

## DAGANATOS SEJTPOPULÁCIÓ NÖVEKEDÉSÉNEK TANULMÁNYOZÁSA

*II. Magi fehérjék vizsgálata gyorsan és lassan proliferáló M-NK/Ly ascites tumor  
sejtpopulációiban*

JENEY ANDRÁS, az orvostudományok kandidátusa, DZURILLAY ÉVA,  
KOPPER LÁSZLÓ és LAPIS KÁROLY, az MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1976. III. 9.

Előző tanulmányunkban beszámoltunk arról, hogy az NK/Ly ascites tumor növekedése során a sejtek proliferációs aktivitása folyamatosan csökken. A növekedési ütem lelassulása azonban reverzibilis, mivel átoltás után a tumorsejtek újra gyorsan proliferáló szakaszba kerülnek. A sejtproliferáció csökkenésével párhuzamosan a sejtmag és a sejtmembrán ultrastrukturális sajátosságainak a változásait, valamint a radioaktív prekursorok DNS-be, RNS-be és fehérjékbe történő beépülésének a csökkenését észleltük (Lapis és mtsai 1973, Kopper és mtsai 1974). Jelen munkánkban a génműködést és ezáltal a sejtproliferációt befolyásoló magi fehérjéket kívántuk tanulmányozni az NK/Ly ascites tumor növekedésének gyorsan és lassan proliferáló populációiban.

Az elmúlt évtizedben végzett vizsgálatok meggyőző adatokkal bizonyították, hogy az eukaryota sejtekben a DNS működését — tehát a gén-információ átadását a replikáció és a transzcripció során — a kromatin fehérjék befolyásolják. A kromatin fehérjék közül először a hisztonoknak tulajdonítottak fontos szerepet a gén regulációban, mivel ezek gátolják a DNS-től függő RNS szintézist (Bonner és Huang 1963). A sejtproliferáció és a hisztonok közötti kapcsolatra utal az, hogy a DNS és a hisztonok — elsősorban az  $F_1$  frakció — szintézise egyidőben történik a sejt életsiklusának S fázisában. Stevely és Stocken (1968), valamint Gurley és mtsai (1974), arra következtettek, hogy az  $F_1$  hisztonok foszforilációja a sejtproliferáció megindulásának fontos feltétele. Ez utóbbi megállapítással összhangban Balhorn és mtsai (1972) egyenes összefüggést találtak az  $F_1$  hiszton foszforilációja és a tumorok növekedése között. Hisztonok a DNS replikációjában betöltött szerepére legutóbb Kriegstein és Hogness (1974) mutattak rá, akik arra következtettek, hogy a „replikációs villa” haladásának mértékét a hisztonok határozzák meg. A széles körű vizsgálatok azonban arra is rámutattak, hogy a hisztonok összetételében, DNS-hez kötődésében és represszor hatásában szöveti vagy faji specifikitást nem lehetett kimutatni, így azok nem specifikus gén regulátoroknak tekinthetők (Stein és Baserga 1971). Éppen ezért a jelenlegi kutatások a hisztonok represszor hatásának módosításával foglalkoznak, amely létrejö-

het a hisztonok foszforilációja, metilációja, acetilációja, valamint egyéb fehérjékkel vagy alacsony molekulásúlyú vegyületekkel szembeni kölcsönhatás következtében.

Az utóbbi időben a savanyú természetű magi fehérjék génműködést szabályozó hatásainak a tanulmányozása került az érdeklődés középpontjába. Ezen fehérjékre jellemző, hogy asparaginsavban és glutaminsavban gazdagok és a hisztonoktól eltérően tryptophánt is tartalmaznak.

Ezen kromatin frakció egyes fehérjei azonban oldékonysági tulajdonságaikban, DNS-hez történő kötődésükben és molekulásúlyukban különböznek egymástól. Lebomlási félidejük a hisztonoknál gyorsabb, de a sejt számos többi fehérjéinél lassúbb. Cytoplasmában szintetizálódnak, foszforilálódhatnak és a DNS nagy árkában helyezkednek el. (Stein és Basega 1971, Langan és Smith 1967, Kleinsmith és Allfrey 1969, Farber és mtsai 1971.)

Az irodalomban sokszor váltakozva és zavaróan használt magi savanyú fehérje, kromatin-savanyú fehérje, „non-hiszton” és magi rezidualis fehérje kifejezések egyfelől tükrözik a még nem egységesen kialakult terminológiát, másfelől megjelölik a tárgyalt fehérje előállítási módját. Elfogadhatónak tartható az, hogy „non-hiszton” vagy kromatin savanyú fehérje kifejezést használunk ha azok előállítása a már izolált kromatinból történik. Ezzel szemben az egész mag szakaszos izolálása során, a DNS-hez szorosan társuló, nem hiszton jellegű fehérjét az ún. reziduális frakcióban találjuk. Hill és mtsai (1971) megállapításai után ezen frakciókban levő fehérjék működésük alapján három csoportba oszthatók:

- a) strukturális szerep,
- b) enzim működés (polymeráze, ligáze stb.),
- c) gén reguláció.

Lehetséges azonban, hogy egy ugyanazon fehérje több módon is részt vesz a kromatin szerkezeti és működési egységének fenntartásában.

A gén regulációjában betöltött és sokak szerint specifikus szerepüket az alábbi megfigyelések támasztják alá:

- a) Aktív szövetek és aktív állapotban levő kromatin több magi savanyú fehérjét tartalmaz, mint az inaktívak (Dingman és Sporn 1964, Frenster 1965).
- b) A hisztonok által gátolt DNS-től függő RNS polymerázt újból működésbe hozzák (Wang 1970, Spelsberg és mtsai 1971).
- c) Izolált kromatinban a szöveti specifikus RNS szintézist biztosítják (Paul és Gilmour 1968, Wang 1971).
- d) A DNS-hez kötődő kromatin savanyú fehérjék immunspezifitást mutatnak (Wakabayashi és mtsai 1973).

Nagy számú adat tanúsága szerint a kromatin savanyú fehérjék részt vesznek a sejt replikációs tevékenységében. Megállapítást nyert, hogy a nyugvó sejtpopulációk stimulációjakor a DNS szintézis beindulását a kromatin sava-

nyú fehérjék fokozott szintézise előzi meg az ún. praereplikációs szakaszban (Rovera és Baserga 1971). Ezen fehérjék a hisztonoktól eltérően a sejtciklus mindegyik fázisában szintetizálódnak, azonban legkifejezettebben a késői G<sub>1</sub>-ben, ahol az aminosav beépülés mintegy négyszeresére emelkedik (Gerner és Humphrey 1973).

A sejtprolifleráció és a magi fehérjék kapcsolatának a tanulmányozására számos kísérleti modell alkalmas; így a regenerálódó máj, a phytohaemagglutinnal stimulált lymphocyták, a medium cserével vagy szérummal oszlásra kényszerített nyugvó sejtpopulációk vizsgálata (Allfrey 1970, Baserga és Stein 1971).

