

SZÖVETTENYÉSZETEK FELHASZNÁLÁSA A GLUKOKORTIKOID HATÁSMECHANIZMUS KUTATÁSBAN

VENETIANER ANIKÓ

MTA Biológiai Központ Genetikai Intézete, Szeged

A szteroid-hormon hatásmechanizmus kutatásban az elmúlt években egyre nagyobb szerepet kapott a szteroidokat specifikusan kötni képes *receptorok* vizsgálata. Receptornak a következőkben azokat a specifikus intracelluláris makromolekulákat nevezzük, amelyek a szteroidok felismerésére és reverzibilis megkötésére képesek. A különböző típusú szteroidok — glukokortikoid, mineralokortikoid, ösztrogén, androgén, progeszteron — úgynevezett célpont szerveiben az adott szteroidot aktív formában specifikusan kötő citoplazmatikus receptorok mutathatók ki. Nem állíthatjuk teljes biztonsággal, hogy minden potenciálisan szteroid érzékeny sejtben található specifikus receptorok, de azt igen, hogy minden, eddig vizsgált szteroidérzékeny sejtben kimutathatók a receptorok. Jelenlegi ismereteink alapján e receptorok kulcsfontosságúak a szteroidok biológiai hatásában, a citoplazmatikus receptorok jelenléte általában szteroidérzékenységgel (szteroidra való válaszolási képességgel), hiánya szteroid érzéktelenséggel (a válaszadás hiányával) jár együtt.

A szteroid-hormonok hatásmechanizmusának molekuláris alapjai még nem tisztázottak. E hormonok keletkezési helyükről a véráram segítségével jutnak el célpont szerveikhez, ahol az úgynevezett receptor modell szerint szabadon belépnek a sejtekbe és kötődnek a citoplazma oldható fehérje receptoraihoz (R). A szteroid-receptor komplex (SR) egy vagy több hőmérséklet függő lépés révén aktív komplexszé (SR⁺) alakul, mely a sejtmagba lépve a sejtmag receptor kötőhelyeihez (NR), feltehetően a DNS-hez és fehérjékhez kapcsolódik a kromatinon. A szteroid kapcsolódása a citoplazmatikus receptorokhoz elengedhetetlen a biológiai hatás szempontjából, a szteroid egyedül, citoplazmatikus receptor nélkül biológiailag nem hatásos. A citoplazmatikus receptorok fontosságára utal a hormon—receptor kölcsönhatás és a hormon biológiai aktivitása közötti korreláció is (glukokortikoidok). A szteroidok korai hatásaként fokozódik pl. az RNS, fehérjeszintézis, és — pillanatnyilag még ismeretlen folyamatok eredményeképpen — létrejön a specifikus hormonválasz, amely a különböző szövetekben még azonos hormon esetében is igen eltérő lehet. Nyitott kérdés, hogyan jön létre az adott hormonra a szövetspecifikus válasz, és hogy mi biztosítja a receptorok specifikus szteroidkötő képességét.

A szteroid—receptor kölcsönhatás vizsgálatára többféle módszer ismert; pl. a sejtfractionálás, autoradiográfia [33] és a specifikusan kötött szteroidok elválasztása a nem specifikusan kötött hormontól [2].

A receptor kutatás legfontosabb állomásai a következők: 1. radioaktív szteroidok felvételének és retenciójának a vizsgálata, 2. a hormon biológiailag aktív formájának azonosítása, 3. az aktív szteroidokat nagy affinitással, specifikusan kötő receptorok kimutatása, jellemzése, tisztítása, biológiai szerepük megállapítása 4. a szteroid-receptor kölcsönhatás molekuláris alapjainak, a hormon-receptor komplex gén expressziót reguláló hatásának vizsgálata. A továbbiakban az utolsó két problémakör néhány olyan kérdéssel foglalkozunk, amelyeknél a szövettenyésztés technikája lényeges új eredményeket hozott a glukokortikoidok hatásmechanizmus vizsgálatában.

