrati, Cs., Kiss, I., Cancedda, R.: Extracellular matrix proteins in developing cartilage: link protein, cartilage matrix protein and Ch21. 8<sup>th</sup> IIGB Meeting: Evolution and Development; Capri (NA) Italy, 7-10 October 1995.
- Czibula, Á., Gerencsér, Á., Bachrati, C., Borda, S., Margison, G.P., Rafferty, J., Johnson, R.T., Raskó, I.: Changes of DNA repair during *in vitro* cellular differentiation. Workshop on Processing of DNA Damage: Molecular Mechanisms and Biological Effects. Noordwijkerhout, The Netherlands, 20-25 April, 1996.
- Raskó, I., Czibula, Á., Borda, S., Bachrati, C., Gerencsér, Á., Margison, G.P., Johnson, R.T.: Changes of DNA repair during *in vitro* cellular differentiation. 7th IMP Spring Conference "Chromosomes". Vienna, Austria, 23-25 May, 1996.
- Somodi, Zs., Bachrati, Cs., Endreffy, E., Kalmár, T., László, A., Raskó, I.: Mikroszatellita polimorfizmusok a Duchenne- és Becker muscularis dystrophia carrier diagnosztikájában. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 2. Munkaértekezlete. Lillafüred, 1997. május 13-16.

### 8.1.2 Előadások

- Bachrati, Cs., Deák, F., Kiss, I.: A csirke porc kapcsolófehérje gén szabályozásának analízise. II. Genetikai Kongresszus; Szeged, 1994 augusztus 29-30.
- Bachrati, Cs., Deák, F., Kiss, I.: A von Willebrand faktor 'A' modul számítógépes analízise: szekvencia-összehasonlítás, másodlagos szerkezet becslés, evolúciós modell. A Magyar Genetikusok Egyesülete III. Konferenciája; Debrecen, 1994 december 8-9.
- Gerencsér, Á., Czibula, Á., Bachrati, C., Borda, S., Johnson, R.T., Raskó, I.: DNS reparáció változások *in vitro* sejt differenciálódás során. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 1. Munkaértekezlete. Seregélyes, 1996. április 16-18.
- Raskó, I., Czibula, Á., Borda, S., Bachrati, C., Gerencsér, Á., Margison, G.P., Johnson, R.T.: Changes of DNA repair during *in vitro* cellular differentiation. DNA Repair Network Workshop; Smolenice Castle, Slovakia, 29 April - 1 May, 1996.
- Bachrati Csanád, Somodi Zs., Endreffy E., Kalmár T., László A., Raskó I.: Mikroszatellita polimorfizmusok a Duchenne- és Becker muscularis dystrophia carrier diagnosztikájában. Magyar humángenetikusok konferenciája. Szeged, 1998. október 18-21.
- Kalmár Tibor, Gyömbér Zs., Bachrati Cs., Raskó I.: Populációgenetikai tanulások a mitokondriális DNS D-Loop szekvenciáinak vizsgálatára kapcsán. Magyar humángenetikusok konferenciája. Szeged, 1998. október 18-21.
- Bachrati Csanád, Somodi Zsolt, Endreffy Emőke, Kalmár Tibor, Raskó István: Mikroszatellita polimorfizmusok a Duchenne- és Becker muscularis dystrophia carrier diagnosztikájában. IV. Magyar Genetikai Kongresszus. Siófok, 1999. április 11-14.
- Kalmár Tibor, Bachrati Csanád, Raskó István: Humán populációgenetikai vizsgálatok honfoglaláskori leleteken. A Magyar Humángenetikai Társaság II. Kongresszusa. Pécs, 1999. augusztus 25-28.