A bemutatandó kísérletünkben ugyanazon tumor gyorsan és lassan proliferáló sejtpopulációinak összehasonlítását végeztük, amely módszer alkalmasnak ígérkezett a magi fehérjék, sejtprolifleráció változását kísérő működésének a vizsgálatára.

#### *Anyag és módszer*

Kísérleteinkhez mindkét nemű 20—25 g súlyú CFLP egerekre  $5 \times 10^6$  tumorsejtet i.p. transzplantált NK/Ly ascites tumort használtunk az átoltást követő különböző napokban.

Az RNS polymeráze aktivitás vizsgálatához Berkowitz és mtsai (1969) módszerével sejtmagot izoláltunk. Az Mg<sup>++</sup>-al és Mn<sup>++</sup>-al aktiválható RNS polymeráze aktivitást a <sup>3</sup>H—UTP beépülése alapján, Pogo (1972) által leírt módon határoztuk meg a következőképpen:

Az NK/Ly ascites tumor sejteket mostuk 0,32 M szacharozéval, amely oldat 0,002 M MgCl<sub>2</sub>-t (vagy MnCl<sub>2</sub>-t), 0,001 M Káliumfoszfátot pH 6,8-et tartalmazott. A sejteket duzzasztottuk 0,01 M NaCl 0,001 M Káliumfoszfát pH 6,8 pufferral 5°C-on 15 percig, majd homogenizáltuk 0,32 M szacharoz-0,001 M MgCl<sub>2</sub> (vagy MnCl<sub>2</sub>) 0,3%-os Triton-X-100 tartalmú pH 6,3-as 0,001 M Káliumfoszfát-pufferban. Az így nyert sejtmagokat a következő összetételű inkubáló oldatban szuszpendáltuk: 0,3 M szacharoz, 0,01 M Tris-HCl (pH 7,8), 0,03 M 2-merkaptotanol. A magnéziummal aktivált RNS polymeráze vizsgálatához ez az oldat 0,004 M MgCl<sub>2</sub>-t és 0,06 M NaCl-t, a mangánnal aktivált pedig 0,002 M MgCl<sub>2</sub>-t és 0,03 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>So<sub>4</sub>-t tartalmazott.

Kísérleti pontonként négy meghatározást végeztünk. Az inkubáló oldat 0,25 ml-je 10<sup>7</sup> sejtmagot tartalmazott, amelyet 15 percig 37°C-on előinkubáltunk, majd 0,1—0,1 μM ATP-t, CPT-t és GTP-t, valamint 0,03 μM UTP-<sup>3</sup>H-t adtunk hozzá. A reakciót 15 perc múlva 5 ml 10%-os triklórecetsavval leállítottuk. A keletkezett csapadékot Whatman GF szűrőn összegyűjtöttük és mostuk 3 × 10 ml 10%-os triklórecetsavval, amely 10 μM nem radioaktív nukleotidákat és 0,05 M Natriumpyrofoszfátot tartalmazott. A Whatman GF szűrőn összegyűjtött RNS-t tartalmazó csapadék radioak-

tivitását Beckman LS-100 C spektrometeren toluol-ethoxyethanol alapanyagú szcincillátor oldatban mértük meg (Fox 1968).

A sejtmagok egy részéből Burton (1956) módszerével meghatároztuk a DNS tartalmat. Az RNS polymeráze aktivitást az egy mg DNS-re vonatkoztatott pM-ban kifejezett UMP beépülés alapján fejeztük ki.

A magi fehérjék vizsgálatához  $30 \mu\text{C}$   $^3\text{H}$ -lizint vagy  $^3\text{H}$ -arginint i.p. adtunk az NK/Ly ascites tumoros egereknek 1, 6, illetve 24 óráig. Az állatok leölése után az ascites folyadékot centrifugálással eltávolítottuk, a sejtmagot Perry és Kelley (1968) módszerével izoláltuk. Stein és Borun (1972) módszerének módosításával az alábbiak szerint izoláltuk a magi fehérjéket:

$10^8$  sejtmagot szakaszosan extraháltunk

a) 0,15 M NaCl-dal,

b) 0,35 M NaCl-dal,

c) 0,2 M NaCl-ot tartalmazó 0,2 N HCl-dal,

d) majd a visszamaradt maradékot 1% Natrium dodecylszulfátot tartalmazó 0,01 M Na-foszfátban (pH 6,8) oldottuk fel.

A frakciók fehérjetartalmát Lowry és mtsai (1951) szerint Folin reagenssel, a radioaktivitásukat pedig Beckman LS—100 C spektrometerben határoztuk meg.

Az előállított fehérje frakciókat molekulásúlyuk alapján SDS-polyakrilamid-gél elektroforézisen Weber és Osborn (1969) módszerével szétválasztottuk. A frakciókat oldottuk 0,01 M Natriumfoszfát (pH 7,0) — 1% Natrium-dodecylszulfát [SDS] — 1% 2-merkaptóetanol oldatban  $37^\circ\text{C}$ -on 2 óráig, majd azokat 18 óráig dializáltuk 0,1% SDS-t és 0,1% 2-merkaptóetanol tartalmazó 0,01 M Natriumfoszfát (pH 7,0) pufferrel szemben, amely azonos az elektroforézisnél használt pufferrel. Az egyes kísérletekben megadott fehérjemennyiséget 10% glicerinnel és  $5 \mu\text{l}$  0,05%-os bromfenolkék jelző festékkel együtt helyeztük fel a géloszlop tetejére. Az elválasztás 4 M ureat tartalmazó 10%-os polyakrilamid-gélen történt szobahőmérsékleten, 6 óráig és csövenként 8 mA mellett.

Az elektroforézis befejezésével a géleket Coomassie Brilliant blueval megfestettük és azok denzitását Joyce-Loebl Chromoscan típusú denzitometeren 575 nm-en megmértük. A molekulásúly megbecsülésére a következő standardokat használtunk: Bovin serum albumin (BSA) ms: 68,000, tripszin ms: 23,800, ribonukleáze (RNáze) ms: 13,700, és cytochrom C ms: 12,400.

A mechanikusan felszeletelt géleket 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ban  $50^\circ\text{C}$ -on 5 óráig inkubáltuk, majd azok rádióaktivitását Beckman LS—100 C spectrometeren 2-ethoxyethanol-toluol alapanyagú folyadékszcintillációs rendszerben megmértük (Fox 1968).

Az egyes hiszton frakciókat a Johns (1964) módszerének Gurley és Hardin (1968) által történő módosított eljárásával állítottuk elő.