Glukokortikoidok

A mellékvesekéreg hormonok közül a következőkben a szénhidrátforgalomra ható glukokortikoidokkal foglalkozunk. A glukokortikoidok (pl. kortizon, kortizol, kortikoszteron) érdekes tulajdonsága, hogy az aránylag nagy számú érzékeny szervben, szövetben teljesen eltérő hormonválaszt eredményeznek. Egyeseknél makromolekula szintézis fokozódás, enzim indukció, (anabolikus hatás), másoknál makromolekula szintézis gátlás, sejthalál jön létre (katabolikus hatás). A biológiai hatás különbözősége ellenére az összes glukokortikoid érzékeny sejtekben kimutathatók a biológiailag aktív glukokortikoidokat specifikusan, nagy affinitással kötő citoplazmatikus receptorok, [16], amelyek a hormonnal komplexet képezve aktivált formában bejutnak a sejtmagba, ahol valószínűleg a DNS-hez kapcsolódnak [3]. A receptorok savas, cisztein tartalmú fehérjék, észlelt nagyságuk erősen függ az izolálás körülményeitől. A glukokortikoidok hatásának vizsgálatát nehezíti, hogy az érzékeny sejtek egyéb szteroidokat is megkötnék, a glukokortikoidok erőteljesen metabolizálódnak (pl. májban). A glukokortikoid érzékeny rendszerek nagy száma a vizsgálati módszerek különbözőségét eredményezi, ami az összehasonlító vizsgálatokat nehezíti. A glukokortikoid hatásmechanizmus vizsgálatokban egyre nagyobb szerepet játszanak a szintetikus származékok, pl. a dexametazon vagy triamcinolon, melyek kevésbé metabolizálódnak a természetes analógoknál és nem kötődnek lényegesen a szérum glukokortikoid receptoraihoz [9].

A máj a glukokortikoidok úgynevezett célpont szerve, a szteroid katabolizmus és a szteroid kötő proteinek szintézisének helye. A májban a glukokortikoidok hatására a glukoneogenesis fokozódik, és bizonyos már specifikus enzimek (pl. a tirozinaminotranszferáz -TAT- [2], triptofánpirroláz [18]) indukálódnak. A májból izolált „binder II” jelzésű protein [25] feltehetően a

specifikus glukokortikoid receptor, amely nagy affinitással, reverzibilisen, gyorsan köti a biológiailag aktív természetes és mesterséges glukokortikoidokat, és csak kis mértékben az inaktívokat.

Glukokortikoid hatás vizsgálata hepatoma sejtekkel

A 60-as években karcinogénnel kezelt patkány hepatomájából THOMPSON és munkatársai [43] *in vitro* fenntartható, hipotetraploid hepatoma sejt vonalat hoztak létre (HTC: Hepatoma Tissue Culture), amelyben, hasonlóan egyéb hepatomákhoz [31], glukokortikoidokkal TAT enzim indukálható. Ezzel megnyílt az út a glukokortikoid hatásmechanizmusának *in vitro* vizsgálatához szövettényészetek segítségével.

TOMKINS és munkatársai HTC sejtek ³H-dexametazon felvételét vizsgálták [4, 37] és megállapították, hogy a hepatoma sejtekben is meglévő nagy affinitású specifikus glukokortikoid (dexametazon) kötőhelyek telítéséhez ugyanolyan szteroid koncentráció szükséges, mint a TAT indukálásához. A nagy affinitású kötőhelyek megtalálhatók a sejthomogenizátum citoszoljában és sejtmagjában is [3, 4], de ez utóbbi nem képes a szteroid közvetlen megkötésére. A specifikus dexametazon kötőhelyek száma kb. 150 000/sejt, melyek 5×10^{-8} M körüli dexametazon koncentrációnál telítődnek. A citoplazmatikus receptorok szteroid specifikitásának vizsgálatát BAXTER és TOMKINS [2] végezte. Kimutatták, hogy a nagy affinitású kötőhelyekért csak azok a szteroidok versengenek a dexametazonnal, amelyek maguk is képesek a TAT indukációjára vagy szupressziójára (1. táblázat). SAMUEL és TOMKINS [37] nomenklatúrája szerint az úgynevezett optimális és szuboptimális inducerek különböző mértékű TAT indukciót okoznak, az anti-inducerek maguk nem indukálják a TAT-t, azonban szupresszálják az inducerek hatását. A 20- α -hidroxikortizol kivételével csak az inducerek és anti-inducerek versengenek a citoplazmatikus dexametazon kötőhelyekért, a TAT indukciót nem okozó inaktív szteroidok számottevően nem vesznek részt a kompetícióban. Az aktív inducerek nagyobb affinitással kötődnek a specifikus kötőhelyekhez, mint a kevésbé aktívak.

SAMUEL és TOMKINS szerint [37] az inducerek és anti-inducerek biológiai aktivitás különbségének az az oka, hogy az anti-inducerek a receptorok úgynevezett inaktív, az inducerek az aktív konformációjának kialakulását segítik elő. Az anti-inducerek megakadályozzák a dexametazon sejtmagba jutását, amely a receptor modell szerint elengedhetetlen a biológiai hatáshoz. A receptor-inducer komplex a sejtmagban valószínűleg a DNS-hez kötődik, míg az anti-inducer receptor komplex nem kötődik [3]. A HTC sejtek ³H dexametazonnal történő inkubációja 37 °C-on a sejtmag erőteljes jelölését eredményezi, 0–4 °C-on a sejtmagi kötődés visszaszorul. A sejtmag glukokortikoid

