DISS. B 1190

D O K T O R I É R T E K E Z É S

D N S R E P L I K Á C I Ó V I Z S G Á L A T A K I N A I H Ö R C S Ö G S E J T V O N A L B A N

/A HGPRT enzimet kódoló gén replikálódási időpontjának valamint a kromoszómák replikációs mintázatának meghatározása szinkronizált sejtkulturákban/

BURG KORNÉL

Tudományegyetem Könyvtár * József Attila
SZEGED

TARTALOMJEGYZÉK

1/ Bevezetés 4. oldal
2/ Célkitűzés 6. "
3/ Anyagok és módszerek 10. "
4/ Eredmények 15. "
4/1 Szinkronizált kultura előállitása 15. "
4/1/1 A leggyakrabban használt szinkronizáló eljárások 15. "
4/1/1/1 Mechanikus módszer 16. "
4/1/1/2 Kémiai módszerek 16. "
4/1/1/3 Kombinált módszerek 17. "
4/1/2 A szinkronizáló rendszer kiépitése, a szinkronizáló anyagok optimális hatásának megállapitása 18. "
4/1/2/1 Magas koncentrációju timidin 18. "
4/1/2/2 A HU kezelés kezdőpontjának meghatározása 21. "
4/1/2/3 A HU kezelés hosszának, illetve a kultura szinkronizáltsági fokának meghatározása 22. "
4/2 A HGPRT gén replikációs időpontjának meghatározása 28. "

4/2/1 Miért a HGPRT gén 28. oldal

4/2/2 A mutagén megfelelő koncentrációjának kiválasztása 29. "

4/2/3 A HGPRT$^-$ sejtek izolálására használt rendszer beállitása 31. "

4/2/4 A HGPRT gén replikációs időpontjának meghatározása a CHO-K_1 sejt S fázisán belül 36. "

4/3 Vizsgálatok a CHO-K_1 sejtvonal kromoszómái replikációs mintázatának megállapitására 40. "

5/ Megbeszélés 45. "

6/ Összefoglalás 48. "

7/ Irodalomjegyzék 49. "

1. BEVEZETÉS

1965-ben közölte Harris, hogy UV inaktivált Sendai virussal sikerült különféle differenciált sejteket /csirke VVT, nyul makrofág, patkány lymphocyta/ fuzionálnia egy humán daganat eredetü sejtvonallal /Hela/ /1,2/. A létrehozott fuzionált sejtekben /heterokarionok/ a differenciálódott sejtek, amelyek eredetileg DNS szintézist, a patkány lymphocyta és a nyul makrofág kivételével RNS szintézist sem mutattak, a fuzió következtében a Hela sejt citoplazmájának hatására DNS illetve RNS szintetizáló tulajdonságukat visszanyerték. Ezzel a hibrid rendszerrel sikerült kimutatni bizonyos nem fajspecifikus faktor/ok/ jelenlétét tenyészetben tartott sejtvonalban /Hela/, amely/ek/ egy differenciált állapotban lévő sejtet korábbi funkcióinak visszaállitására késztette, amit a sejt differenciálódása során megszüntetett. Ezzel a technikával jól vizsgálható a differenciált sejt magjában végbemenő változások sora, aminek következtében az eddig inaktiv mag ujból DNS-t illetve RNS-t szintetizál, az aktiv sejt citoplazmájának hatására. A differenciált sejt magjának reaktiválódása hosszu folyamat /5-10 nap/ amelyet zavar, ha a hybrid sejt- a Hela sejt magjának hatására - osztódik. Ennek kiküszöbölésére a Hela sejt magját fuzió előtt Rtg illetve γ sugárzással inaktiválták. Az ilyen besugárzott sejt biokémiai aktivitása válto-

zatlan marad, amely a differenciált sejt magjának reaktiválásához szükséges lehet, kivéve az osztódási képességet.

1969-ben Harris és Cook közölte, hogy ha csirke eritrocitát fuzionáltak egy hypoxantin-guanin foszforibozil transzferáz /HGPRT/ enzim hiányos egér sejttel, a heterokarionban kimutatható volt a HGPRT enzim jelenléte /3/. Erről az enzimről gélelektroforetikus vizsgálatokkal bizonyitható volt, hogy csirke specifikus /4/ . Ezeket a kisérleteket is besugárzott sejtekkel végezték. Amennyiben az egér sejtet nem sugarazták be, tehát nem késztették osztódó állapotának megszüntetésére, sikerült komplementált hibrid sejtvonalakat nyerniük, amelyekben kimutatható volt a csirke specifikus HGPRT enzim jelenléte, viszont csirke eredetü kromoszómát, illetve csirke eredetü felületi antigént nem lehetett kimutatni /5/. Ez teljesen eltérő volt az eddigi ismeretektől, ui. ha két nem differenciálódott sejtet fuzionáltak egymással, akkor a hibrid sejtben mindkét szülő kromoszómaállománya megtalálható részben vagy egészben. Abban az esetben viszont, ha sikerült olyan mutációt választani, amellyel lehetséges volt a besugárzás hatását utánozni és ezzel hosszu aktiválódási időt biztositani a differenciálódott partner számára, akkor sikerült olyan hibrid sejteket létrehozni, amely csirke

eredetü kromoszómát is tartalmazott. 1973-ban Kao komplementált különböző cisztronban mutálódott adenin igényes mutánsokat, amelyekben ki tudta mutatni a csirke eredetü komplementáló kromoszómát /6/.

2. CÉLKITÜZÉS

Érdekes probléma, hogy az olyan tipusu hybridben, amely sem látható csirke eredetü kromoszómát, sem csirke eredetü felületi antigént nem tartalmaz, mi a sorsa a csirke specifikus enzimért felelős információnak. Erről a csirke specifikus információról eddigiekben csak az ismert, hogy az osztódások során viszonylag stabil marad a hibrid sejtben, nem szelektiv körülmények között is /5/. A hibrid sejtben jelenlevő csirke eredetü információval kapcsolatban a továbbiakban két kérdés merül fel;

i/ Milyen formában van jelen a hibrid sejtben

ii/ Hogyan történik az idegen eredetü információ replikációja a hibrid sejt DNS szintézis fázisán belül.

i/ Valószinüleg egy kis darab csirke eredetü kromatinról lehet szó, amely: a/ centromeron szekvenciát tartalmazhat és ekkor mint kromoszóma viselkedik, viszont any-

nyira kicsi, hogy mikroszkóppal nem kimutatható;
b/ bakteriális episzómához hasonlóan lehet önálló DNS /kromatin/ szegment, illetve integrálódhat a fuziós partner kromoszóma állományába.

Feltételezhetően nem egyetlen gént hordozó DNS darabról van szó. Ezt az is bizonyitja, hogy ha egérben tumort képző HGPRT⁻ egér sejtvonal volt a csirke vörösvérsejt fuziós partnere és a hibridben csirke kromoszóma nem volt kimutatható, a hibrid tumort képző képessége csökkent, de ez nem tumor szupressziónak volt a következménye. A hibridek ugyanis γ besugárzott ujszülött egérben 100 %-ban, felnőtt egérben pedig az izolált hibrid vonaltól függően alacsonyabb százalékban /5-95%/ képeztek tumort. Mivel az ujszülött besugárzott egérnek nincs immunrendszere és itt a tumorképződés gyakorisága 100 %, ez arra utal, hogy a felnőtt egér immunrendszere valamilyen módon felismeri a hibrid sejteket és immunológiai reakcióval inaktiválja /7/. Ebből feltételezhető, hogy a HGPRT enzimen kivül - amely citoplazmatikus enzim, tehát immunológiai reakció kiváltásában nem vehet részt - más csirke eredetü fehérjék is jelen vannak a hibrid sejten belül illetőleg a felszinén, jóllehet ezeket az alkalmazott in vitro technikákkal nem sikerült kimutatni.

ii/ A replikálódás problémáját tekintve felmerül a kérdés, hogy van-e kitüntetett időpont a hibrid sejt DNS szintézis fázisán belül a csirke eredetü információ replikálódására. Ha igen, akkor azonos-e ez a partner sejt HGPRT génjének replikációs időpontjával.

A ii/ pontban vázolt probléma megoldását tüztük ki távolabbi célul, ugyanis a replikálódás kérdéseinek megválaszolásával adatokat kaphatunk arról is, hogy a csirke eredetü információ milyen formában működik a hibrid sejten belül. Közeli célnak, és e munka céljának egy olyan modellrendszer kidolgozását tüztük ki, amely segitségével egy adott gén replikációs időpontját meghatározzuk azon sejtvonal DNS szintézis fázisán belül, amelyet a későbbiekben fuziós partner sejtként használunk fel.

Emlős sejtrendszerekben eddig hasonló problémát főleg biokémiai módszerek alkalmazásával oldottak meg, mert genetikai rendszer nem állt rendelkezésre egyetlen gén replikációs időpontjának meghatározására. Biokémiai technikával állapitották meg a riboszómális cisztronok, a globin messenger, az SV 40 virus és az immunoglobulin gének replikációs időpontját /8/. Az alkalmazott módszerek a következőkön alapultak: DNS szintézis /S/ fázisára

szinkronizált sejteket bromdezoxi-uridinnel /BUdR/ pulzus jelöltek az S fázis különböző periódusaiban. A BUdR az ujonan replikálódott DNS-be a timidin helyére épül be, és nagyobb molsulyánál fogva azt "neheziti". A "nehéz" DNS centrifugálással elválasztható a többitől, és amennyiben rendelkezésre áll a kérdéses gén messengere, a riboszómális cisztronok esetében a riboszómális RNS, DNS-RNS hibridizációs technikával megállapitható, hogy a kérdéses gén az S fázis mely periódusában replikálódik.