A kromatin fehérjék és a DNS kapcsolatának a megbecsülésére Graziano és Huang (1971) módszerével csökkenő ion erőssége mellett izolált kromatin ehidiumbromid kötőképességét Farrand spektrofluorimeteren 335 nm gerjesztési és 593 nm fluoreszcenciás hullámhossznál vizsgáltuk.

Kísérletekhez az alábbi izotopokat, ill. finom vegyszert használtunk: L-lizin-6-<sup>3</sup>H, HCl (spec.akt: 291,0 mCi/mM, MTA Izotóp Intézet), L-Arginin 5-<sup>3</sup>H—HCl (spec.akt: 16 Ci/mM, Radiochemical Center Amersham) és Uridin-5-<sup>3</sup>H—Na-trifoszfát (spec.akt: 1 Ci/mM, Radiochemical Center Amersham).

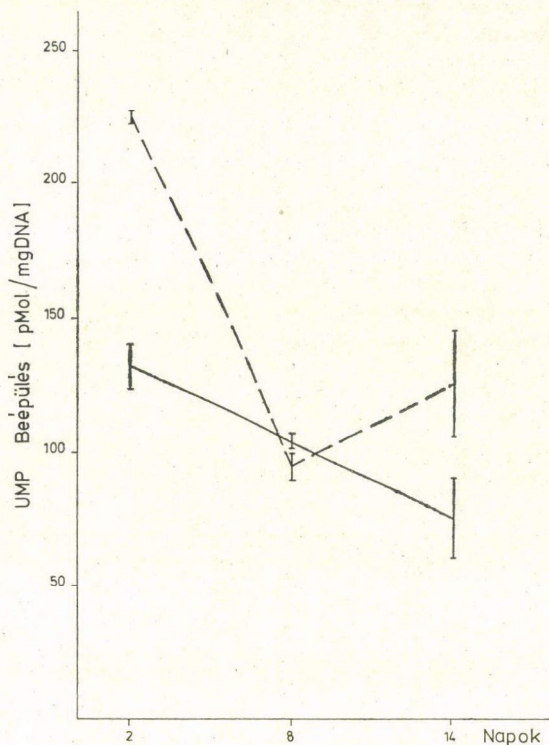
Az Ethidiumbromid (2,7-diamino-10-ethyl-9-phenilphenantridium bromid) Calbiochem, a Coomassie Brilliant Blue pedig Schwarz-Mann gyártmányú volt.

### *Eredmények*

Előző vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az NK/Ly ascites tumor növekedése során a sejtek átlagos ciklus ideje meghosszabbodik, az S fázisban levő sejtek aránya pedig csökken, amelynek következtében a gyorsan proliferáló sejtpopuláció folyamatosan átalakul lassan proliferálóvá. A különböző proliferációs sajátossággal rendelkező sejtpopulációk nemcsak a DNS, hanem az RNS szintetizáló képesség tekintetében is különböznek egymástól (Kopper és mtsai 1974). Ezt bizonyítja az 1. sz. ábrán bemutatott RNS polymeráze aktivitásának a csökkenése is. A különböző korú tumorok sejtmag összehasonlításakor magnézium jelenlétében a <sup>3</sup>H-UTP majdnem két és félszer jobban épült be a 3 napos, mint a 8 napos tumorból izolált sejtmag RNS-ébe. Kisebb méretekben ugyan, de csökkent a mangánnal aktiválható RNS polymeráze aktivitás is.

Kérdésként vetődött fel, hogy a gén átírást és replikációt befolyásoló magi fehérjék szintézise, amely függ a sejtek életciklusának a fázisaitól, — hogyan követik a DNS működésének és a sejtek proliferációs állapotának a változását. Ezért összehasonlítottuk a 3 és 10 napos NK/Ly ascites tumoron a <sup>3</sup>H-lizin és <sup>3</sup>H-arginin beépülését. Az I. táblázat adatai mutatják, hogy a radioaktív lizin beépülése a 10 napos tumor fehérjéibe mintegy felére csökkent a 3 napos értékhez képest. Ezt azonban számos, a fehérjeszintézissel közvetlenül össze nem függő tényező is létrehozhatja (a jelzett sejtpopuláció eltérő nagysága, permeabilitás, aminosav-pool és aminosav metabolizmus változása). Ezen hibaforrás kiküszöbölésére a magi fehérjék specifikus aktivitásait az egész sejt fehérjéinek specifikus aktivitására is vonatkoztattuk (Cholon és Studzinski 1974). A beépülés kiértékelésénél azt is figyelembe kell venni, hogy a vizsgált fehérjék lizin tartalma eltérő, így a jelölődési különbségek nemcsak a szintézis mértékét tükrözik.

Ezért ezt a kísérletünket az egyes fehérje frakcióknak a tumor korától függő jelölődésének időbeli változása alapján kívántuk kiértékelni. A 3 és 10



1. Ábra. RNS-polymeráze aktivitás vizsgálata különböző korú NK/Ly ascites tumoron.  
 - - - - Mg<sup>++</sup> aktiválható RNS polymeráz; ——— Mn<sup>++</sup> aktiválható RNS polymeráz

### I. Táblázat

#### <sup>3</sup>H-lizin beépülése NK/Ly ascites tumor mag fehérjébe

Fehérje frakciók: Jelzési idő:	3 napos tumor			10 napos tumor		
	1 óra	6 óra	24 óra	1 óra	6 óra	24 óra
Egész sejt	75,2 ±1,2	42,7 ±1,0	27,9 ±0,4	34,1 ±1,5	12,7 ±0,8	7,4 ±0,3
Magi 0,15 M NaCl-al kivonható	39,5 ±0,7	26,8 ±0,6	20,6 ±0,4	21,2 ±0,9	10,5 ±0,2	7,2 ±0,3
Magi 0,35 M NaCl-al kivonható	53,3 ±0,8	31,8 ±0,7	14,8 ±0,4	27,2 ±1,4	12,8 ±0,8	6,6 ±0,2
Hiszton	62,6 ±1,6	32,1 ±0,8	27,2 ±1,2	28,7 ±1,0	11,2 ±0,3	8,1 ±0,2
Rezidualis magi savanyú fehérje	44,5 ±1,2	29,5 ±1,0	24,8 ±0,4	24,8 ±0,8	9,2 ±0,1	5,5 ±0,1

Eredmények kifejezve specifikus aktivitásban (10<sup>3</sup> cpm x fehérje mg<sup>-1</sup>).

$$\pm SD = \sqrt{\frac{\varepsilon(x-x')^2}{n-1}}$$

Csoportonkénti 4–6 állatból eltávolított tumorsejtek jelölése és magi fehérje frakciók vizsgálata az Anyag és Módszer című fejezetben leírtak szerint történt.