I. táblázat

Különböző szteroidok hatása a ^3H -dexametazon HTC sejtek citoplazma receptoraihoz való kötődésére

Nem-radioaktív szteroid (10^{-8}M)	Biológiai aktivitás (37) (TAT indukáció)	^3H -dexametazon kötődés (2) (10^{-8}M)
Tetrahydrokortizol	} inaktív	100
Epikortizol		101
20- β -hidroxikortizol		99
androsztendion		92
20- α -hidroxikortizol		79
Kortizon	} anti-inducer	39
Tesztoszteron		31
Ösztradiol-17 β		27
17- α -metiltesztoszteron		25
5- α -dihidro Kortizol	} szuboptimális inducer	11
17- β -hidroxiprogesteron		10
17- α -hidroxiprogesteron		0
Kortikoszteron	} optimális inducer	2
Kortizol		0
Dexametazon		0

kortikoid kötőhelyei specifikálásának vizsgálatával megállapítható, hogy a TAT indukálására, illetve ennek szupressziójára képes szteroidok, és csak ezek versengenek a specifikus sejtmagi kötőhelyekért [4]. A HTC sejtek sejtmagi receptorainak száma kb. 20 000 [16]. A hepatoma citoplazmatikus receptor-dexametazon komplexe cukor gradiensen alacsony ionerősségnél 6–8 S, magas ionerősségnél 4 S szedimentációs koefficiensű fehérje [2], amelyben az aktív konfiguráció fenntartásához az —SH csoportok jelenléte szükséges. A dexametazon kötődése a receptorokhoz stabilizáló hatású [36]. A citoplazmatikus és sejtmagi receptorok tisztítása, jellemzése és összehasonlító vizsgálata nagyon fontos lenne a biológiai hatás jobb megismerése szempontjából.

Glukokortikoidok vizsgálata Hela sejtekkel

Hela sejtek egyes sejtvonalaiban glukokortikoidokkal bizonyos enzimek, pl. alkalikus foszfatáz [6, 25] aktivitása fokozható. Az enzim indukció tanulmányozására leginkább az indukálható Hela 65 és a konstitutív Hela 71 sejtek használatosak. CoX vizsgálatai szerint a különböző szteroidok alkalikus foszfatáz indukció szempontjából inducerek, anti-inducerek és inaktív hormonok lehetnek (l. hepatoma).

A radioaktív glukokortikoid kötődési vizsgálatokból kitűnik, hogy a HeLa 65 specifikus citoplazma és sejtmag kötőhelyeket tartalmaz [27, 28]. Egyes adatok arra utalnak, hogy a HeLa sejteknél a specifikus receptorok a sejtfelszínen, illetve a sejtmagban helyezkednek el [27, 28]. Fontos lenne az indukálható és konstitutív HeLa receptorok mennyiségi és minőségi összehasonlítása. A májra, hepatomára, illetve Helára gyakorolt anabolikus hatással ellentétben a glukokortikoidok gátolják a glukózfelvételt, makromolekula szintézist stb., többek között a bőrben, timuszban, limfoid tumorokban. Továbbiakban e katabolikus hatás néhány kérdéséről szólunk.

Glukokortikoidok hatása limfocitákra és limfoid tumorokra

A glukokortikoidok ismert gyulladásgátló hatása a limfoid szövetek szelektív elpusztításának a következménye [8]. A limfociták specifikus glukokortikoid kötőhelyeinek tanulmányozását a nagy mennyiségben jelenlevő nem specifikus kötőhelyek igen nehéz feladattá teszik [29]. Az eddig ismertetett rendszerekhez hasonlóan a biológiailag aktív glukokortikoidok a citoplazma nagy affinitású kötőhelyeivel komplexet képezve, hőmérséklet függő aktiválás után belépnek a sejtmagba. A specifikus kötőhelyek kompetíciós vizsgálata szerint a limfocitáknál a 11-dezoxiszteroidok anti-glukokortikoid hatásúak, melyek önmagukban nem gátolják a glukóz felvételt, de szupresszálják pl. a kortizol glukóz felvételt gátló hatását [29]. Érdekes módon egyes antiglukokortikoidok, pl. a 11-dezoxi-17-hidrokkortikoszteron, belépnek és kötődnek a limfocita sejtmaghoz [16].

A glukokortikoidok bizonyos malignus limfoid tumorokat is elpusztítanak. A hormonkezelés folyamán könnyen kialakul a szteroidokkal szemben rezisztencia, melynek vizsgálata nemcsak a klinikum számára nyújthat segítséget, hanem hozzájárulhat a szteroid hatásmechanizmus jobb megértéséhez is. A szteroid rezisztens sejtekben nem jön létre a hormonra specifikus válasz. A kérdés az, hogy a szteroidok biológiai aktivitásában kulcsszerepet játszó citoplazmatikus receptorok száma, szteroidkötő képessége megváltozik-e a rezisztens sejtekben, illetve, hogy milyen egyéb mechanizmusok vezethetnek a szteroid rezisztencia kialakulásához.