Alacsonyabbrendü szervezetekben sikerült a nitrozóguanidinnek /MNNG/ azon hatását kihasználni, hogy az MNNG elsődlegesen a replikációs villában okoz mutációt. Ennek a hatásnak a kihasználásával sikerült megállapitani élesztőben /Saccharomyces Cerevisiae/ az erithromycin rezisztenciáért felelős gének replikációs időpontjait /9/. Az MNNG emlős sejtek esetén azonban nem mutat ilyen specifikus hatást /10/.

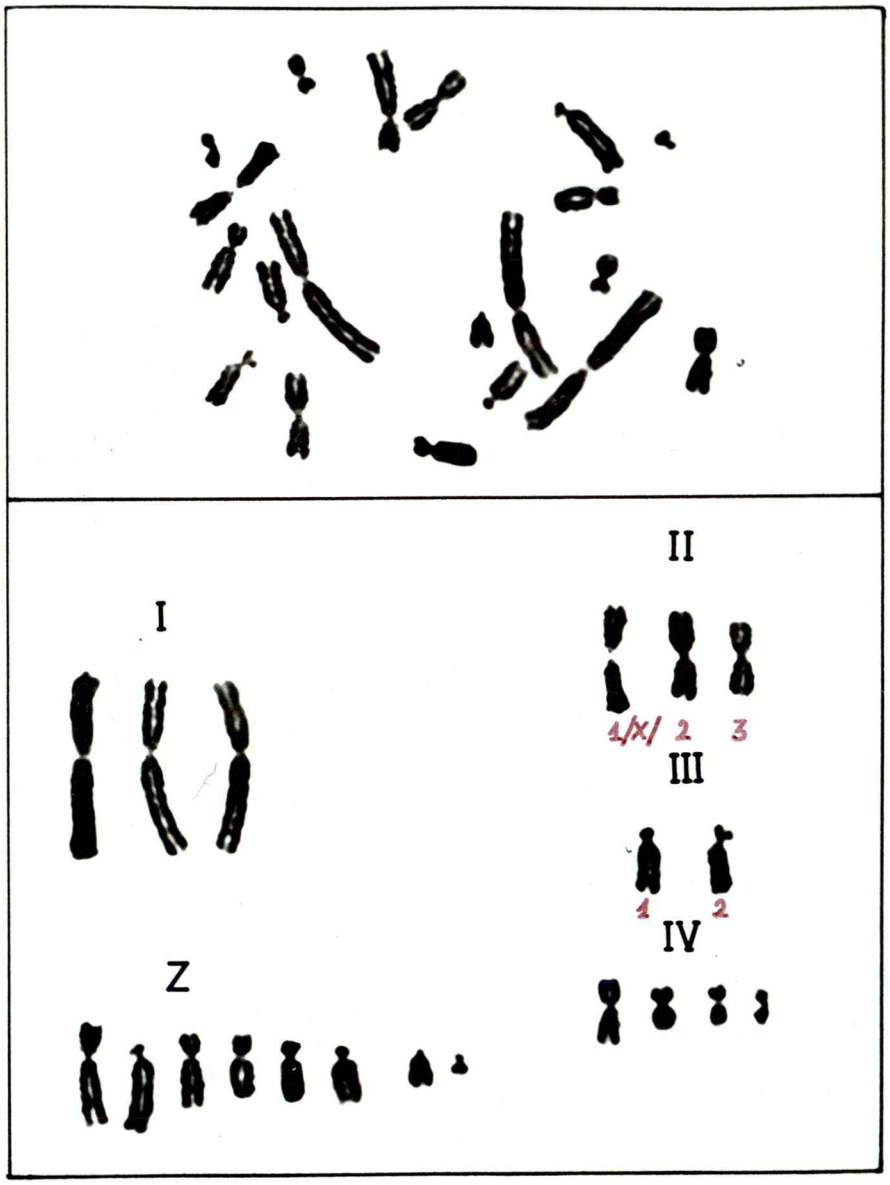
Mi a BUdR-nek azt a hatását igyekeztünk kihasználni, miszerint a DNS-be beépült BUdR hibás bázispárosodást okoz a DNS replikációk során és igy mint mutagén hat /11/. Amennyiben lehetséges a BUdR mutagén hatását kihasználni, a szelekciós technika helyes megválasztásával elvben

bármely gén replikációs időpontja meghatározható. Ha egy S fázisra szinkronizált szövetkulturát az S fázis különböző periódusaiban pulzusjelölünk BUdR-rel és egy adott mutánst szelektálunk, a mutációs gyakoriság csak ott fog jelentősen megemelkedni a kontrollhoz képest ahol a BUdR pulzusjelölés ideje egybeesik az adott gén replikálódásának időpontjával.

Ahhoz, hogy a vizsgálatot megfelelő pontossággal lehessen elvégezni egy igen pontosan S fázis elejére szinkronizált kulturát kellett előállitani. Ehhez egy olyan sejtvonalat kellett választani, amelynek kromoszómaszáma viszonylag állandó. Ez egyben azt is eredményezi, hogy az egyes sejtek generációs idejének variabilitása is szük határok között mozog.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtvonal: A kisérleteinkben CHO-K_1 jelzésü sejtvonalat használtunk. Ez kinai hörcsög ováriumból származik, kromoszóma száma 20 /1. ábra/. Generációs ideje 12.5 óra, /G1: 4 h 42 p; S: 4 h 10 p; G2: 2 h 54 p; M: 50 p/ A sejtvonal kontakt gátlást nem mutat ami megkönnyiti a sejt kezelését nagyobb sejtsürüségek esetén. 80-90 %-os



1. ábra. CHO-K_1 sejt kariotipusa.

hatásfokkal képez kolóniát. A legtöbb mutáns izolálási munkát is ezen a sejten végeztük; auxotrof, /12/ drog rezisztens /13/ hőérzékeny /14/ mutánsok.

Tenyésztés: A sejteket F12 tápfolyadékban /15/ növeltük 5 % fötális borju savó kiegészitéssel /F12+5FC/. BUdR alkalmazása esetén timidint nem tartalmazó táptalajt alkalmaztunk szintén 5 % fötális borju savó kiegészitéssel /F12 tim^-+5FC/. A tenyésztés üveg /Orion/ Petri csészékben 5 % CO_2 tenzióban, 37°C-on történt. A sejtek továbbvitelét a szokásos tripszinezéses módszerrel végeztük, Salin D_2 tripszin oldat segitségével /16/.

Kromoszóma preparálás: A preparálás előtt a tenyészeteket kolcemiddel /0.2 µg/ml/ kezeltük, a metafázisos sejtek felszaporitása érdekében, illetve a mitotikus index számitása esetén azért, hogy a blokkolási periodus alatt osztódó sejteket összegyüjtsük, hogy azokat számolni lehessen. A tenyészeteket tripszineztük, a sejteket erőteljes pipettázással a Petri csésze felületéről eltávolitottuk, majd 5 perces centrifugálással ülepitettük /800 ford/perc/. A sejteket 37°C-on 20 percig hipotoniás oldatban /0.75 M KCl/ kezeltük, majd ismételt, 5 perces centrifugálás után jégecet:metanol 1:3 arányu keverékében fixáltuk. Ezután hideg, nedves tárgylemezre csöppentettük és levegőn történő száradás után 25 percig

1:50 arányban higitott Giemsában /pH=6.8/ festettük.

<u>^{3}H-timidin /^{3}H-TdR/ beépülés mérése</u>: A tenyészetekhez 0.1-0.5 µCi/ml ^{3}H-TdR-t adtunk /spec.akt.: 19.6 Ci/mM/. Adott inkubációs idő után az összes sejtet tripszin oldat segitségével eltávolitottuk a felületről és 0.45 µ pórusnagyságu cellulóz acetát szürőre vittük /Sartorius/. 20 ml hideg fiziológiás sóoldattal, majd 20 ml hideg 5 %-os triklorecetsav /TCA/ oldattal mostuk. Száritás után scintillációs számlálóval toluolos koktélban /Liquifluor/ számoltuk.

<u>Mitotikus index:</u> $N_m = \frac{\text{metafázisos sejtek száma}}{\text{összes sejtszám}}$

<u>Autoradiográfia</u>: Mindkét tipusu autoradiográfiás kisérletben /szinkronizáltsági fok meghatározás, kromoszóma replikáció vizsgálat/ 15 perces, 0.5 µC/ml ^{3}H-TdR pulzus jelölést alkalmaztunk F12 tim$^-$+5FC tápfolyadékban. A szinkronizáltsági fok meghatározásánál a sejteket fedőlemezen tenyésztettünk. Az izotóp pulzusjelölést követően a sejteket azonnal fixáltuk 10 %-os formalinban, majd desztillált vizes mosás után, két óráig hideg 5 %-os TCA oldatban áztattuk, a nem inkorporálódott izotóp eltávolitása céljából. A kromoszóma replikációs vizsgálatoknál az izotóp pulzusjelölést követően 10^{-4}M TdR adással

az izotóp további beépülését megakadályoztuk. A szinkron osztódásnak induló sejtekből - egy órás colcemid blokkolás után - kromoszóma preparátumot készitettünk, amelyet az előzőhöz hasonlóan desztillált vizben, majd 5 %-os TCA-ban mostunk. Az igy előkészitett preparátumokat 50°C-os Ilford K5 autoradiográfiás emulzióba meritettük. Lecsepegtetés után száritottuk és tiz napig sötétben exponáltuk 4°C-on. Az autoradiográfiák előhivását a megadott gyári előirás szerint végeztük. Ezután a preparátumokat 1:50 arányban higitott Giemsával /pH:6.8/ festettük.

Kolónia képző képesség mérése; 60 mm Ø Petri csészébe ismert számu /300-600/ sejtet vittünk. A sejteket Coulter Counterben 200x higitásban számoltuk. 5-7 nap eltelte után a koloniákat festettük és számoltuk. Kémiai anyagokkal történt kezelés esetén a különböző koncentrációknál kapott kolóniaszámot a kezeletlen kontroll százalékában ábrázoltuk.

