

## XXXII. OTDK Biológia Szekció

### **A ciszplatin toxicitásának vizsgálata sejtciklus ellenőrzési és DNS-hibajavítási mutánsokon *Drosophila melanogaster*ben**

Készítette: Ottlik Dorottya  
Biológia MSc

Témavezető: Dr. Deák Péter, tanszékvezető SZTE TTIK Genetika Tanszék

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Genetika Tanszék

Szeged  
2014

## TARTALOMJEGYZÉK

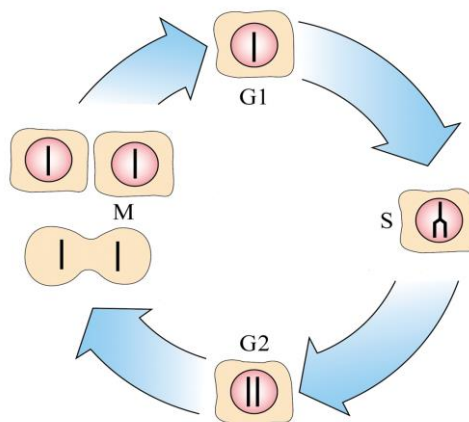
|                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------|-----|
| 1. BEVEZETŐ                                                 | 3.  |
| 1.1. Az eukarióta sejtciklus áttekintése                    | 3.  |
| 1.2. Az eukarióta sejtciklus szabályozása                   | 4.  |
| 1.3. Ellenőrzési mechanizmusok a sejtciklus szabályozásában | 5.  |
| 1.4. A DNS hibajavítás mechanizmusa                         | 7.  |
| 1.5. A sejtciklus és a rák                                  | 8.  |
| 2. KEMOTERÁPIA                                              | 9.  |
| 2.1. A ciszplatin, mint kemoterápiás szer                   | 10. |
| 3. CÉLKITŰZÉSEK                                             | 11. |
| 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK                                     | 12. |
| 4.1. Felhasznált <i>Drosophila melanogaster</i> törzsek     | 12. |
| 4.2. Az etetési kísérletek menete                           | 13. |
| 4.3. Felhasznált kemoterápiás szer: ciszplatin              | 14. |
| 5. EREDMÉNYEK                                               | 15. |
| 5.1. A ciszplatinra specifikusan érzékeny mutánsok          | 17. |
| 5.2. A ciszplatinra nem érzékeny mutánsok                   | 19. |
| 6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA                                   | 21. |
| 7. ÖSSZEFOGLALÁS                                            | 23. |
| 8. IRODALMI HIVATKOZÁSOK                                    | 24. |
| 9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS                                      | 27. |
| 10. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS                            | 28. |

## **1. BEVEZETÉS**

Minden élőlény az egymást követő és folyamatosan ismétlődő sejtosztódási és sejtnövekedési ciklusokon keresztül jön létre. A sejt osztódását megelőzi a sejt genetikai állományának, valamint organellumainak és makromolekuláknak megkettőződése. A megkettőződés és osztódás ciklusát sejtciklusnak nevezzük. A sejtciklus jól összehangolt és szigorúan szabályozott folyamatokból áll. A sejtciklus szabályozó mechanizmusai biztosítják az egyes folyamatok helyes sorrendjét, illetve felelősek azért, hogy minden folyamat teljesen lejátsszódjon, irreverzibilis legyen, és csak egyszer induljon el a ciklus során. A sejtciklusban főszerepet játszó fehérjék és a sejtciklus szabályozó rendszer elemei igen hasonlóak minden eukariótában.