## II. Táblázat

Magi fehérjék egész sejt fehérjéire vonatkoztatott jelölődése <sup>3</sup>H-lizin-nel

Magi fehérje frakciók:	3 napos tumor			10 napos tumor		
	Jelzési idő			Jelzési idő		
	1 óra	6 óra	24 óra	1 óra	6 óra	24 óra
0,15 M NaCl-al kivonható	0,53	0,63	0,74	0,63	0,82	0,98
0,35 M NaCl-al kivonható	0,71	0,84	0,50	0,81	1,10	0,89
Hiszton	0,82	0,75	0,98	0,84	0,88	1,10
Reziduális sav fehérje	0,59	0,69	0,89	0,72	0,72	0,75

Eredmények kifejezve relatív spec. aktivitásban.

$$\left( = \frac{\text{frakció specifikus aktivitása}}{\text{egész sejt fehérjéinek spec. aktivitása}} \right)$$

Az adatok kiszámításának alapját a I. Táblázaton bemutatott kísérlet képezte.

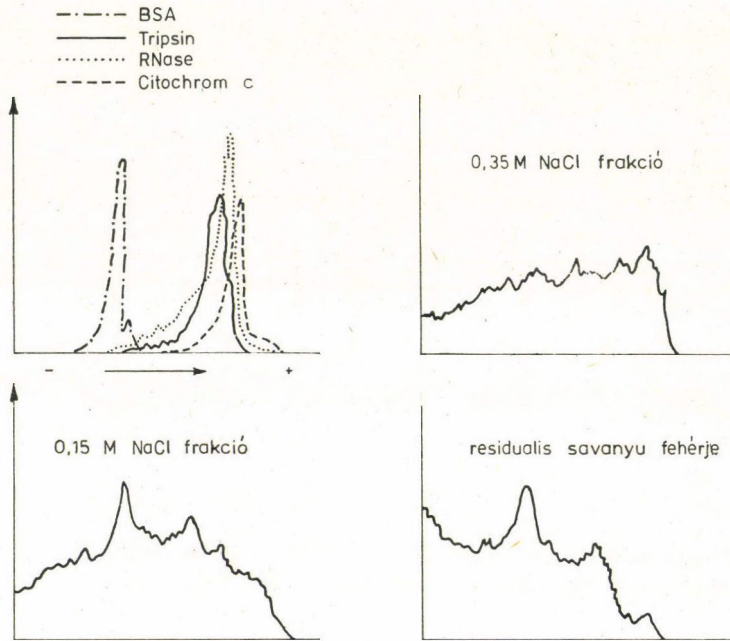
napos tumorok összehasonlításakor azt tapasztalhattuk, hogy az utóbbiban a <sup>3</sup>H-lizin beépülése nemcsak kisebb, hanem 24 óra alatt a rádiaktivitás csökkenése is gyorsabb. A hisztonok aminosav összetételének ismerete érthetővé teszi azt, hogy a <sup>3</sup>H-lizin jobban épül be a hisztonokba, mint a savanyú fehérjékbe. Ez a különbség azonban már nem annyira kifejezett a 10 napos tumornál, mint a 3 naposnál, amelyből a savanyú fehérjék szintézisének relatív emelkedésére lehetne gondolni. Irodalmi adatokkal megegyezően a mi vizsgálatainkban is a magi fehérjék jelölődése elmaradt az egész sejt fehérjétől, azonban a beépülés csökkenése is lassúbb némelyik magi fehérjében (Stein és Baserga 1971). Így megemlítenő a 3 napos tumor magi reziduális savanyú fehérjéinek és a 10 napos tumor hiszton frakciói rádióaktivitásának viszonylagosan lassúbb ütemű csökkenése (II. táblázat).

Következő kísérleteinkben tanulmányoztuk a rádióaktív aminosav beépülését a hisztonok és reziduális savanyú fehérjék SDS-polyakrilamid gél elektroforézissel szétválasztott frakcióiba.

A 2. és 3. ábra az NK/Ly ascites tumor magi fehérjéinek megoszlását mutatja az SDS-polyakrilamid gélen. A 0,15 M NaCl-al kivonható frakció a karyoplasma szolubilis fehérjéit és az RNP partikulumokat tartalmazza (Busch és Mauritzen 1967). A reziduális savanyú fehérjék egy lassabban vándorló, nagyobb molekulásújú (kb. 65 000) és egy vagy két gyorsan vándorló, alacsonyabb molekulásújú (kb. 30 000—10 000) frakciók köré csoportosulnak. Ezzel szemben a 0,35 M NaCl-al kivonható, a kromatinhoz kevésbé társuló fehérjék molekulásújú szerint megoszlása sokkal egyenletesebb.

A 3. ábra a mag összhiszton és a Johns (1964) módszerével előállított egyes hiszton frakciók elektroforetikus vándorlását mutatja be. Ily módon kívántuk igazolni az összhiszton elektroforézisekor az egyes frakciók helyét a polyakrilamid-gélen.

A  $^3\text{H}$ -lizin beépülésének a vizsgálatokor a 3 és 10 napos tumor magi reziduális savanyú fehérjéi között nyilvánvaló eltérést lehetett tapasztalni. Az 1 órás jelölődés után a rádióaktivitás a 3 napos tumornál legkifejezettebben a 60 000 és 30 000 molekulásúly közötti fehérjéknél jelenik meg, míg a 10 napos tumornál a kisebb mértékű beépülés megoszlási csúcsa a 30 000 molekulásúly alatti frakcióban észlelhető (4. és 5. ábra).



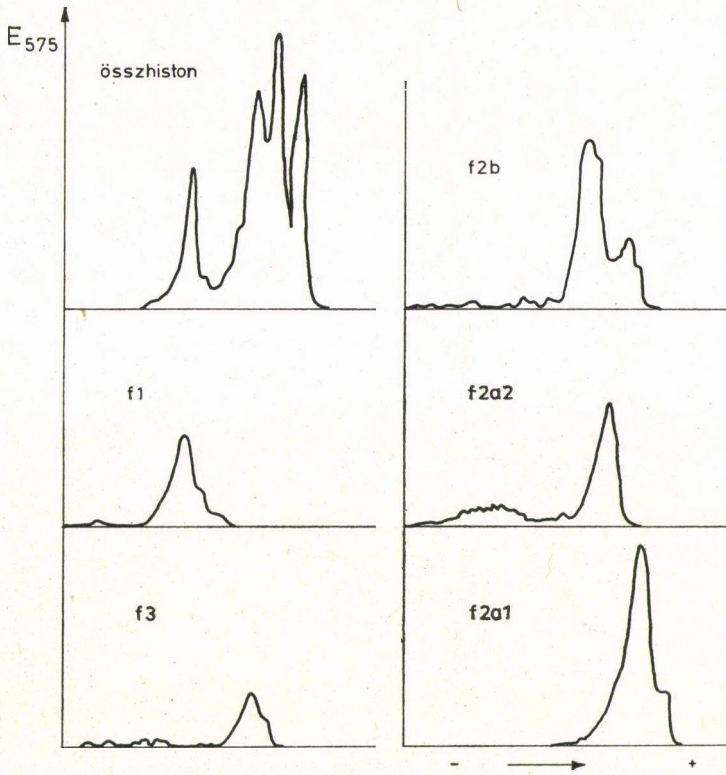
2. Ábra. Magi fehérje frakciók elválasztása SDS-polyakrilamid gél-elektroforézisen. Az ábrán a függőleges tengely az 575 nm-en mért relatív densitást, a vízszintes tengely pedig a vándorlási távolságot mutatja.