Kolónia festés: A csészéket a kolóniák kifejlődése után /6-10 nap/ fiziológiás sóoldattal mostuk, 10 %-os formalin oldatban fixáltuk és 1 %-os kristályibolya oldattal festettük 5 percig.

Sejtszinkronizálás: F12+5FC tápfolyadékban 6-10 óráig előtenyésztett logaritmikus növekedési fázisu sejtekhez 10 órán keresztül 10^{-2}M timidint adtunk. A timidint tartalmazó táptalaj eltávolitása után a sejteket fiziológiás sóoldattal mostuk, majd F12+5FC tápfolyadékban, 11 óráig tovább tenyésztettük. Ezután a sejteket 10^{-3}M hidroxiureában /HU/ tartottuk 10 órán keresztül. A HU eltávolitását is fiziológiás sóoldatos mosással végeztük. Az igy S fázis kezdetére szinkronizált kulturát a kisérlet jellegétől függően vagy F12+5FC, vagy F12 tim^{-}+ +5FC tápfolyadékban növeltük tovább. A szinkronizálás minden lépését 37°C-os melegszobában, előmelegitett tápfolyadékokkal végeztük.

4. EREDMÉNYEK

4/1 Szinkronizált kultura előállitása.

4/1/1 A leggyakrabban használt szinkronizáló eljárások

Első lépésként egy igen pontosan G1-S átmenetre szinkronizált kultura előállitását kezdtük meg. Az irodalomból számos szinkronizálási módszer ismeretes, a leggyakrabban használtak a következők:

4/1/1/1 Mechanikus módszer: Mitotikus sejtek lerázása. Ez a módszer azt a jelenséget használja ki, hogy az osztódó sejtek kevésbé tapadnak a tenyésztőedény felszinén, mint az interfázisos sejtek és igy egyszerü rázással eltávolithatók, összegyüjthetők.

4/1/1/2 Kémiai módszerek:

a/ Magas koncentrációju timidin: A magas koncentrációju TdR a sejtek S fázisát lassitja, valószinüleg dCTP hiányt okozva /17/. A DNS szintézis iniciációja megtörténik magas koncentrációju TdR jelenlétében is, de az elongáció lelassul. Az életciklus más fázisában lévő sejtekre hatástalan, ezáltal a sejtpopuláció többsége az S fázisban gyülik össze.

b/ Hidroxiurea: A HU kizárólag S fázisu sejtekre hat - ezekre toxikus - illetve a más fázisban lévő sejteket nem engedi belépni az S fázisba. A HU gátolja a ribonukleotid reduktázokat /18/ ezáltal a sejtek dATP és dGTP pooljai üresek. /19/ az S fázisu kromatinra valószinüleg közvetlenül is hat /20/; ezzel magyarázható toxikus hatása az S fázisu sejtekre.

c/ Izoleucin éhezés: Megakadályozza a sejtek-
nek S fázisba lépését, azonban nincs hatással
az S fázisban lévő sejtekre ezek be tudják
fejezni DNS replikációjukat és osztódás után
a következő G1 fázis végén megállnak /21/.

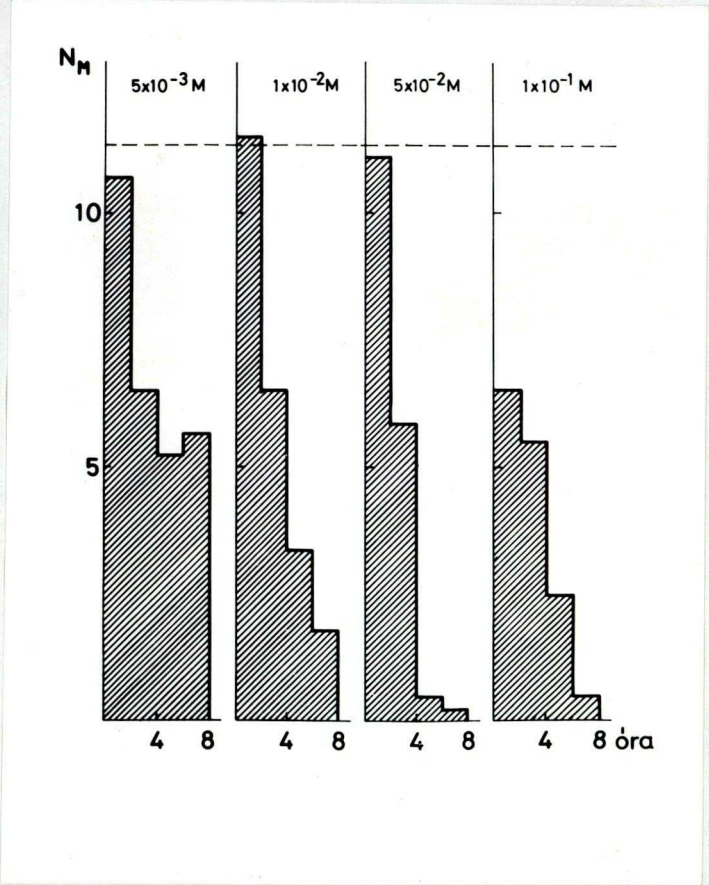
4/1/1/3 Kombinált módszerek: Pontosabb szinkronizáció
eléréséhez a fennt emlitett szinkronizálási techni
kákat kombinálni szokták. Mi is ezt az utat válas
tottuk. Rendszerünket Meyn és munkatársai által
közölt metodika módositásával dolgoztuk ki
/22/. Az eredeti közleményben a szerzők először
magas koncentrációju timidin adásával a sejteket
előszinkronizálják, majd a timidin gátlás után
kapott részlegesen szinkron osztódó sejteket le-
rázással összegyüjtik és HU-val kezelik, amely a
sejteket a G1-S átmeneten gátolja. Mi ezt a mód-
szert annyiban változattuk, hogy F12 tápfolyadék-
ban végeztük a szinkronizálást és a timidin adást
követően a mitozisos sejteket nem ráztuk le, ha-
nem egy órás inkubálási idő után HU kezelést alkal
maztunk. Igy nagyobb szám sejtet lehet könnyeb-
ben kezelni, ami a mutációs kisérletekben
előnyösebb.

4/1/2 A szinkronizáló rendszer kiépitése, a szinkronizáló anyagok optimális hatásának megállapitása

4/1/2/1 Magas koncentrációju timidin: Mint már emlitettük a magas koncentrációju timidin gátlás nem ad tökéletesen szinkronizált kulturákat, viszont optimális dózisban csak igen kevéssé toxikus, ezért ideálisan alkalmas előszinkronizálásra. Munkánk első lépéseként az optimális gátló hatásu dózist kellett megállapitani. A TdR gátló hatásának mérésére olyan módszert alkalmaztunk, amellyel a gátló koncentrációban adott TdR adása után osztódó sejtek mennyiségéből következtetni lehet a gátló hatás mértékére. A G2 fázisban levő sejtekre a TdR-nek nincs hatása, tehát ezek a sejtek magas koncentrációju TdR jelenlétében zavartalanul befejezik a G2 fázist és osztódásba lépnek. Ha ezeket az osztódó sejteket blokkoljuk /pl.: kolcemiddel/ és százalékos mennyiségüket meghatározzuk, ugy tökéletes TdR gátló hatás esetén csak annyi sejt osztódik, amennyi a G2 fázisban volt és ez annyi időt vesz igénybe mint a G2 fázis hossza. Ellenkező esetben egy G2-nyi idő eltelte után is lehet találni osztódó sejteket, amelyek mennyisége

arányos a gátló hatás mértékével.
A magas koncentrációju TdR adásával egyidőben két órás kolcemid gátlások alatt számoltuk a mitotikus indexet /N_M/. Tökéletes TdR gátlás esetén, mivel a CHO-K_1 sejt G2 fázisának az időtartama ~3 óra, az első 2 órás kolcemid gátlás alatt az osztódó sejtek aránya /N_M/ meg kell egyezzen a kontroll értékkel, amely egy nem kezelt de szintén random eloszlásu kultura két órás kolcemid kezelése után mérhető. A második két órás kolcemid gátlás alatt az osztódó sejtek aránya a kontroll felére kell csökkenjen, illetve a harmadik kétórás gátló periódus alatt nem kapunk osztódó sejtet. Ezt az elméleti levezetésnek megfelelő lefutást $5x10^{-2}$M koncentrációju TdR adásával lehetett megközeliteni /2. ábra/.

A TdR gátlás időtartamát 10 órában állapitottuk meg. Ez az idő valamivel hosszabb, mint ami ahhoz szükséges, hogy egy G2 fázis elején levő sejt elérje a következő S fázis elejét /G2:~3 óra; M:~1 óra; G1:~5 óra/.



2. ábra. Különböző koncentrációju TdR gátló hatása.— — — kontroll

Következő lépésként meg kellett állapitani a különböző koncentrációju TdR szinkronizáló hatását, illetve toxikusságát. Ezt az előzőekhez hasonlóan, a mitotikus index mérése alapján végeztük. A 10 órás TdR gátlás felszabaditása után két órás kolcemid gátlások alatt számoltuk a mitotikus sejtek arányát /N_M/. Ebből kiderült, hogy az $5x10^{-2}$M TdR bár tökéletes gátlást eredményez, a sejtekre toxikus, mert szinkron, de igen kevés számu osztódó sejtet találtunk. Továbbiakban a 10^{-2}M koncentrációju timidint használtuk, amely ugyan nem biztosit tökéletes gátló hatást, de kevésbé toxikus. /70 % tulélés/ /3. ábra/ Az ábrából látható, hogy a mitotikus hullám szélessége ~ 4 óra, ami alátámasztja azt az elképzelést, miszerint a magas koncentrációju TdR az S fázis egyik pontján sem gátol elsődlegesen, hanem az S fázis lefolyását lassitja. Ezért a sejtek S fázison belüli eloszlása egyenletes.