### **1. 1. Az eukarióta sejtciklus áttekintése**

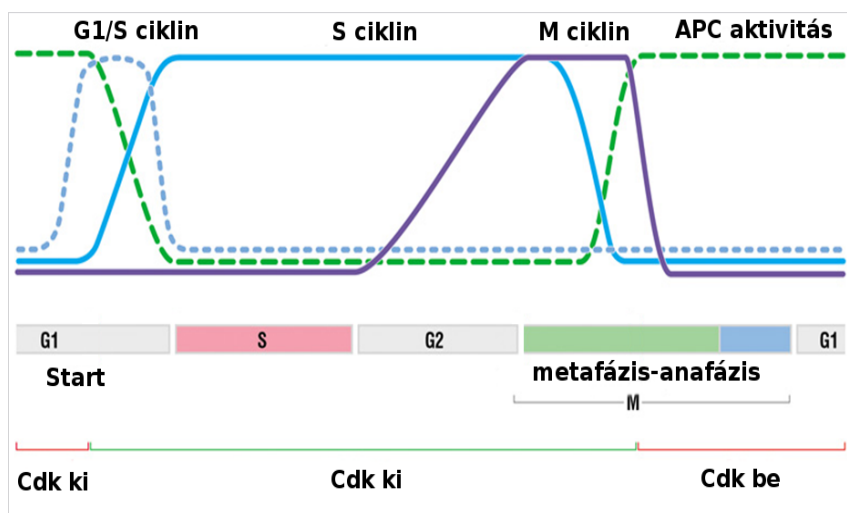
A sejtciklust, annak meghatározó történései alapján, különböző fázisokra osztjuk. A ciklust két nagy szakaszra lehet bontani: a mag és a sejt kettéosztódásának szakaszára, az M fázisra, illetve az osztódások között eltelt időszakra, az interfázisra. Az M fázist a sejtmag osztódása, a mitózis és az ezt követő citokinézis, a citoplazma kettéválása alkotja. Az interfázis úgyszintén jól elkülöníthető folyamatokból áll: egyrészt beszélhetünk úgynevezett „gap” fázisokról (G1 és G2), illetve a közöttük lévő DNS-szintézist magába foglaló S fázisról. A sejtcikluson kívül megfigyelhető még egy nyugalmi G0 fázis, melyben a sejtek osztódás nélküli differenciálódása megy végbe (1.ábra).



**1. ábra:** A sejtciklus fázisai: G1-, S-, G2-, M-fázis (Hartwell, 2001)

## 1. 2. Az eukarióta sejtciklus szabályozása

A sejtciklus egyes szakaszaiban lejátszódó események mögött különböző molekuláris mechanizmusok állnak. A fázisok közötti átmenetet kinázok, foszfatázok és szabályzófehérjék komplexeinek összehangolt működése biztosítja. A sejtciklus kulcsfontosságú elemei a ciklin-függő kinázok (Cdk-k), melyeket szabályozó partnereik, a ciklinek aktiválnak. A sejtciklus során a Cdk-k koncentrációja közel állandó, de aktivitásuk szabályozó partnerük, a ciklinek dinamikus szintézise és lebontása révén ciklikusan változik (2. ábra), (Hartwell, 1991). A ciklinek nem csak aktiválják Cdk partnerüket, hanem célfehérjékhez is irányítják őket. A ciklineknek négy osztálya van, attól függően, hogy melyik stádiumban kötődnek a Cdk-khoz. A ciklin-függő kinázoknak is több fajtája van. A gerinces állatokban 4 Cdk típust különböztethetünk meg. A Cdk4 és Cdk6 a G1 ciklinekkel, a Cdk 2 a G1/S és az S ciklinekkel, a Cdk1 pedig az M ciklinekkel lép kölcsönhatásba. A G1/S ciklinek (ciklin E) a G1 fázis végén kötődnek a Cdk-k-hoz és ezáltal elkötelezetté teszik a sejtet a DNS replikációra. Az S ciklinek (ciklin A) az S fázis során kapcsolódnak a Cdk-k-hoz és nélkülözhetetlenek a DNS replikáció elindításában. Az M ciklinek (ciklin B) a mitózis eseményeit segítik elő. A *Drosophilában* csak háromféle Cdk fordul elő: a Cdk1 (ciklin A, B, B3), a Cdk2 (ciklin E) és a Cdk 4 (ciklin D). (Lee, 2003).



2. ábra: A sejtciklus szabályozó rendszer főbb molekuláinak aktivitás változása a sejtciklus folyamán

A ciklinek kapcsolódása nem elegendő a Cdk-k teljes aktiválásához. Maximális aktivitásukat akkor érik el, amikor egy másik kináz a CAK (Cdk aktiváló kináz) foszforilálja őket (Morgan, 1997). A Cdk-ciklin komplexek aktivitása gátolható a Wee1 kináz által, amely képes egy, az aktív hely közelében elhelyezkedő aminosav foszforilációjára. A Cdk-ciklin komplexek Wee1 kináz által létrehozott inaktív formáját a Cdc25 foszfatáz képes visszaalakítani aktív kinázzá, a gátló foszfát csoportok eltávolítása révén. A ciklin-Cdk komplexek inhibitor fehérjék (CKI) kötődésével is szabályozhatók, ezek az aktív centrum környezetének átrendezésével inaktiválják az enzimet. Ezek a gátló fehérjék főként a G1 és S fázis szabályozásában játszanak szerepet. A ciklin-Cdk komplexek a sejtciklus bizonyos stádiumaiban a ciklin partner szabályozott proteolízisével szabályozódnak.