A hisztonok vizsgálatánál feltűnőnek tarthattuk, hogy a  $^3\text{H}$ -lizin beépülése legnagyobb mértékben nem a lizin-gazdag  $F_1$ , hanem az  $F_3$ – $F_{2b}$  frakciókban volt észlelhető (6. ábra). A 10 napos tumor hisztonjaiba a beépülés alacsonyabb volt, de az a frakciók között egyenletesebben oszlott meg (7. ábra). Ez utóbbi kísérletben az  $F_1$  frakció előtt Coomassie-Brilliant blue festődésmentes területen is észleltünk radioaktivitást. Hasonló megfigyelésről Gottesfeld és mtsai (1974), valamint Ljiljana és Koviljka (1973) számoltak be. Utóbbi szerzők a Coomassie Brilliant blue-val nem festődő és a beépült aminosav radioaktivitását mutató területen glykoproteint mutattak ki.

A  $^3\text{H}$ -lizin mellett a  $^3\text{H}$ -arginin beépülését is megvizsgáltuk a hisztonokba. A  $^3\text{H}$ -lizinnel végzett kísérlet eredményéhez hasonlóan a 3 napos tumor hiszton frakció közül az  $F_{2b}$ – $F_{2a_2}$  jelölődése volt a legnagyobb. A 10 napos



tumornál már az  $F_{2a_1}$  frakció jelölődése volt a legnagyobb, az egy órás vizsgálati időben. Jelentőséget tulajdoníthatunk annak, hogy 24 órával a  $^3\text{H}$ -arginin adása után a 10 napos tumor  $F_{2b}$  és  $F_{2a_2}$  frakcióinak megfelelő területen a jelölődés nem volt alacsonyabb, mint az egy órás jelzés után. Ez a megfigyelés arra utal, hogy egyes hisztonfrakciók ( $F_{2b}$ ,  $F_{2a_2}$ ) lebomlási ideje a sejtmag többi



3. Ábra. Histon frakciók elválasztása SDS-polyakrylamid gél-elektroforézisen. Felvitt fehérje mennyiség: Összhiszton = 50  $\mu\text{g}$ ,  $f_1$  = 22  $\mu\text{g}$ ,  $f_3$  = 36  $\mu\text{g}$ ,  $f_{2b}$  = 40  $\mu\text{g}$ ,  $f_{2a_2}$  = 50  $\mu\text{g}$  és  $f_{2a_1}$  = 40  $\mu\text{g}$ .

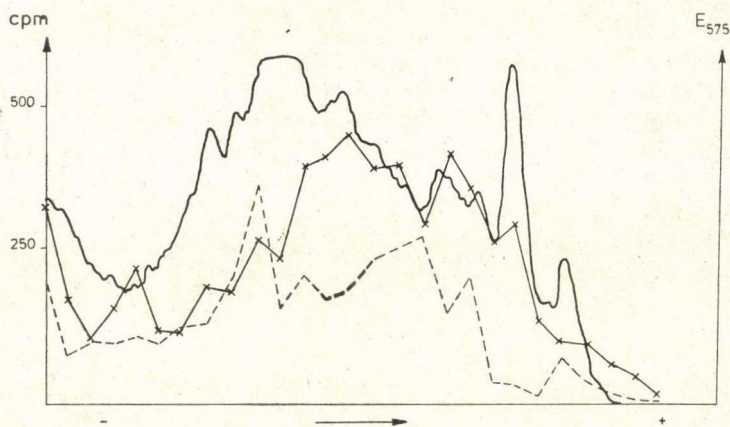
### III. Táblázat

Ethidiumbromid fluoreszcenciája 3 és 10 napos NK/Ly ascites tumorból izolált Deoxyribonukleoprotein jelenlétében.

Tumor kora	I—I <sub>0</sub>
3 napos	49,0
	53,0
10 napos	28,5
	21,0

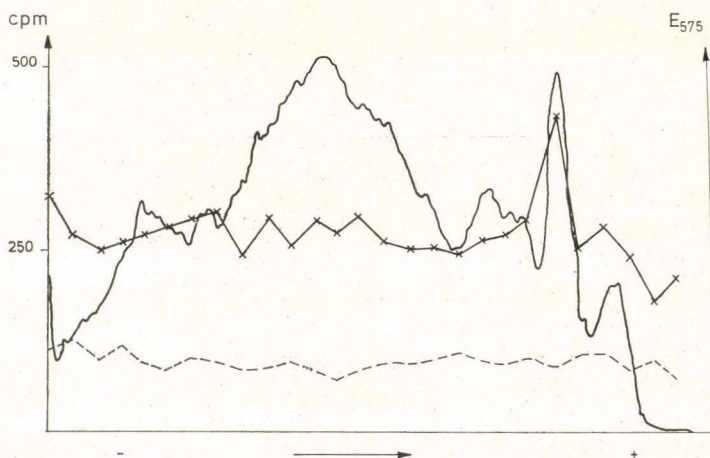
A deoxyribonukleoprotein izolálása Graziano és Huang (1971) módszerével, egyre csökkenő ion-erősség mellett történt.

A 3 ml 0,015 M NaCl—0,0015 M Na citrat (pH 7) puffer 1 OD<sub>260</sub><sup>1cm</sup> mennyiségnek megfelelő deoxyribonukleoproteint és 5  $\mu\text{g}$  ethidiumbromidot tartalmazott. Fluoreszcencia mérést 335 nm gerjesztési és 593 nm fluoreszcenciás hullámhossznál Farrand spektrofluoriméteren végeztük el.



4. Ábra.  $^3\text{H}$ -lizin beépülése 3 napos NK/Ly ascites tumor magi reziduális savanyú fehérje frakcióiba.