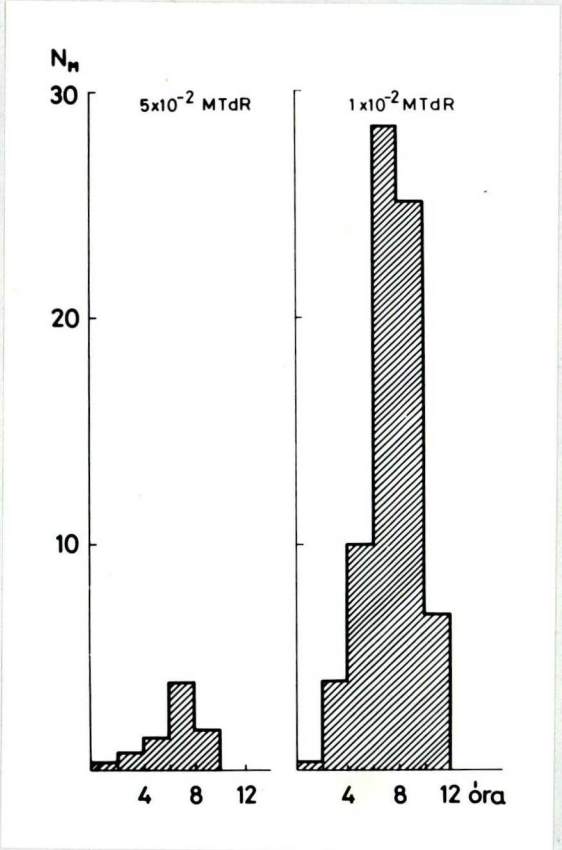
4/1/2/2 <u>A HU kezelés kezdőpontjának meghatározása</u>

Mint már emlitettük a HU az S fázisu sejtekre toxikus. Mivel a magas koncentrációju TdR gátlás nem biztosit megfelelően élesen szinkronizált

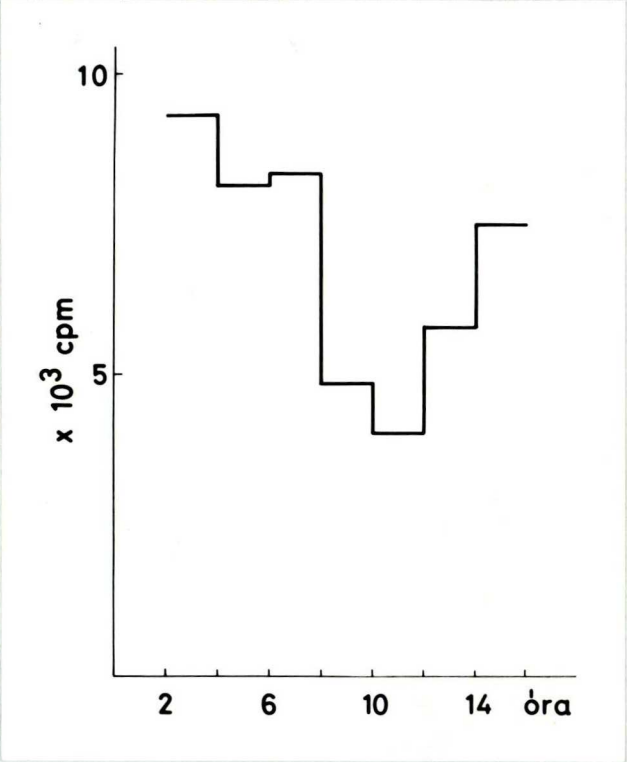
kulturát, ki kellett választani azt az időpontot, amikor a lehető legkevesebb sejt van S fázisban. Ennek megállapitására egyrészt felhasználtuk a TdR gátlás utáni mitotikus hullám időbeli helyét, másrészt ^{3}H-TdR pulzus jelöléssel megállapitottuk azt az időpontot amikor legkevesebb a beépités a TCA oldhatatlan frakcióba /4. ábra/. E két adat birtokában az optimális időpontot a HU kezelés megkezdésére a TdR gátlás megszüntetése utáni 10-11. órában állapitottuk meg.

4/1/2/3 <u>A HU kezelés hosszának, illetve a kultura szinkronizáltsági fokának meghatározása</u>

A HU koncentrációját az irodalomból rendelkezésre álló adatok alapján 10^{-3}M-ban választottuk meg /22/. Az optimális hosszuságu kezelést ugy határoztuk meg, hogy különböző hosszuságu HU kezelés után mértük a ^{3}H-TdR beépülés növekedését a TCA oldhatatlan frakcióba. Ismerve a CHO-K_1 sejt S fázisának időtartamát /~4 óra/ olyan hosszu HU kezelés szükséges, amelynél a ^{3}H-TdR beépülés a HU kezelés felszabaditása után a 4. óra végéig emelkedik, ezután pedig



3. ábra. Különböző koncentrációju TdR gátlás után kapott szinkron osztódó sejtek.



4. ábra. 10^{-2}M TdR gátlás után 2 órás pulzusjelölésekben mért ^{3}H-TdR inkorporáció.

további számottevő beépülés nem tapasztalható. Az eredményeket az 5. ábra tartalmazza. Ebből látható, hogy 10 óra HU kezelés szükséges ahhoz, hogy az elméleti követelményeket megközelithessük. Az így kapott szinkron kulturák szinkronizáltsági fokát három féle módon határoztuk meg.

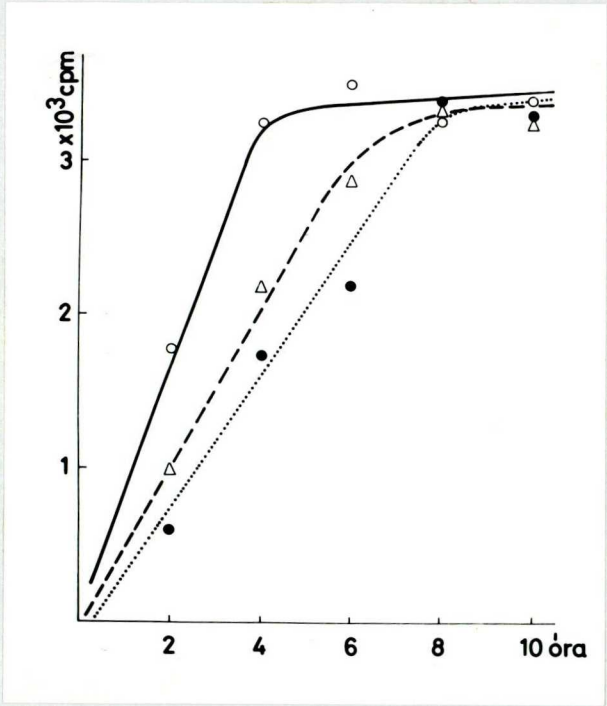
i/ ^{3}H-TdR beépülés mérésével a TCA oldhatatlan frakcióba.

ii/ ^{3}H-TdR pulzusjelöléssel /15 perc/ amelyet autoradiográfia követett. Ennek a módszernek a segitségével megállapitható az adott időpontban DNS-t szintetizáló sejtek aránya.

iii/ mitotikus index méréssel.

Az eredményeket a 6. ábra mutatja. Az ábrán feltüntettük az életciklusanalizisből már korábban ismert S, G2 és M értékeket, amelyek jó egyezést mutatnak a szinkron kulturát jellemző görbék lefutásával. Kolóniaképző képesség mérése alapján a kultura túlélése 30 %, ami megfelelő egyezésben van a kapott mitotikus csucs értékével.

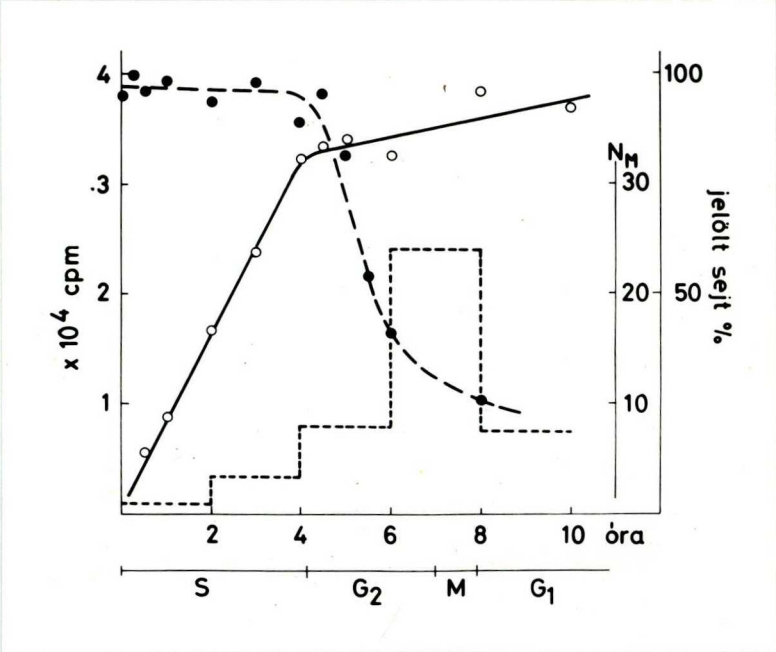
Megállapitható, hogy ezzel a rendszerrel a CHO-K_1 sejtvonalból S fázisra igen pontosan szinkronizált kulturákat lehet nyerni, amelynek segitségével a 2. pontban felvetett probléma megoldására mód nyilik.



5. ábra. HU kezelés és hosszának kimérése.

●·····● 5 óra; Δ---Δ 7,5 óra; o—o 10 óra

HU kezelést követő ^{3}H-TdR inkorporáció.



6. ábra. A kultura szinkronitás fokának kimérése. o—o ^{3}H-TdR inkorporáció; ●--● autoradiográfiával jelzett sejtek aránya; --- mitotikus index két órás kolcemid gátlások után.