P 1798 tumor: a Balb/c egér timusz tumorából [26] nyert glukokortikoid érzékeny és érzéketlen limfoszarkóma sejtvonalak segítségével a szteroidválasz és a szteroidkötő képesség közti összefüggés jól vizsgálható. A glukokortikoidok csak az érzékeny limfoszarkóma glukóz felvételét gátolják, a rezisztensét nem [34]. Az érzékeny sejtek citoplazmájának szteroidkötő képessége sokkal nagyobb, mint a rezisztenseké [17]. A szenzitív sejtek specifikus kötőhelyeiért csak a biológiailag aktív glukokortikoidok és a progeszteron versengenek [11]. HOLLANDER és munkatársai [12] vizsgálatai szerint a limfaszarkóma receptorok a normális limfoid szövetekéhez hasonlóak.

Egér limfomából nyert folyamatosan *in vitro* tenyésztett [13] glukokortikoid érzékeny és rezisztens sejtvonalak glukokortikoid kötő képessége lényegesen különbözik: a szteroid kezelést túlélő rezisztens populáció csökkent glukokortikoid kötő aktivitást mutat [37]. A szteroid rezisztens sejtek nagysága, növekedési rátája, kariotípusa stb. az érzékennyel megegyező. ROSENAU és munkatársai sejtmentes rendszer alkalmazásával megállapították, hogy a rezisztens limfóma dexametazon kötő képessége kb. 10%-a az érzékennynek, a sejtmag specifikus kötőképessége viszont azonos az érzékeny és rezisztens sejteknél. Ezek az adatok a specifikus citoplazma receptorok fontosságára utalnak a szteroid válasz létrejöttében, a szteroidnak a sejtmagba való szállításában.

A szteroid rezisztencia kialakulása sok esetben a citoplazma receptorok számának, szteroidkötő kapacitásának csökkenésével, defektív receptorok létrejöttével magyarázható. A rezisztencia kialakulásának más okai is lehetségesek. SIBLEY és TOMKINS [38] *in vitro* tenyésztett egér limfóma sejtek mutagenézisével és a glukokortikoid rezisztens sejtek szelekciójával különböző típusú rezisztens sejteket nyertek, melyeket a ^3H -dexametazon kötő képesség és a radioaktív szteroid sejtből való megoszlása alapján több csoportra osztottak [39]. A sejtek kb. 80%-a csökkent mennyiségű specifikus citoplazma receptort tartalmazott, a visszamaradó kb. 20%-a szteroid-receptor komplex sejtmagba való szállításában, illetve valamilyen további lépésben deficiens. A szteroid-receptor kötés mennyiségi és minőségi vizsgálata alapján valószínűsíthető, hogy némelyik rezisztens variáns az érzékenytől eltérő receptort tartalmaz. Ezek a vizsgálatok elméleti jelentőségük mellett arra is felhívták a figyelmet, hogy egyes alkiláló — melyeket a szerzők a rezisztens sejtek gyakoriságának növelésére használtak az egér limfóma rendszerben —, szteroidokkal kombinált használata a klinikumban bizonyos malignus betegségek kezelésére elkerülendő. A különböző típusú rezisztens sejtek további vizsgálata azt mutatta, hogy *in vivo* körülmények között [49] a szteroid-receptor komplex elsődleges kötőhelye a sejtmagban feltehetően a DNS.

Humán akut limfoblasztos leukémiás betegek limfoblasztjaiban specifikus szteroid kötő proteinek találhatók, amelyek szteroid kötő képessége arányos a hormon biológiai hatásosságával, öltő képességével [22]. A glukokortikoid rezisztencia kemoterápia során gyakran kialakul, amely többnyire a szteroid kötő képesség és a szteroid válasz megszűnésével jár. A specifikus citoplazma glukokortikoidok receptorok jelenléte a malignus sejtekben nem feltétlenül jelent szteroid érzékenységet, ismeretesek a specifikus citoplazma receptorokat az érzékeny sejtekkel megegyező mennyiségben tartalmazó egér és humán leukémia blasztsejtek is [23].