A géltre felvitt fehérje mennyiség 150–150  $\mu\text{g}$ . Jelmagyarázat: ——— denzitás 575 nm-en;  $\times-\times-$  cpm 1 órai jelzés után; - - - - cpm 24 órai jelzés után

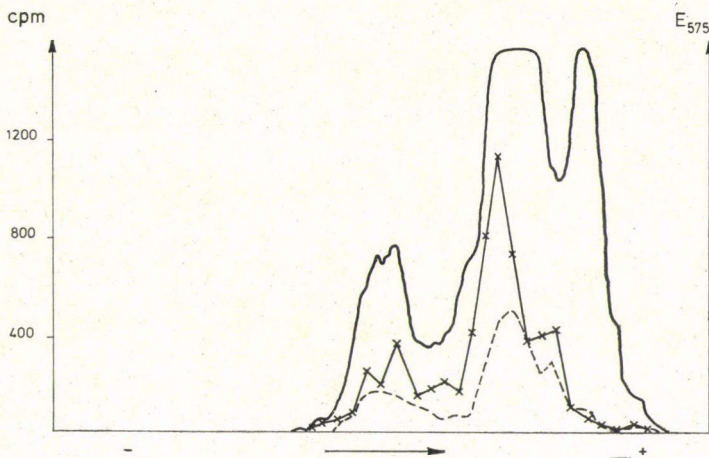


5. Ábra.  $^3\text{H}$ -lizin beépülése 10 napos NK/Ly ascites tumor magi reziduális savanyú fehérje frakciójába. Gélre felvitt fehérje mennyiség 350–350  $\mu\text{g}$ .

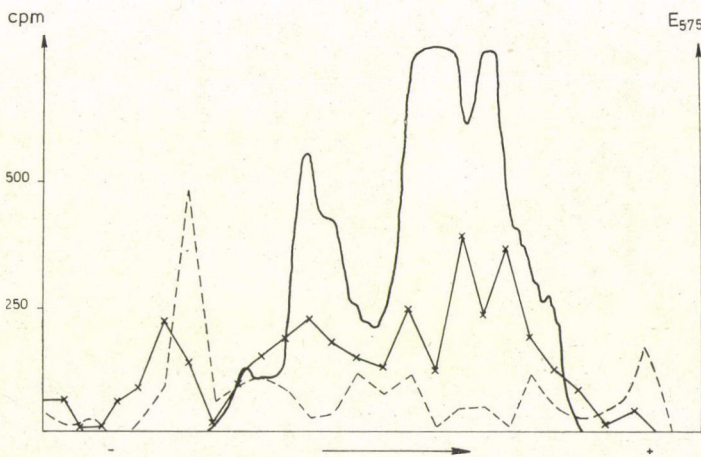
Jelmagyarázat: ——— denzitás 575 nm-en;  $\times-\times-$  cpm 1 órai jelzés után; - - - - cpm 24 órai jelzés után

fehérje frakcióitól eltérően lassúbb a lassan proliferáló sejtpopulációban, mint a gyorsan proliferálóban (8. és 9. ábra).

A DNS és a kromatin fehérjék közötti kapcsolat természetére az ethidiumbromid kötődés vizsgálatából kívántunk következtetni. Az ethidiumbromid fluoreszcenciája igen jelentősen fokozódik, miközben interkalációs kötésbe lép a DNS-sel. A DNS-hez kötődő kromatin fehérjék azonban megakadályozzák a festék kötődését a DNS-hez. Ezért a kromatin ethidiumbromid

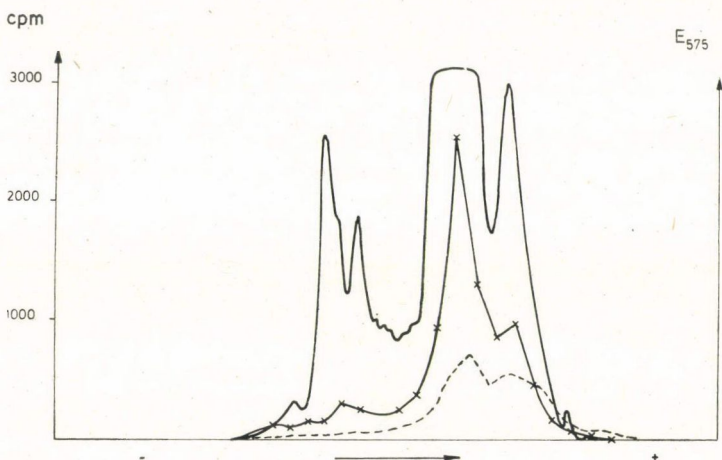


6. *Ábra.*  $^3\text{H}$ -lizin beépülése 3 napos NK/Ly ascites tumor hiszton frakcióiba. Géltre felvitt fehérjemennyiség:  $100\ \mu\text{g}$ . Jelmagyarázat: ———— denzitás 575 nm-en;  $\times-\times-$  cpm 1 órai jelzés után; - - - - cpm 24 órai jelzés után

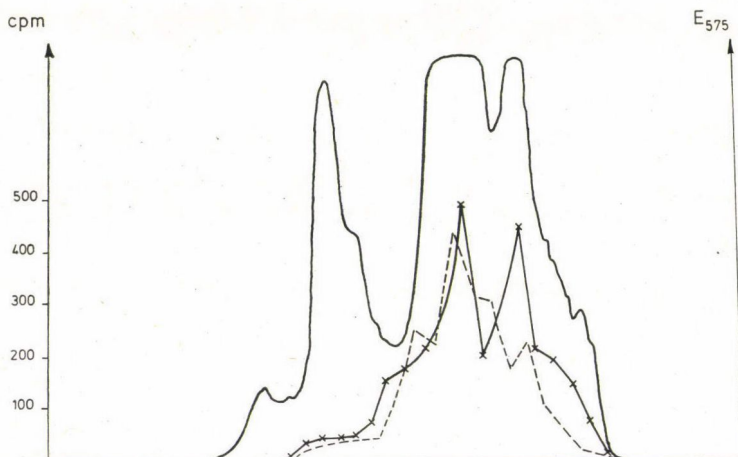


7. *Ábra.*  $^3\text{H}$ -lizin beépülése 10 napos NK/Ly ascites tumor hiszton frakcióiba. Géltre felvitt fehérje mennyiség  $100\ \mu\text{g}$ . Jelmagyarázat: ———— denzitás 575 nm-en;  $\times-\times-$  cpm 1 órai jelzés után; - - - - cpm 24 órai jelzés után

kötőképességéből a DNS szabad szegmentjeinek a nagyságára következtethetünk. Kísérletünkben azt találtuk, hogy a 3 és 10 napos tumorból izolált DNP különböző mértékben fokozza az ethidiumbromid fluoreszcenciáját. A 10 napos tumor DNP-nek a 3 naphoz képest mintegy felére csökkent fluoreszcencia fokozó hatása arra utal, hogy a szabad DNS szegmentek területe kisebb. Feltételezhetően a 10 napos tumorban a DNS kiterjedtebben fedett kromatin fehérjékkel, mint a 3 naphoz, amely a gén működés fokozottabb represszálságára utal (III. táblázat).