4/2 A HGPRT gén replikációs időpontjának meghatározása

4/2/1 Miért a HGPRT gén: Választásunk azért esett a HGPRT gén mutánsokra, mert ilyen mutációk viszonylag könnyen szelektálhatók emlős sejt kulturákból. A HGPRT enzim nem esszenciális enzime a sejteknek, ui. a táptalajból bekerülő hipoxantint, illetve guanint alakitja IMP ill. GMP-vé. Emberben in vivo körülmények küzött ennek az enzimnek a hiánya az un. Lesch-Nyhan szindrómát eredményezi. HGPRT⁻ mutánsok emlős sejtkulturákból közvetlen szelekcióval antimetabolit adással /6-tioguanin, 8-azaguanin, 6-merkaptopurin/ történik. Az igy nyert antimetabolit rezisztens mutánsok tulnyomó többsége HGPRT enzim aktivitás hiányos mutáns, azonban előfordul más tipusu rezisztencia is /14/. Az antimetabolit rezisztencia okai a következők lehetnek:

a/ Csökkent HGPRT aktivitás, illetve megváltozott szubsztrát specifitás, aminek következtében az enzim az antimetabolitot nem használja szubsztrátként.

b/ Csökkent antimetabolit transzport.

c/ A de novo purin bioszintézis csökkent feed

back gátlása az antimetabolit által, aminek következtében az "kihigul".

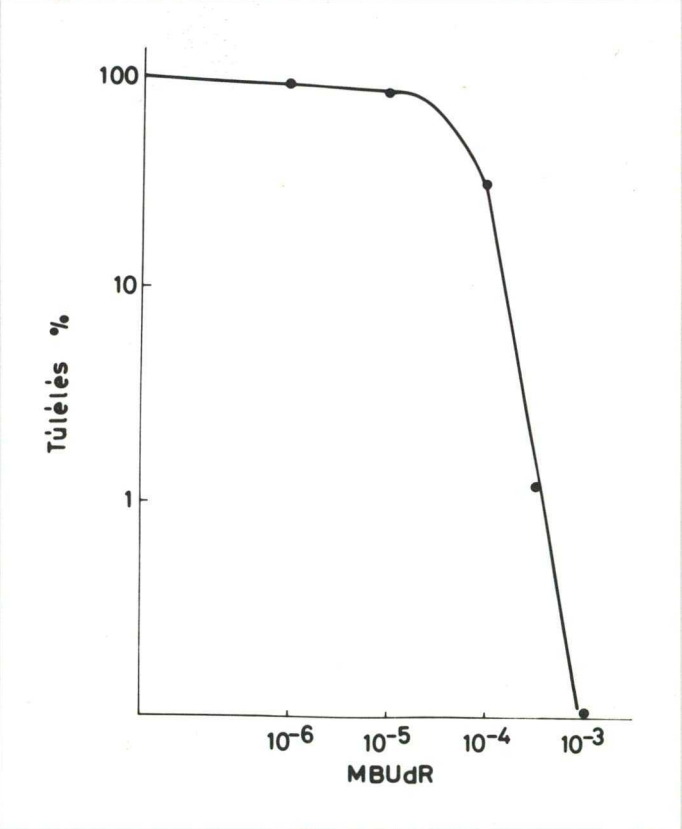
d/ A nukleotidok és igy az antimetabolit nukleotidjának fokozott bomlása.

e/ Nukleotid foszforiláz illetve a ribonukleotid difoszfát reduktáz enzimek megváltozott szubsztrátspecificitása.

Mi szelektáló antimetabolitként a 6-tioguanint választottuk, amely a CHO sejtvonal esetében preferenciálisan a HGPRT enzim aktivitás hiányos mutánsokra szelektál /14/.

4/2/2 <u>A mutagén megfelelő koncentrációjának kiválasztása;</u>

Mutagénnek a 2. fejeztben emlitettek alapján a bromodezoxiuridint /BUdR/ választottuk. A BUdR megfelelő koncentrációját tulélési görbe alapján állapitottuk meg, random elosziásu kulturákban. Egy-egy csészében 300-300 sejtet kezeltünk 16 órán át, különböző koncentrációju BUdR-rel, majd a BUdR eltávolitása után 5-7 nappal számoltuk a kifejlődött kolóniákat. A tulélési görbét a 7. ábra mutatja. Ennek alapján a 10^{-4}M BUdR koncentrációt választottuk, ami kb. 30 % tulélést jelent. Ugyanilyen tulélési értéket kaptunk szinkron kulturák S fázisána



7. ábra. BUdR tulélési görbe

10^{-4}M BUdR-rel való kezelése után is.

4/2/3 <u>A HGPRT$^-$ sejtek izolálására használt rendszer beállítása.</u>

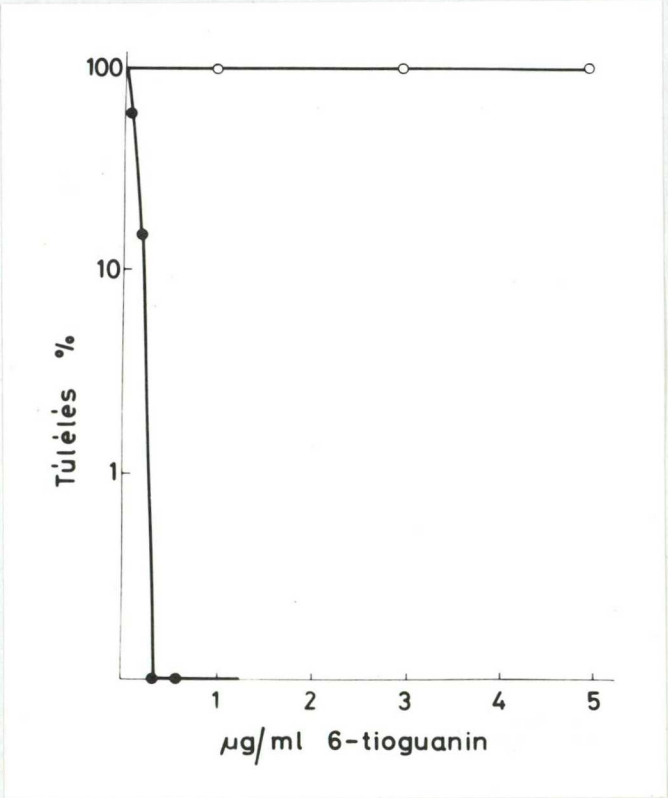
A HGPRT$^-$ mutánsok izolálásánál három problémát kellett megvizsgálni.

i/ Mi az optimális koncentrációja a szelektáló antimetabolitnak /6-tioguanin/

ii/ Mennyi idő szükséges a mutagén kezelés után a mutációk kifejlődéséhez /expressziós idő/

iii/ A szelektálás során hogyan változik a kapott mutáns kolóniák száma a sejtsűrűségtől függően /metabolikus kooperáció/

i/ Olyan 6-tioguanin koncentrációt kellett választani, amelynél a vad tipusu sejt nem mutat növekedést. Ezt túlélési kisérletben kolónia képzési képesség mérése alapján állapitottuk meg. Különböző koncentrációju 6-tioguanin jelenlétében növeltük a vad és egy biztosan HGPRT$^-$ /6-tioguanin rezisztens/ sejtet. A kapott túlélési görbéket mutatja a 8. ábra. Ennek alapján 5 ug/ml 6-tioguanin koncentrációt választottuk a mutánsok szelektálására.



8. ábra. 6-tioguanin tulélési görbe.

●—● érzékeny sejt;

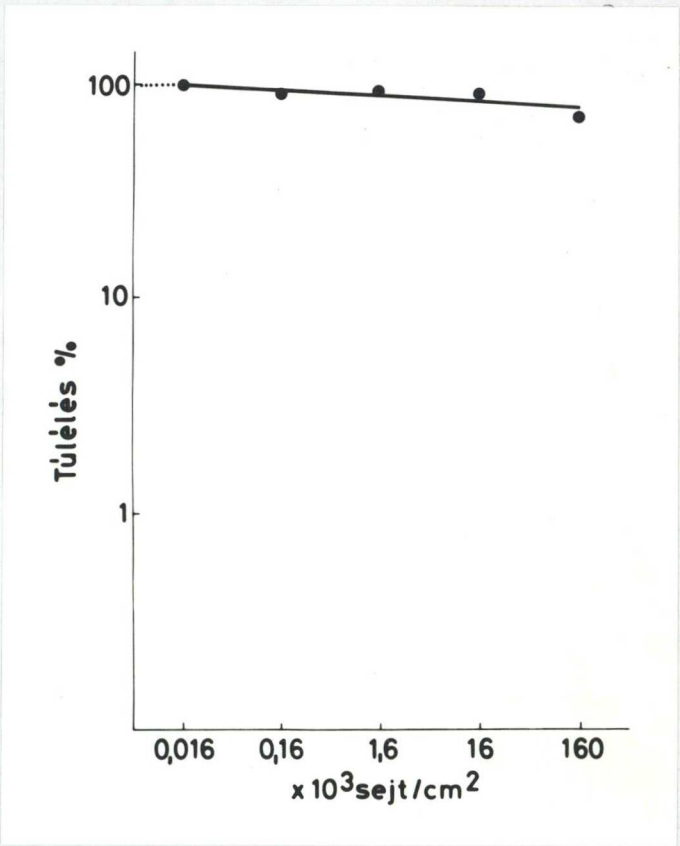
○—○ rezisztens sejt.

ii/ Az expressziós idő meghatározásához $1x10^6$ sejtet kezeltünk 10^{-4}M BUdR-nál 16 órán keresztül. A mutagén eltávolitása után a mutánsszelekciót különböző időpontokban kezdtük meg. Az eredményeket az 1. tábla foglalja össze. Ebből látható, hogy legalább 72 óra eltelte szükséges ahhoz, hogy a keletkezett mutációkat detektálni lehessen. Ezért további kisérleteinkben 72-96 óra expressziós időt hagytunk a mutációk kifejlődéséhez.

iii/ Ismeretes az, hogy a sejtek un. metabolikus kooperációja következtében növekvő sejtsürüség mellett, a kapott mutáns kolóniák száma csökken /23/, annak a következtében, hogy a vad típusu sejtek átadják a már metabolizált antimetabolitot a környező sejteknek, igy a mutáns sejteknek is, amelyek igy elpusztulnak. Tehát meg kellett állapitsuk a mutáns sejtek kolónia képző képességét különböző sejtsürüségek esetében. Különböző sürüségü vad tipusu sejthez, előzőleg izolált HGPRT⁻ mutáns sejteket adtunk, 15 sejt/cm^2 koncentrációban és 5 ug/ml 6-tioguanin jelenlétében visszaizoláltuk a HGPRT⁻ mutáns sejtekből keletkezett kolóniákat /9. ábra. Megállapitható, hogy a sejtsürüség lényegesen nem

Expressiós idő (óra)	Indukált mutációk száma / 10^6 sejt
48	0
72	8,8
96	15
120	35

1. tábla. A BUdR indukált mutációk expressziós idejének kimérése.