Glukokortikoid hatás vizsgálata fibroblaszt sejtekkel

Egér fibroblaszt úgynevezett L sejtek növekedés, e glukóz felvétele, makromolekula szintézise alacsony koncentrációjú glukokortikoidokkal gátolható [32]. A fibroblaszt sejtek nagy affinitású, kis kapacitású specifikus glukokortikoid kötőhelyeiért csak a biológiailag aktív glukokortikoidok versengenek. Glukokortikoid rezisztens L sejtek állíthatók elő hosszú ideig tartó glukokortikoidon való tenyésztéssel [1], és a sejtek mutagén kezelésével [47]. A rezisztens sejtek növekedése, makromolekula szintézise glukokortikoidokkal nem vagy csak kis mértékben gátolható. A rezisztencia kialakulása többnyire a citoplazma receptorok mennyiségének csökkenésével, néhány esetben a szteroid-receptor komplex sejtmagba történő szállításának megváltozásával jár együtt. Érdekes csoportja a rezisztens sejteknek a citoplazmatikus receptorokat az érzékeny sejtekkel megegyező mértékben tartalmazó fibroblasztok, amelyek a szteroid receptor komplexet az érzékeny sejtekkel megegyező mértékben szállítják a sejtmagba [47].

Szomatikus sejthibridek felhasználása a glukokortikoidok gén expressziót reguláló hatásának vizsgálatára

Mint ismeretes, a szomatikus sejtek hibridjei igen hasznosak a sejtek kontroll mechanizmusainak, a génextpresszió szabályozásának, a differenciálódás, stb. megismerésében. Egymástól eltérő tulajdonságú szülői sejtek hibridjeiben tanulmányozható pl. az adott tulajdonság domináns vagy recesszív volta, megfelelő mutáns esetében komplementációs analízis, illetve a kromoszóma szegregáció nyomon követésével bizonyos tulajdonságok kromoszomális lokalizációja végezhető el [10].

A glukokortikoidokra eltérő módon válaszoló sejtek hibridjeinek vizsgálatával információt kaphatunk pl. a szteroid rezisztencia domináns vagy recesszív voltáról, a TAT indukció szabályozásáról, vagy a specifikus szteroid receptorok szerepéről a hormonválasz létrejöttében.

Hepatoma-egér fibroblaszt hibridek vizsgálata [19, 24]. Az előzőekben már szó volt arról, hogy a patkány hepatoma sejtekben glukokortikoidokkal TAT enzim indukálható (differenciálódott funkció). E szteroidok nem befolyásolják a HTC sejtek növekedését, glukóz hasznosítását stb. Egér fibroblaszt sejtekben a glukokortikoidok gátolják a sejtek növekedését, makromolekula szintézisét, glukóz felvételét stb, és nem indukálnak TAT-ot. Mindkét sejt vonal tartalmaz specifikus glukokortikoid receptorokat. A kérdés az, hogy az ugyanarra a szteroidra eltérően válaszoló két szülő hibridjeiben milyen glukokortikoid válasz jön létre, és mi ebben a glukokortikoid receptorok szerepe. A sejthibridek standard technikával, inaktivált Sendai vírus segít-

ségével állíthatók elő. A hibridizációban használt HTC sejtek hipoxantin-guanin-foszforiboziltranszferáz (HGPRT) mínusz, az L sejtek timidin kináz (TK) mínusz sejtek, a hibridek szelekciója hipoxantin, aminopterin, timidint (HAT) tartalmazó táptalajon történik. A HTC és L sejtek hibridjei az egér sejtekre jellemző szteroid választ mutatják, a glukokortikoidok gátolják a hibridek makromolekula szintézisét, glukóz hasznosítását, és nem indukálják a TAT enzimet. A hibridek tartalmazzák mindkét szülő specifikus citoplazma receptorait, a sejtmagi receptorok, in vitro kísérletek szerint, különbséget tudnak tenni közöttük. Annak vizsgálatára, hogy az L sejt-specifikus válasz dominanciája és az L sejtek glukokortikoid receptorainak hibrid sejtekben való jelenléte között van-e összefüggés, glukokortikoid rezisztens L sejteket hibridizáltak HTC sejtekkel. Az így kapott hibridek a rezisztens L sejtekre jellemző hormonválaszt mutatják, vagyis a makromolekula szintézis, glukóz felvétel nem gátlódik glukokortikoid kezelésnél, azonban a TAT ezekben a hibridekben sem indukálható. A TAT indukció egyik típusú hibridben sem jelenik újra meg a hibridek folyamatos tenyésztése, illetve kromoszóma szegregáció folyamán. A $HTC \times L$ sejtek hibridjeiben a TAT indukció megszűnése nem a glukokortikoid receptorok elvesztésének a következménye, a hibridekben mindkét szülő receptorai jelen vannak. A TAT indukálhatóság elvesztése a hibridekben feltehetően nem kromoszóma veszteség eredménye, mert a hibridizáció után létrejövő heterokarionok, amelyekben még nem jöhet létre kromoszóma veszteség, sem mutatnak TAT indukálhatóságot [42]. A hepatoma egér fibroblaszt hibridekben tehát a TAT indukálhatóság valamilyen, feltehetően az egér sejtéből származó faktor következtében megszűnik, függetlenül az egér glukokortikoid receptorok komplett vagy inkomplett jelenlététől. Ebben a rendszerben nem sikerült eddig semmiféle összefüggést találni a TAT indukció és valamilyen specifikus kromoszóma jelenléte, illetve hiánya között. A TAT indukálhatóság megszűnésének okait keresve, gondolkodni kell pl. a HTC sejt citoplazma receptorok, a szteroid-receptor komplexszel kölcsönhatásba lépő, sejtmagban lévő specifikus kötőhelyek, a transzkripció megváltozására vagy valamilyen translációs kontrollra.