8. Ábra.  $^3\text{H}$ -Arginin beépülése 3 napos NK/Ly ascites tumor hiszton frakcióiba. Géltre felvitt fehérjemennyiség: 100  $\mu\text{g}$ . Jelmagyarázat: ——— denzitás 575 nm-en;  $\times - \times$  — cpm 1 órai jelzés után; - - - - cpm 24 órai jelzés után



9. Ábra.  $^3\text{H}$ -Arginin beépülése 10 napos NK/Ly ascites tumor hiszton frakcióiba. Géltre felvitt fehérjemennyiség: 100  $\mu\text{g}$ . Jelmagyarázat: ——— denzitás 575 nm-en;  $\times - \times$  — cpm 1 órai jelzé után; - - - - cpm 24 órai jelzés után

### Megbeszélés

Előző tanulmányunkban sokoldalúan tanulmányoztuk az NK/Ly ascites tumor sejtpopulációi proliferációs paramétereinek változásait a transzplantáció utáni különböző napokban (Lapis és mtsai 1973, Kopper és mtsai 1974).

Megállapítottuk, hogy a tumor növekedésével elsősorban a sejtek átlagos ciklus ideje — a két mitózis közötti idő — hosszabbodik meg, a nem oszló

sejtek arányának emelkedése a tumor növekedési ütemének a lelassulásáért csak kevésbé tehető felelőssé. Ezen eredményünk alapján a sejtproliferáció és a sejt ultrastrukturális, valamint anyagcsere sajátosságai összefüggéseinek tanulmányozásához kísérleti modellt tudtunk kialakítani.

Az RNS polymeráze vizsgálata arra mutatott rá, hogy a kísérleti rendszerünkben nemcsak az aktuálisan DNS-t szintetizáló sejtek aránya, valamint a DNS replikációjának lelassulását tükröző S fázis ideje, hanem a DNS-ről történő gén átírás is változik. Ez érthető is, mivel a dedifferenciálódott daganatos sejtekben az RNS szintézis sokkal szorosabban kapcsolódik a sejt replikációjához, mint a differenciálódásra képes normál sejtekben. Azon kísérleti eredményünk, miszerint a magnéziummal és a mangánnal aktiválható RNS-polymeráze működése közötti különbség függ a tumor korától, arra enged következtetni, hogy az RNS szintézis csökkenése mellett, a képződött RNS-ek jellege is változik. Itt arra lehet gondolni, hogy a gyorsan proliferáló tumorban a magnéziummal aktiválható nukleoláris RNS polymeráze I. működése áll előtérben, amíg a lassabban proliferáló populációkban a mangánnal aktiválható extranukleoláris RNS polymeráze II., III. és RNS polymeráze I. bár alacsonyabb szinten, de hasonló mértékben működik.

A sejtproliferáció és a magi fehérjék összefüggéseit az eddigi tanulmányok szinkronizált tenyészetben vagy a nyugvó és a proliferációra indukált sejtpopulációk összehasonlításával vizsgálták (Gerner and Humphrey 1973, Farber és mtsai 1971). Úgy gondoljuk, hogy az általunk alkalmazott kísérleti rendszerben a gyorsan és a lassan szaporodó NK/Ly ascites tumor sejtpopulációinak összehasonlításával — *in vivo* körülmények között tanulmányozhatjuk a daganatos sejtpopuláció proliferációs ütemének lelassulását kísérő tényezőket, amelyek közül némelyek feltételezhetően szerepet játszanak a sejtproliferációt szabályozó mechanizmusokban. Jelen kísérleteinkben a radioaktív lizin és arginin beépülését vizsgáltuk a génregulációban szerepet játszó hisztonokba és magi reziduális savanyú fehérjékbe. A  $^3\text{H}$ -lizin adását követő 1, 6 és 24 órás beépülési értékek áttekintése a gyorsan és a lassan szaporodó sejtpopulációk közötti figyelemre méltó különbségekre mutatott rá. A 3 napos tumornál a reziduális savanyú fehérjék, a 10 naposnál pedig a hisztonok relatív specifikus aktivitása idővel emelkedett, amely arra látszik utalni, hogy ezen fehérjék lebomlása lassúbb, mint a sejt többi fehérjéi. Ezen következtetést azonban csak a relatív specifikus aktivitás alapján vonhatjuk le, mivel a 10 napos tumorból a már beépült  $^3\text{H}$ -lizin a 3 napos tumornál gyorsabban távozik. Ezen utóbbi jelenség magyarázatát nem ismerjük, csupán arra a feltételezésre szorítkozhatunk, miszerint a proteázok aktivitása fokozódott vagy a sejtoszlások késése, illetve elmaradása következtében a képződött fehérjék jelentős része fölöslegessé válik, ezért lebontódik vagy kiürül a sejtből.

A polyakrilamid-gén-elektroforézisen végzett vizsgálatokban a különböző mértékben proliferáló NK/Ly ascites sejtpopulációkból izolált kromatin

fehérje frakciókban a legnagyobb fokú aminosav beépülést eltérő molekulásúlyú fehérjék mutattak. A gyorsan növekvő 3 napos NK/Ly ascites tumorban a magi reziduális savanyú fehérjéi közül a nagy molekulásúlyú csúcs körül észleltük a legnagyobb beépülést, amely összhangban áll Weisenthal és Ruddon (1972) az oszlási ciklusban levő lymphoma sejteken végzett hasonló megfigyeléseivel. Ezzel szemben a 10 napos tumorban egy sokkal alacsonyabb molekulásúlyú magi reziduális savanyú fehérje jelölődése vált uralkodóvá.

A  $^3\text{H}$ -arginin és a  $^3\text{H}$ -lizin beépülésének a vizsgálatok a hisztonok is eltérő frakciók jelölődésének az előtérbe kerülését mutatták a tumor növekedése során. Vizsgálati körülményeink mellett a 3 napos tumornál az  $F_1$ ,  $F_3$  és  $F_{2b}$  frakcióknak megfelelő területen lehetett számottevő beépülést találni, ezzel szemben a 10 napos tumor esetében már az  $F_{2a_1}$  és  $F_{2a_2}$  frakciók is jelölődtek. Különösképpen érdemes, hogy a 10 napos tumor vizsgálatok az  $F_{2a_2}$  frakcióban a  $^3\text{H}$ -arginin beépülése 24 óra alatt alig csökkent.