9. ábra. Metabolikus kooperáció

befolyásolja a mutáns sejtek túlélését. A kisérlet alapján továbbiakban a 16×10^3 sejt/cm^2 sejtsürüséget választottuk /80 % túlélés/, amely megfelel annak a körülménynek, amikor egy 100 mm Ø Petri csészébe 1×10^6 sejtet szélesztünk. Az igy kapott korrekciós faktort figyelembe vettük a mutáns kolóniák valódi számának megállapitásához.

A fenti három adat birtokában pontos szelekciós rendszert lehetett összeállitani, amely segitségével kvantitativen lehet mérni a mutagén kezelés hatására létrejövő HGPRT$^-$ mutánsok számát.

4/2/4 <u>A HGPRT gén replikációs időpontjának meghatározása a CHO-K_1 sejt S-fázisán belül.</u>

Az előzőekben ismertetett szinkronizációs rendszer illetve mutáns szelekciós szisztéma segitségével, kisérletet tettünk a HGPRT gén replikációs időpontjának megállapitására a CHO-K_1 sejt S-fázisán belül. Első lépésben a célunk az volt, hogy a létrehozott rendszerrel kimutatható-e az, hogy a HGPRT gén az S-fázis első illetve második felében replikálódik. Ezért az életciklus adatokból illetve szinkronizálás karakterizálásakor egyaránt kb. 4 órának adódó S fázist két egyenlő, két órás periódusra osztottuk. Egy mintához 5×10^5 sejtet szinkroni-

záltunk, ami a szinkronizálás végére kb. $1,5x10^6$ sejtszámra nőtt. A túlélés eredményét figyelembe véve ez kb. $5-6x10^5$ túlélő sejtet jelent. Ez a mintánkénti sejtszám elegendőnek bizonyult a mutációs gyakoriság mérésére. A kulturákat 10^{-4}M BUdR-nal kezeltük a mintától függően 0-2. illetőleg 2-4. órában. A BUdR kezelés után a kulturákat mostuk és 10^{-4}M TdR adásával a BUdR további beépülését megakadályoztuk. A 10^{-4}M TdR kezelést a szinkron kulturák osztódása után a következő G1 fázisban megszüntettük. /8-10 órával az S fázis megkezdése után/. Túlélési kisérletekben kimutatható volt, hogy a 10^{-4}M BUdR az S fázis mindkét felében azonos arányban csökkenti a sejtek túlélését és ez megegyezik a randon kulturákban kapott értékkel 16 órás 10^{-4}M BUdR kezelés után. A BUdR pulzussal végzett mutációs kisérletek eredményét a második tábla mutatja.

Az eredményekből látható, hogy i/ az indukált mutációs frekvencia lényegesen megemelkedik az S fázis első két órájának BUdR pulzusjelölése után. ii/ Némi emelkedést tapasztalhatunk az S fázis második két órájának pulzusjelölésekor, amire két magyarázat adható.

INDUKÁLT MUTÁCIÓK SZÁMA / 10^6 SEJT

kisérlet	S fázis	
	0-2 óra	2-4 óra
1	4	0,57
2	3,54	1,35
3	4,77	0,42

2. tábla. S fázisra szinkron kulturák BUdR pulzusjelölése után kapott indukált mutációk. 72 órás expressziós idő.

a/ A HGPRT gén replikációja az S fázis második órájának végén történik és a szinkron kultura részleges pontatlansága miatt a második két órában is megjelennek mutánsok.

b/ Az első két illetőleg a második két órában izolált mutánsok természete eltérő.

A mutációs frekvencia emelkedésének alapján megállapitható, hogy a HGPRT enzimért felelős gén a CHO-K_1 sejtvonal S fázisának első felében replikálódik. Az S fázis több részre bontásával illetőleg az izolált, mutáns kolóniák egyedi jellemzésével mód nyilik arra, hogy a mutáció frekvenciájának az S fázis második két órájában való emelkedését pontosan értelmezni lehessen illetve a HGPRT enzimért felelős gén replikációs időpontját pontosabban meghatározzuk.

Ezzel az eredménnyel bizonyitottuk, hogy emlős sejtek esetén is felállitható egy olyan genetikai rendszer, amely segitségével egy adott gén replikálódásának időpontja meghatározható a sejt DNS szintézis fázisán belül. Tehát az eredeti célkitüzés, hogy egy hörcsög

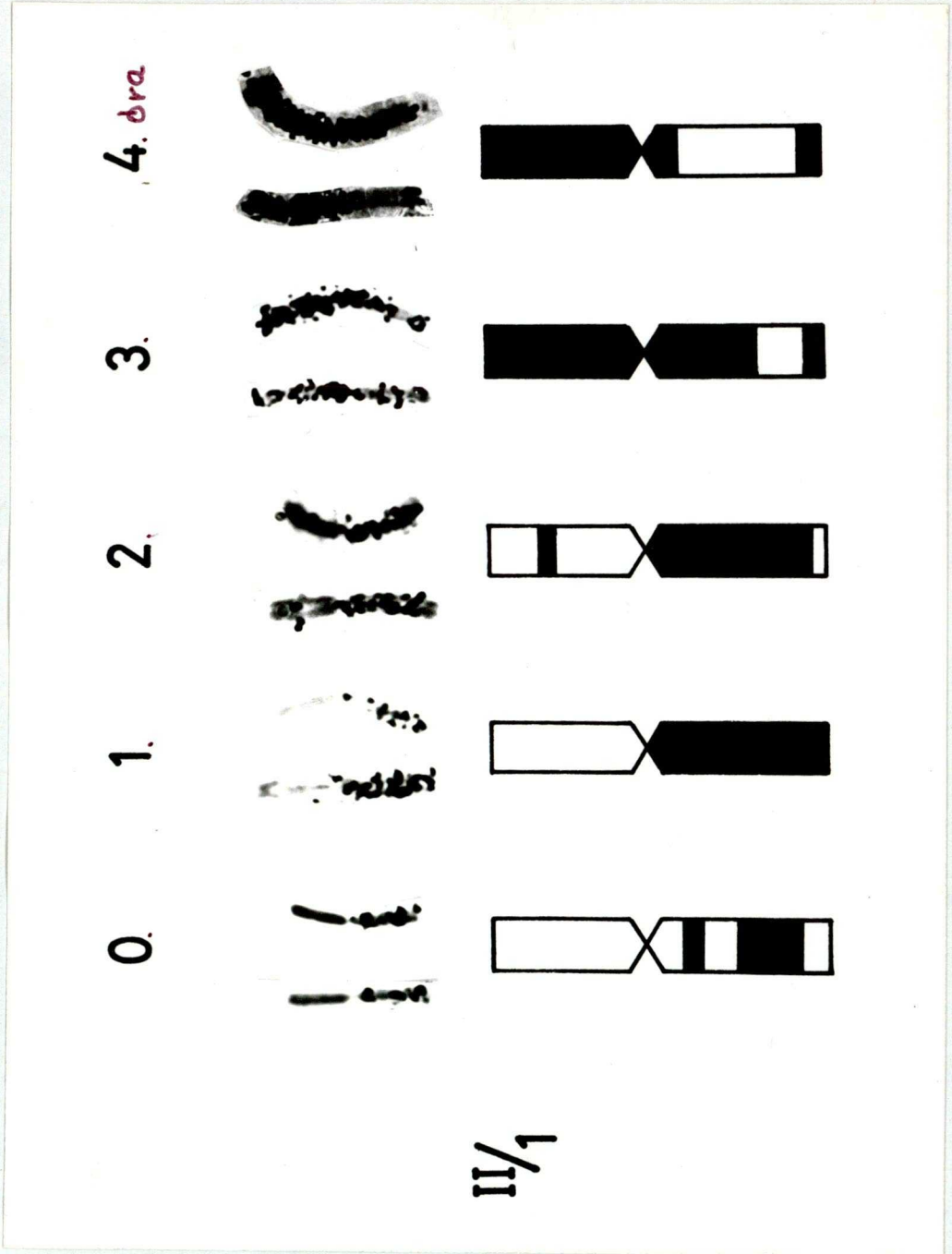
z csirke vörösvérsejt hibrid sejtben jelenlevő idegen információ replikálódásának van-e kitüntetett időpontja a hibrid DNS szintézis fázisán belül, és ha van megegyezik-e ez a hörcsög sejt HGPRT génjének replikációs időpontjával, ennek a rendszernek a segitségével megvalósitható.

4/3 Vizsgálatok a CHO-K_1 sejtvonal kromoszómái replikációs mintázatának megállapitására.