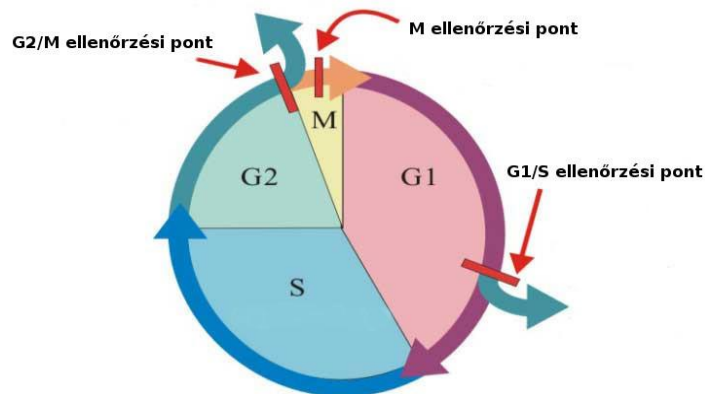
A fehérjelebontásnak nem csak a kinázok aktivitásának szabályozásán keresztül van szerepe a sejtciklus szabályozásában, hanem más szabályozó fehérjék lebontásán keresztül is. A lebontási szignál egy ubikvitin molekulákból álló poliubikvitin lánc, amely jelként szolgál a proteoszóma számára, a fehérjék lebontásának megkezdéséhez. A célfehérjék ubikvitinációját egy három tagból álló enzimrendszer biztosítja. A rendszer tagjai: az ubikvitin aktiváló vagy E1 enzim, ami aktiválja az ubikvitin molekulát, az ubikvitin konjugáló vagy E2 enzim, ami a célfehérjére juttatja az aktivált ubikvitin molekulát és az ubikvitin ligáz vagy E3 enzim ami az enzimkaskád szubsztrát specificitását határozza meg. A S fázis ubikvitin ligáza az SCF komplex, a G1 fázis és a mitózis során pedig az anafázis promoting komplex (APC/C) a meghatározó ubikvitin ligáz (Peters, 1998).

A különböző ciklin-Cdk komplexek és az aktivitásukat szabályozó enzimek bonyolult hálózatba rendeződnek és a sejtciklus szabályozó rendszer magját képezik. Ennek a rendszernek számos tényező fokozza a hatékonyságát, illetve további szabályozási szintek ráépülése növeli a pontosságát.

### **1. 3. Ellenőrzési mechanizmusok a sejtciklus szabályozásában**

A sejtciklus tökéletes lezajlását, a DNS szintézisétől egészen a leánysejtek elkülönüléséig számos összehangolt szabályozó folyamat biztosítja. Alapvető fontosságú, hogy az egyes fázisok a megfelelő sorrendben következzenek és a sejt csak akkor tudjon átlépni egy következőbe, ha az előzőt tökéletesen befejezte. Ezen feltételek teljesüléséért az úgynevezett ellenőrzési pontok (checkpointok) felelősek. Ezeken az ellenőrzési

pontokon a sejtciklus addig nem léphet tovább, amíg a korábbi lépések be nem fejeződtek, a keletkezett hibák ki nem javíródtak. Amennyiben a sejt nem képes kijavítani a hibákat a sejt nem folytatja a sejtciklust, hanem programozott sejthalál révén elpusztul, ezzel védve a szervezetet a hibás sejtek elszaporodásától. Viszont, ha a checkpointokban résztvevő gének károsító hatás következtében elveszítik funkciójukat, a sejt korlátlan osztódásba kezd, ami tumoros elváltozások képződéséhez vezet (Morgan, 2006).