A bemutatott kísérletünkben láthattuk, hogy az NK/Ly ascites tumor növekedésével az aminosavak kromatin fehérjékbe történő beépülésének megváltozásával párhuzamosan a sejtek oszlási ideje meghosszabbodott, az RNS-polymeráze aktivitás csökkent és kevesebb ethidumbromid kötődött a kromatinhoz. Ezen utóbbi változások a génrepresszió fokozódására utalnak. Kérdés, hogy a génműködés ezen csökkenésének kifejlődésében milyen szerepe van a kromatin fehérjéknek. Jelen eredményeink arra engednek következtetni, hogy a génrepresszió fokozódását nem lehet csupán a kromatin fehérjék egészének a szintézisében bekövetkező változásával magyarázni, mivel a radioaktív aminosav beépülése ezen fehérjékbe meglehetősen jól követi az egész sejt fehérjéibe történő beépülést. Így a magi fehérjék szintézise nem tér el az egész sejt fehérjéitől sem a gyorsan proliferáló, sem a lassan proliferáló sejtpopulációban. A polyakrilamid gél elektroforézissel szétválasztott egyes fehérjék vizsgálata azonban már több támpontot nyújtott arra vonatkozóan, hogy melyik fehérje játszhat szerepet a sejtproliferáció szabályozásában. Így adataink arra utalnak, hogy a reziduális magi savanyú fehérjék közül az elektroforetikusán lassabban vándorló, relatíve nagyobb molekulásúlyú fehérjék szükségesek a gyors sejtproliferációhoz. Ezzel szemben a hisztonok — különösképpen az  $F_{2a_2}$  és  $F_{2a_1}$  frakciók — relatíve hosszabb életidejűek a lassan szaporodó, mint a gyorsan szaporodó sejtekben. Ezért feltételezhetően az  $F_{2a_2}$  és az  $F_{2a_1}$  hisztonok közvetlen vagy közvetett szerepet játszanak a sejtproliferáció csökkenését eredményező gén-represszióban.

## Összefoglalás

Az NK/Ly ascites tumor növekedése során a sejtproliferáció csökkenését kísérő anyagcsere változásokat tanulmányoztuk a sejtmagban. Összehasonlítottuk a 3 és 10 napos sejtpopulációkban radioaktív aminosavval jelölt hisztonok és reziduális savanyú fehérjék megoszlását polyakrilamid gél elektroforézisen. A két sejtpopuláció a DNS replikációját tükröző S fázis időtartamában, az RNS polymeráze aktivitásban és az izolált deoxyribonucleoprotein ethidium-bromid kötőképességében különbözött egymástól. Azt tapasztaltuk, hogy a gyorsan szaporodó, 3 napos tumor, és a lassan szaporodó 10 napos tumoros sejtpopulációkban eltérő kromatin fehérje frakciók jelölődése áll előtérben. A gén represszió fokozódására utaló megfigyelésekkel egy időben a reziduális savanyú fehérje nagy molekulásúlyú tartományának csökkent mértékű jelölődését és a hisztonok — különösképpen az  $F_{2a_2}$  és  $F_{2a_1}$  frakciók — lassúbb lebomlását észleltük.

## IRODALOM

- Allfrey, V. G.: Federation Proceedings **29**, 1447 (1970).  
 Balhorn, R., Balhorn, M., Morris, H. P. és Chalkley, R.: Cancer Res. **32**, 1775 (1972).  
 Baserga, R. és Stein, G.: Federation Proceedings **30**, 1752 (1971).  
 Bekowitz, D. m. Kakefuda, T. és Sgorn, B. M.: J. Cell Biol. **42**, 851 (1969).  
 Bonner, J. és Huang, R. C.: J. Mol. Biol. **6**, 169 (1963).  
 Burton, K.: Biochem. I. **62**, 315 (1956).  
 Busch, H. és Mauritzen, C. M.: Nuclear Proteins. In: „Methods in Cancer Research” (Ed.: Busch, H.) Vol. **3**, p. 392. Academic Press (1971).  
 Cholon, J. J. és Studzinski, G. P.: Cancer Res. **34**, 588 (1974).  
 Dingman, C. és Sporn, M.: Studies on chromatin I. J. Biol. Chem. **239**, 3483 (1964).  
 Farber, J., Baserga, R. és Gabbay, E. J.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **43**, 675 (1971).  
 Fox, B. W.: Int. J. Appl. Rad. **19**, 717 (1968).  
 Frenster, J. H.: Nature **206**, 680 (1965).  
 Gerner, E. W. és Humphrey, R. M.: Biochim. Biophys. Acta **331**, 117 (1973).  
 Gottesfeld, J. M., Garrard, W. T., Bagi, G., Wilson, R. F. és Bonner, J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **71**, 2193 (1974).  
 Graziano, S. L. és Huang, R. Ch.-C.: Biochemistry **10**, 4770 (1971).  
 Gurley, L. R. és Hardin, J. M.: Arch. Biochem. Biophys. **128**, 285 (1968).  
 Gurley, L. R., Walters, R. A. és Tobey, R. A.: J. Cell Biol. **60**, 356 (1974).  
 Holl, R. J., Poccia, D. L. és Doty, P.: J. Mol. Biol. **61**, 445 (1971).  
 Johns, E. W.: Biochem. J. **92**, 55 (1964).  
 Kleinsmith, L. J. és Allfrey, V. G.: Biochem. Biophys. Acta **175**, 136 (1969).  
 Kopper, L., Jeney, A., Benedeczy, I., Lapis, K., Takács, J.: Orvostudomány **25**, 19 (1974).  
 Kriegstein, H. J. és Hogness, D. S.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **71**, 135 (1974).  
 Langan, T. A. és Smith, L. K.: Fed. Proc. **26**, 603 (1967).  
 Lapis, K., Jeney, A., Kopper, L., Szende, B. és Benedeczy, I.: Arch. Geschwulstforsch. **42**, 229 (1973).  
 Ljiljana, S. és Koviljka, K.: Int. J. Biochem. **4**, 345 (1973).  
 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. és Randall, R. J.: J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).  
 Paul, J. és Gilmour, R. S.: J. Mol. Biol. **34**, 305 (1968).  
 Perry, R. P. és Kelley, D. E.: J. Mol. Biol. **35**, 37 (1968).  
 Pogo, B. G. T.: J. Cell. Biol. **53**, 635 (1972).  
 Rovera, G. és Baserga, R.: J. Cell Physiol. **77**, 201 (1971).  
 Rovera, G. és Baserga, R.: Exptl. Cell Res. **78**, 118 (1973).  
 Spelsberg, T., Hnilica, L. S. és Ansevin, A. T.: Biochim. Biophys. Acta **228**, 550 (1971).

- Stein, G. és Baserga, R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 218 (1971).  
Stein, G. S. és Borun, T. W.: *J. Cell Biol.* **52**, 292 (1972).  
Stevely, W. S. és Sticken, L. A.: *Biochem. J.* **110**, 187 (1968).  
Wakabayashi, K., Wang, S., Hord, G. és Hnilica, L. S.: *FEBS Letters* **32**, 46 (1973).  
Wang, T. Y.: *Exptl. Cell Res.* **61**, 455 (1970).  
Wang, T. Y.: *Exptl. Cell Res.* **69**, 217 (1971).  
Weber, K. és Osborn, M.: *J. Biol. Chem.* **244**, 4406 (1969).  
Weisenthal, L. M. és Ruddon, R. W.: *Cancer Res.* **32**, 1009 (1972).