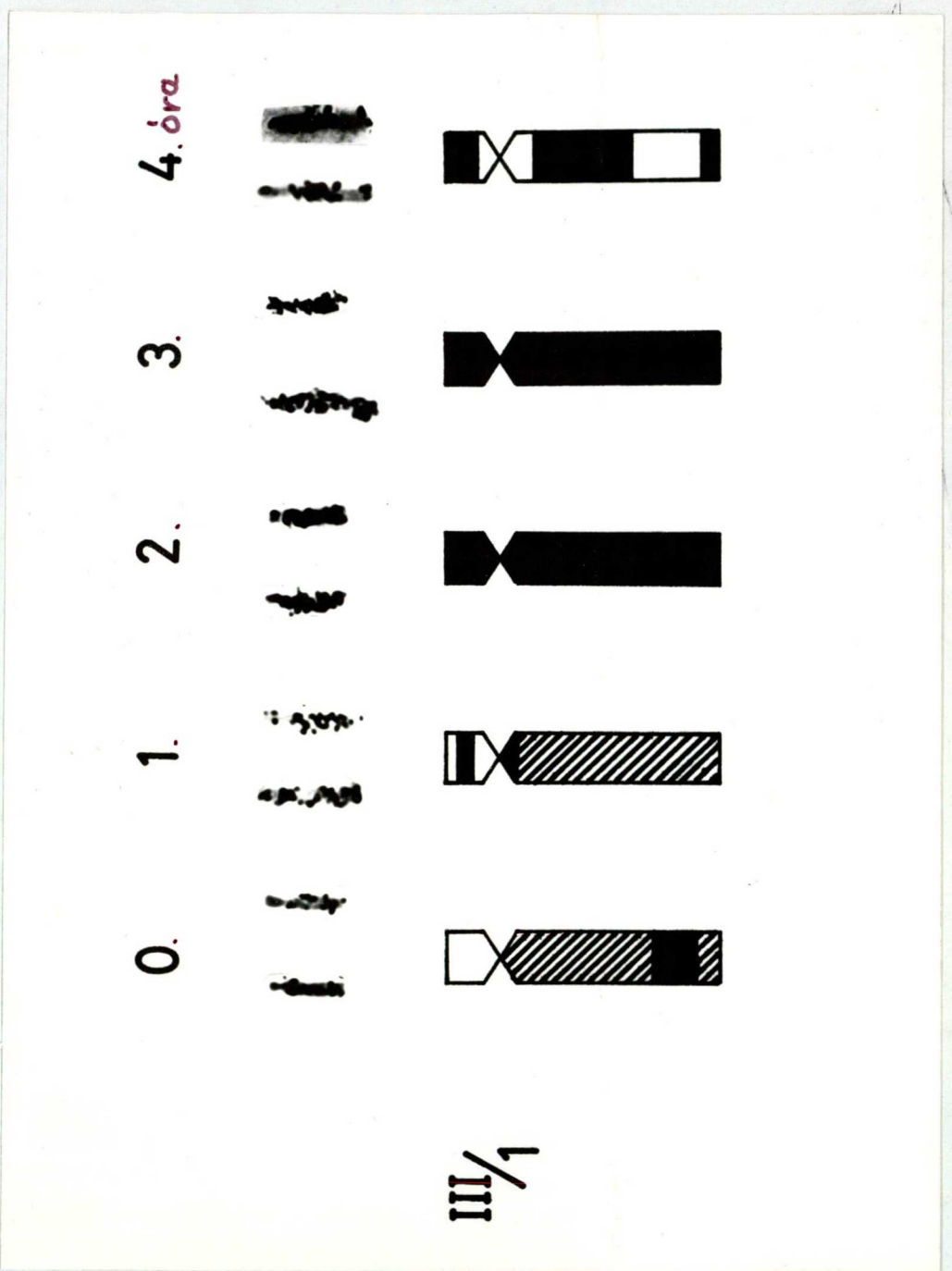
Mivel S fázisra igen pontosan szinkronizált kulturával rendelkeztünk, kisérletet tettünk a CHO-K_1 sejtvonal kromoszómái replikációs mintázatának megállapitására autoradiográfia segitségével. Az irodalomból eddig ilyen irányban csak kevés vizsgálódás történt. Ezeket ugynevezett "visszapörgetéses" módszerrel végezték, amelynek lényege az, hogy izotóp timidin pulzus jelölés után különböző időpontokban kromoszóma preparátumot készitettek és azt autoradiografálták. Az életciklus adatok birtokában valamint az izotóp pulzus után eltelt idő alapján következtetni lehet arra, hogy az adott preparátum az életciklusának mely részében kapta az izotóp timidin jelölést. Ily módon sikerült

megállapitani egyes kromoszómák későn replikáló-dó szegmentjeinek helyeit /24/, illetve Chunak sikerült a kinai hörcsög X kromoszómájának replikációs mintázatát leirnia /25/.

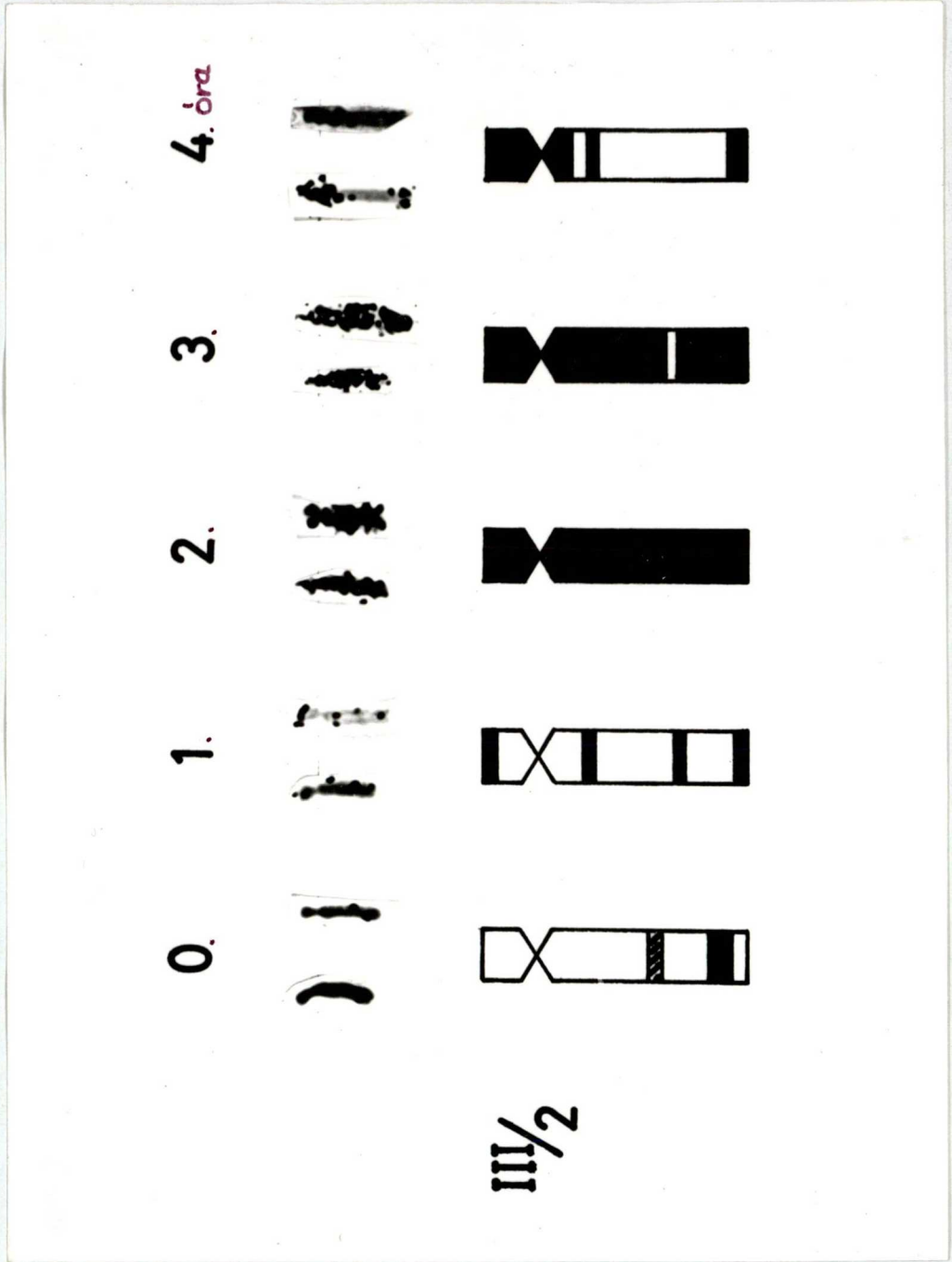
Mi felhasználva az S fázisra szinkron kulturát 0.; 1.; 2.; 3.; 4. órában 15 perces ^{3}H-TdR pulzusjelölést adtunk, majd a szinkron osztódásnak induló sejtekből kromoszóma preparátumot készitettünk és azt autoradiografáltuk. Saját rendszerünkben sikerült három kromoszóma replikációs mintázatát megállapitani /X; III/1; III/2/ /10-12. ábra/. Az X kromoszómára vonatkoztató megfigyelések megegyeznek az irodalomban leirtakkal, de részletesebb képet mutat, ugyanis eddig csak az volt ismeretes, hogy az X kromoszóma egyik fele az S fázis elején, a másik fele az S fázis második felében replikálódik. A másik két kromoszóma /III/1; III/2; 11-12. ábra/ replikációs mintázata eddig nem volt ismert. A többi kromoszómára vonatkozólag hasonló replikációs mintázat a jelenlegi technikával nem adható meg, bár valószinü, hogy az izotóp jelölés hosszának változtatásával illetve az autoradiográfiás technika finomitásával ezekre is nyerhetők adatok.



10. ábra A CHO-K_1 sejt X kromoszómájának replikációs mintázata.



11. ábra. A CHO-K_1 sejt III/1 kromoszómájának replikációs mintázata.