Patkány hepatoma és egér fibroblaszt hibrideknél elsősorban a patkány, patkány hepatoma és humán sejtek hibridjeinél a tenyésztés folyamán főleg a humán kromoszómák vesznek el, illetve szegregálódnak. A *humán-patkány hibrid* rendszer így alkalmas a humán kromoszómák regulációs szerepének tanulmányozására. CROCE és munkatársai [7] a TAT glukokortikoid indukálhatóságát vizsgálták humán diploid, nem differenciálódott embrió sejtek (TAT nem indukálható szteroidokkal) és patkány hepatoma sejtek hibridjeiben. Megállapították, hogy a humán X kromoszóma jelenléte a hibridekben a TAT indukciót szupresszálja, míg az X kromoszóma elvesztése a TAT indukció megjelenésével jár együtt. A kortikoszteroid receptorok mennyisége azonos az indukálható és nem indukálható hibridekben. A hibridek kario-

típusának, izoenzimjeinek részletes összehasonlító vizsgálata alapján valószínűsíthető, hogy a TAT indukció regulátor génje a humán X kromoszómán van.

A patkány hepatoma-egér, illetve patkány hepatoma-humán hibridek interspecifikus hibridek. WEISS és munkatársai intraspecifikus hibridekben, differenciálódott *patkány hepatoma* és *diploid epiteliális patkány májsejtek hibridjeiben* vizsgálták a TAT és egy másik máj specifikus enzim, az alanin aminoszferáz indukálhatóságát glukokortikoidokkal [40, 48].

A diploid dedifferenciálódott májsejtekben szteroid hormonokkal sem TAT, sem az alanin aminoszferáz enzim nem indukálható. A hibrid sejtek közül azokban, amelyek mindkét szülő teljes vagy közel teljes kromoszóma garnitúráját tartalmazták enzim aktivitás, illetve indukció nem, vagy csak igen kis mértékben fordult elő. Az erősen szegregálódott (kb. 30–40%-os kromoszóma vesztes) hibridek egy részében az enzim aktivitás, illetve indukálhatóság visszatért, de különböző mértékben. Ezekben a hibridekben az alanin aminoszferáz alapaktivitás és indukció megjelenése független a TAT indukció reexpressziójától. A kísérleti adatokból úgy látszik, hogy a differenciálódott funkció megszűnése specifikus kromoszómák folyamatos jelenlétével, reexpressziója specifikus kromoszómák elvesztésével függ össze, és hogy a két aminoszferáz regulációja függetlenül történik. A szegregálódott hibridekben a TAT alapaktivitás, és indukálhatóság egymástól függetlenül történt, ami TOMKINS és munkatársainak hipotézisét támasztja alá [46], mely szerint a TAT alapszintjét és indukcióját különböző gének regulálják. *Kínai hörcsög és hepatoma sejtek hibridjeinek* TAT indukálhatóságát vizsgálva hasonló következtetés vonható le.

A szteroid hormon érzékenység domináns vagy recesszív öröklődése glukokortikoid érzékeny és rezisztens *egér fibroblasztok hibridjeiben* jól tanulmányozható és megállapítható, hogy a hibrid sejtek szteroid válasza az érzékeny szülőéhez hasonló [47].

A szteroidok gén expressziót szabályozó hatásának néhány modellje

Az az alapkérdés, hogy hogyan hatnak a szteroid hormonok, még megválaszolatlan. A következőkben e hormonok gén expressziót befolyásoló hatásának néhány hipotetikus modelljét ismertetjük LIAO szerint [21].

A bakteriális operon elmélet analógiájára KARLSON [15] feltételezte, hogy a hormonok speciális *génrepresszorok inaktiválása* révén hatnak. A génrepresszor inaktiválása történhet a szteroid-represszor direkt kölcsönhatása révén — ez esetben a citoplazma receptorok szercepe a szteroidok sejtmagba szállítása [5] — vagy a receptor és represszor kölcsönhatása útján. A szteroid vagy a szteroid-receptor komplex direkt módon is gátolhatja a represszor szintézisét. TOMKINS és munkatársai [44, 45] *hepatoma sejtek tirozinamino-*

transzferáz indukciójának vizsgálata során a *poszttranszkripcionális represszor* elméletet állították fel. Megfigyelték, hogy a glukokortikoidokkal kezelt hepatoma sejtekben aktinomicin D hatására megnő a TAT indukció [41], ez a jelenség a szuperindukció. A szuperindukciót úgy magyarázták, hogy az aktinomicin D gátolja a hepatoma sejtek úgynevezett poszttranszkripcionális represszorának szintézisét. Ez a represszor gátolja a TAT mRNS-nek translációját és növeli a mRNS lebomlását. A szerzők feltételezték, hogy a szteroid-receptor komplex gátolja a poszttranszkripcionális represszor aktivitását a represszorral való direkt kölcsönhatás, vagy szintézisének gátlása révén. OHNO androgén hormonok receptorait vizsgálva [30] feltételezte, hogy az androgén receptor „*transzlációs gátló*”-ként hat a mRNS-hez való kötődés révén. Az androgén hormon azonban a receptorokhoz kapcsolódva megszünteti a receptorok translációt gátló hatását.

A fenti hipotézisek a génkifejeződés negatív regulációjának a példái voltak. Az úgynevezett *pozitív kontroll* hívei különböző reguláló faktorok jelenlétét feltételezik, hasonlóan a bakteriális rendszerekhez. LIAO és munkatársai [20] modellje szerint a szteroid-receptor komplex a sejtmagba lépve részt vesz az RNS szintézis, feltehetően az iniciálás szabályozásában. A szteroid-receptor komplex és egyéb fehérje faktorok bizonyos DNS szakaszokhoz, majd a specifikus RNS termékekhez kötődnek. A ribonukleoproteinhez kötött szteroid-receptor komplex ezután kilép a citoplazmába és részt vesz a fehérjeszintézisben. A szteroid-receptor komplexnek igen nagy szerepe van a működőképes ribonukleoproteinek létrejöttében.

JOST modellje [14] a szteroid hormonok és a 3',5' ciklikus AMP kölcsönhatását tételezi fel a gén regulációban. A modell fontos része az integrátor protein, amely szövetspecifikus, nem hiszton sejtmagi fehérje. Az integrátor fehérje képződését szövetspecifikus szteroidok szabályozzák. Az integrátor protein könnyen foszforilálódik, a 3', 5' cAMP a foszfokinázokat aktiválja, amelyek az integrátor fehérjét foszforilálják. A foszfoproteinek a struktúrgének promoterjéhez kötődnek és létrejön a transzkripció iniciálása. E modell szerint a cAMP a szteroid hatás modulátora lenne.

A sokféle szteroid hormon specifikus hatása ellenére a hatásmechanizmus bizonyos lépései meglepően hasonlók nemcsak a különböző szervezetekben, hanem pl. növényekben, ízeltlábúakban, különböző gerincesekben. A sok szempontból közös mechanizmus az alapfolyamatoknak az evolúció korai szakaszában való kialakulására utalnak. A szteroidok hatásmechanizmusának jobb megismeréséhez az eddigi technikák továbbfejlesztése (receptor izolálás és tisztítás, specifikus mRNS, represszor fehérje izolálás stb.) lenne szükséges. A szövettenyésztésnek, mint jól definiált in vitro módszernek a kiterjesztése a glukokortikoidok, ösztrogének, androgének mellett egyéb szteroidok biokémiai és genetikai vizsgálatára új lehetőségeket kínál a hormonok hatásának megismeréséhez.