12. ábra. A CHO-K_1 sejt III/2 kromoszómájának replikációs mintázata.

Ennek a módszernek a finomitásával, összekapcsolva az előzőekben leirt mutációs rendszerrel, mód nyilhat arra, hogy egy sejt DNS replikációját vizsgálhassuk mind genom, mind kromoszómális szinten, ami segitséget nyujt ahhoz, hogy a sejtciklus S fázisának történéseit jobban megértsük.

5. MEGBESZÉLÉS

Mivel emlős sejtekkel dolgoztunk és egy, a bakteriális konjugációs géntérképezéshez hasonló időbeli térképezési rendszert dolgoztunk ki, az eredmények értékelésekor figyelembe kell venni az emlős DNS szerveződésének és replikációjának lényegesen bonyolultabb voltát. Egy emlős sejt kb. 1000-szer több DNS-t tartalmaz, mint egy E.coli baktérium. DNS replikációja, szemben a baktériummal, egy időpillanatban 10^3-10^4 replikációs pontban folyik. Tehát amikor egy kiválasztott mutáció alapján meghatározzuk a mutációért felelős gén replikálódási időpontját, figyelembe kell venni, hogy abban az adott időpontban még további 10^3-10^4 gén replikációja folyik.

Egy másik probléma, amelyet nem lehet figyelmen kivül hagyni az, hogy az emlős sejtek diploid állapotuak. Tehát elvben egy mutációnak a gyakorisága $1x10^{-12}$ nagyságrendben kellene lennie /$1x10^{-6}$ mutációs gyakoriságot feltételezve az egyik allélra/. Az, hogy $1x10^{-6}$ nagyságrendben mégis lehet mutánsokat izolálni azt mutatja, hogy egyes gének valószinüleg haploid állapotban vannak jelen a genomban. Ennek oka részben a sejtkulturákban végbemenő kromoszómaátrendeződés részben az X kromoszómán levő gének esetén az egyik X kromoszóma inaktiválódása illetve him állatból származó sejtvonal esetén az X kromoszóma haploid állapota lehet. A HGPRT génről kimutatták, hogy X kromoszómához lokalizált /26/ a CHO sejt esetén is /27/, amely kinai hörcsög ováriumból előállitott sejtvonal. Kromoszómái csak részben egyeznek meg az állatban található kromoszómákkal, viszont DNS tartlma 97 %-a az állaténak. Az egyik X kromoszóma intakt állapotban van jelen, a másik valószinüleg a sejtvonalban jelenlévő "uj" kromoszómák alkotásában vesz részt /28/. Mivel a $HGPRT^{-}$ mutációs gyakoriság $4x10^{-6}$ nagyságu, ez valószinüleg egyetlen mutációt

jelent, amely a gén haploid állapotára utal. Esetünkben az nem ismert, hogy a másik HGPRT allél elvesztéséről vagy inaktiválásáról van-e szó. Mivel kimutatható, hogy a CHO-K_1 sejtvonal X kromoszómájának egyik karja az S fázis első felében replikálódik /26 és ezen munka/ valószinüsithetjük, hogy a HGPRT gén az X kromoszómának ezen a karján található.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A/ Kinai hörcsög sejtből egy igen pontosan S fázisra szinkronizált kulturát állitottunk elő magas koncentrációju timidin és hidroxiurea kombinált kezeléssel.

B/ Sikerült egy olyan genetikai rendszert összeállitani, amely segitségével egy adott gén replikálódásának időpontja megállapitható a DNS szintetizáló fázison belül. Ennek a segitségével megállapitottuk a CHO-K_1 sejtvonal HGPRT génjének replikálódási időpontját. Az általunk kiépitett rendszer módot ad további gének replikálódási időpontjának megállapitására is emlős sejtekben, genetikai módszerekkel.

C/ A szinkron kultura további alkalmazásával megállapitottuk a CHO-K_1 sejtvonal három kromoszómájának a replikációs mintázatát autoradiográfiás módszerrel. Ebből az X kromoszóma replikációja az irodalomból ismert volt, ezt a jelen technikával finomitani lehetett. A másik két kromoszómára vonatkozó adatok /III/1; III/2/ eddig nem voltak ismertek.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Harris, H. Behaviour of Differentiated Nuclei in Heterokaryons of Animal Cells from Different Species
Nature 206 583 /1965/

2. Harris,H; Watkins,J F; Ford C.E.; Schoefl G.I. Artificial Heterokaryons of Animal Cells from Different Species
J. Cell Sci. 1 1 /1966/

3. Harris,H; Cook,P. Synthesis of an Enzyme Determined by an Erithrocyte Nucleus in Hybrid Cell
J. Cell Sci. 5 121 /1969/

4. Cook,P. Species Specificity of an Enzyme Determined by an Erithrocyte Nucleus in an Interspecific Hybrid Cell
J. Cell Sci. 7 1 /1970/

5. Schwarz,A.G; Cook,P; Harris,H. Correction of a Genetic Defect in Mammalian Cell
Nature NB 230 5 /1971/

6. Kao,F.T. Identification of Chick Chromosomes in Cell Hybrides Formed Between Chick

Erithrocytes and Adenine-Requiring
Mutants of Chinase Hamster Cells
Proc. Natl. Acad. Sci. 70 2893 /1973/

7. Dallmann,L; Harris,H. The Fate of the Incroporated
Foreign Gene In Vivo
Közlés alatt

8. Balázs,I; Brown,E.H; Schildkraut,C.L. The Temporal
Order of Replication of Some DNA Cistrons
Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol.
vol.38., pp. 239 /1973/

9. Dawes,I.W; Carter,B.L.A. Nitrosoguanidine Muta-
genesis During Nuclear and Mitochondrial
Gene Replication
Nature 250 709 /1974/

10. Orkin,S.H; Littlefield,J.W. Nitrosoguanidine
Mutagenesis in Synchronised Chinase Hamster
Cells
Exp. Cell Res. 66 69 /1971/

11. Trautner,T.A; Schwartz,M.N; Kornberg,A. Enzymatic
Synthesis of Deoxyribonucleic Acid X.
Influence of Bromuracil Substitutions on
Replication
Proc. Natl. Acad. Sci. 48 449 /1962/

12. Kao,F.T; Puck,T.T. Induction and Isolation of Auxotrophic Mutants in Mammalian Cells Methods in Cell Biology vol. 8. pp.23. /1974/

13. Thompson,L.H; Baker,R.M. Isolation of Mutants of Cultured Mammalian Cells Methods in Cell Biology vol. 6. pp.288 /1973/

14. Thompson,L.H; Harkins,J.L; Stanners,C.P. A Mammalian Cell Mutant with a Temperature--Sensitive Leucyl-Transfer RNA Synthetase Proc. Natl. Acad. Sci. 70 3094 /1973/

15. Ham,R.G. Clonal Growth of Mammalian Cells in a Chemically Defined Synthetic Medium Proc. Natl. Acad. Sci. 53 288 /1965/

16. Ham,R.G; Puck,T.T. Quantitative Colonial Growth of Isolated Mammalian Cells Methods in Enzymology vol. 5. pp. 90.

17. Galvazi,G; Bootsma,D. Synchronisation of Mammalian Cells In Vitro by Inhibition of the DNA Synthesis Exp. Cell Res. 41 438 /1966/

18. Reichard,C. Control of Deoxyribonucleotid Synthesis In Vitro and In Vivo Edvances in Enzyme Regulation vol. 10. pp.3.

19. Plagemann,P.G.W; Erbe,J. Intracellular Conversions of Deoxyribonucleosides by Novikoff Rat Hepatoma Cells, an Effect of Hydroxyurea J.Cell. Physiol. 83 321 /1974/

20. Schor,S.L; Johnson,R.T; Waldren,C.A. Changes in the Organisation of Chromosomes During the Cell Cycle: Response to Ultraviolet Light
Közlés alatt

21. Tobey,R.A; Ley,K.D. Isoleucine-mediated Regulation of Genom Replication in Various Mammalian Cell Lines
Cancer Research 31 46 /1971/

22. Meyn,R.E; Hewitt,R.R; Humphrey,R.M. Evaluation of S Phase Synchronisation by Analisis of DNA Replication in 5-Bromodezoxyuridine Exp. Cell Res. 82 139 /1973/

23. van Zeeland,A.A; van Diggelen,M.C.E; Simons, J.W.I.M. The Role of Metabolic Cooperation in Selection of Hypoxanthine-Guanine--Phosphoribosyl transferase Deficient Mutants from Diploid Mammalian Cell Strains
Mutation Res. 14 355 /1972/

24. Taylor,J.H. Asynchronous Duplication of Chromosomes in Cultured Cells of Chinase Hamster
J. Biophys. Biochem. Cytol. 7 455 /1960/

25. Utakoji,T; Hsu,T.C. DNA Replication Pattern in Somatic and Germ-line Cells of the Male Chinese Hamster.
Cytogenetics 4 295 /1965/

26. Seegmiller,J.E; Rosenbloom,F.M; Kelley,W.N. Enzyme Defect Associated with a Sex-linked Human neurological Disorder and Excessive Purin Synthesis
Science 155 1682 /1967/

27. Westerweld,A; Visser,R.P.L.S ; Freeke,M.A. Evidence for Linkage Between Glucose-6-Phosphate Dehidrogenase and Hypoxanthine-Guanine--Phosphoribosyl Transferase Enzyme Loci

in Chinese Hamster Cells
Biochem. Genetics 5 591 /1971/

28. Deaven,L.L; Petersen,D.F. The Chromosomes of CHO an Aneuploid Chinese Hamster Cell Line: G-band, C-band and Autoradiographic Analyses
Chromosoma 41 129 /1973/

Köszönetet mondok a Szegedi Biológiai Központ
Genetikai Intézet dolgozóinak, hogy munkámat segitették.

József Attila Tudományegyetem Könyvtár Egyetem SZEGED