IRODALOM

1. ARANOW, L., GABOUREL, J. D.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **111**, 348 (1963).
2. BAXTER, J. D., TOMKINS, G. M.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* **68**, 932 (1971).
3. BAXTER, J. D., ROUSSEAU, G. G., BENSON, C., GARCEA, L. L., ITO, J., TOMKINS, G. M.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* **69**, 1892 (1972).
4. BAXTER, J. D., TOMKINS, G. M.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* **65**, 709 (1970).
5. BEATO, M., BRAENDLE, W., BIESEWIG D., SEKERIS, D. E.: *Biochim. Biophys. Acta* **208**, 125 (1970).
6. COX, R. P., MACLEOD, C. M.: *J. Gen. Physiol.* **45**, 439 (1962).
7. GROCE, C. M., LITWACK, G., KOPROWSKI, H.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* **70**, 1268 (1973).
8. DOUGHERTY, T. F.: *Physiol. Rev.* **32**, 379 (1952).
9. FLORINI, J. R., BUYSKE, D. A.: *J. Biol. Chem.* **236**, 247 (1961).
10. HARRIS, H.: *Cell Fusion*, Clarendon Press, Oxford (1970).
11. HOLLANDER, H. CHIU, J. W.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 291 (1966).
12. HOLLANDER, N., STEVENS, A. W.: *Research on steroids*, Pergamon-Vieweg, Oxford 233 (1970).
13. HORIBATA, K., HARRIS, A. W.: *Exptl. Cell. Res.* **60**, 61 (1970).
14. JOST, H. P., AVERNER, M.: *J. Theor. Biol.* **49**, 337 (1975).
15. KARLSON, P.: *Percept. Biol. Med.* **6**, 203 (1963).
16. KING, R. J. B., MAINWARING, W. I. P.: *Steroid-Cell Interactions*, University Park Press, Baltimore (1974).
17. KIRKPATRICK, A. F., MILHOLLAND, R. J., ROSEN, F.: *Nature N. B.* **232**, 216 (1971).
18. KNOX, W. E., AUERBACH, V. H.: *J. Biol. Chem.* **214**, 307 (1955).
19. LEVISOHN, S. R., THOMPSON, E. B.: *J. Cell. Physiol.* **81**, 225 (1973).
20. LIAO, S., LIANG, T., TYMOCZKO, J. L.: *Nature N. B.* **241**, 211 (1973).
21. LIAO, S.: *Internat. Review of Cytology* **41**, 144 (1975).
22. LIPPMANN, M. E., HALTERMAN, R. H., LEVENTHAL, B. G., PERRY, S., THOMPSON, E. B.: *J. Clin. Invest.* **52**, 1715 (1973).
23. LIPPMANN, M. E., PERRY, S., THOMPSON, E. B.: *Cancer Res.* **34**, 1572 (1974).
24. LIPPMANN, M. E., THOMPSON, E. B.: *J. Biol. Chem.* **249**, 2483 (1974).
25. LITWACK, G., MOREY, K. S., KETTERER, B.: *The effect of drug on cellular control mechanisms*, Macmillan, London **95**, (1972).
26. MACLAMPKIN, J., POTTER, M.: *J. Nat. Cancer Inst.* **20**, 1091 (1958).
27. MELNYKOVYCH, G., BISHOP, C. E.: *Biochim. Biophys. Acta* **177**, 579 (1969).
28. MELNYKOVYCH, B., BISHOP, C. E.: *Endocrinology* **88**, 450 (1971).
29. MUNCK, A., BRINCK-JØHSEN, C.: *J. Biol. Chem.* **243**, 5556 (1968).
30. OHNO, S.: *Nature* **234**, 134 (1971).
31. PITOT, H. C., PERANIO, C., MORSE, A., POTTER, V. R.: *Nat. Canc. Inst. Monogr.* **13**, 229 (1964).
32. PRATT, W. B., ARANOW, L.: *J. Biol. Chem.* **241**, 5244 (1966).
33. ROGERS, A. W.: *Techniques of autoradiographie*, Elsevier, Amsterdam (1967).
34. ROSEN, J. M., FINA, J. J., MILHOLLAND, R. J., ROSEN, F.: *J. Biol. Chem.* **245**, 2074 (1970).
35. ROSENAU, W., BAXTER, J. D., ROUSSEAU, G. G., TOMKINS, G. M.: *Nature N. B.* **237**, 20 (1972).
36. ROUSSEAU, G. G., BAXTER, J. D., TOMKINS, G. M.: *J. Biol.* **67**, 99 (1972).
37. SAMUEL, H. H., TOMKINS, G. M.: *J. Mol. Biol.* **52**, 57 (1970).
38. SIBLEY, C. H., TOMKINS, G. M.: *Cell* **2**, 213 (1974).
39. SIBLEY, C. H., TOMKINS, G. M.: *Cell* **2**, 221 (1974).
40. SPARKES, R., WEISS, M. C.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* **70**, 377 (1973).
41. STEINBERG, R. A., LEVINSON, B. B., TOMKINS, G. M.: *Cell* **5**, 29 (1975).
42. THOMPSON, E. B., GELEHRTER, T. D.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* **68**, 2589 (1971).
43. THOMPSON, E. B., TOMKINS, G. M., CURRAN, J. F.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* **56**, 296 (1966).
44. TOMKINS, G. M., MARTIN, D. W., STELLWAGEN, R. H., BAXTER, J. D., MAMONT, P., LEVINSON, B. B.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **35**, 635 (1970).
45. TOMKINS, G. M., LEVINSON, B. B., BAXTER, J. D., DETHLEFSEN, L.: *Nature N. B.* **239**, 9 (1972).
46. TOMKINS, G. M., GELEHRTER, T. D., GRANNER, D., MARTIN, D., SAMUEL, H. H., THOMPSON, E. B.: *Science* **166**, 1476 (1969).
47. VENETIANER, A., THOMPSON, E. B.: *Febs Abst.* 1378 (1975).
48. WEISS, M. C., CHAPLAIN, M.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* **68**, 3026 (1971).
49. YAMAMOTO, K. R., STAMPFER, M. R., TOMKINS, G. M.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* **71**, 3901 (1974).