**3. ábra:** A sejtciklus G1/S, G2/M és M ellenőrzési pontjai (Bertoni & Kleinsmith, 2012)

A sejtciklus eseményeit három fő ellenőrzési pont szabályozza (3.ábra). A G1 és G2 fázisokban a sejtek ellenőrzik belső és külső környezetüket, hogy a feltételek megfelelőek-e, az előkészületek megtörténtek-e a sejtosztódásra. Ha a külső feltételek nem kedvezőek a sejtek lassítják a G1 fázison való áthaladást, viszont, ha a külső feltételek megfelelőek és osztódást serkentő jelzések is érkeznek, akkor a sejt áthalad az első ellenőrzési ponton. Ezt az ellenőrzési pontot restriktációs pontnak vagy élesztők esetén startpontnak nevezzük. Ezen a ponton áthaladva a sejt elkötelezi magát az osztódásra és akkor is S fázisba lép, ha közben a külső körülmények megváltoznak és megszűnnek a sejtosztódást stimuláló jelzések.

A következő ellenőrzési pont a G2 és M fázis határán található. A neve DNS replikációs ellenőrzési pont. A DNS szintézis akkor tekinthető befejezettnek, ha az utolsó nukleotid replikációja is megtörtént. A sejt érzékeli a nem replikálódott DNS-t, vagy a replikációs villát és negatív jeleket küld a sejtciklust szabályozó központba, ami meggátolja az M-Cdk aktivációját a G2 fázis végén. Ha az előzetes folyamatok megfelelően mentek végbe, illetve ha a mitózishoz szükséges anyagok rendelkezésre állnak akkor a G2 fázis végére az inaktív M-Cdk komplexek felhalmozódása figyelhető

meg. A Cdc25 foszfatázok eltávolítják a komplexeket gátló foszfátcsoportokat, az M-Cdk komplexek aktiválódnak és elkezdődik a mitózis (Shapiro, 1999).

Az utolsó ellenőrzési pont, az orsó összeszerelési ellenőrzőpont, amely az M fázison belül, a metafázis és anafázis határán végzi ellenőrző funkcióját. Szemben a többi ellenőrzési ponttal, ez a checkpoint be van kapcsolva mindaddig, amíg a kromoszómák szegregációja végbe nem megy. Tulajdonképpen ez az ellenőrzési pont, amíg működik, megakadályozza a kromoszómák szeparálódását. Amint a kromoszómák között lévő kohezin lebomlik, és megtörténik a kromoszómák bipoláris kapcsolódása az orsókhöz megszűnik az ellenőrzési pont gátló hatása (Tan & Rida, 2005).

#### **1. 4. A DNS hibajavítás mechanizmusa**

A különböző élőlények sejtjeit alkotó makromolekulák, beleértve a sejt örökítőanyagát is, olyan környezeti hatásoknak vannak folyamatosan kitéve, melyek megváltoztathatják azok kémiai szerkezetét. A DNS-ben még a legapróbb károsodások is a sejt jól programozott működésének felborulásához, illetve a sejt pusztulásához vezethetnek, ezért a DNS-ben keletkezett hibákat különböző DNS-hibajavító mechanizmusok kijavítják. Normál körülmények között a DNS károsodások keletkezése és javítása egy dinamikus folyamat. Ritkán előfordulhat, hogy a meghibásodott szakaszok korrigálása hosszú ideig elmarad. Ha a hibajavítás elmarad, az mutációk főlhalmozódását vonja maga után és végül kóros utódsejtek elszaporodásához, tumoros megbetegedésekhez vezethetnek.

Többféle mutációt okozó környezeti hatás ismert. Indukálódnak elváltozások a DNS-szintézise során, előidézhethetnek meghibásodást a nukleotidokon spontán végbemenő kémia változások, illetve előfordulnak mutagének által előidézett károsodások is. A káros hatások eredetük szerint lehetnek belső és külső eredetű károsodások. Endogén meghibásodás, például a normális anyagcsere melléktermékeiből származó reaktív oxigéngyökök roncsoló hatása, mely spontán mutációt okoz. Külső eredetű hibákat eredményezhet például az ultraibolya sugárzás, a gamma-sugárzás, a hidrolízis, a mutagén vegyszerek és a kemoterápiás és sugárterápiás szerek is.

A DNS-ben bekövetkezett hiba javítása történhet közvetlen hibajavítási mechanizmussal (direct repair), valamint a károsodott rész újraszintetizálása révén.

A közvetlen hibajavítási mechanizmusok lehetővé teszik a bázissérülések

enzimatis folyamatok általi javítását, báziseltávolítás nélkül. Direkt hibajavítás történik, például az úgynevezett fotoreaktivációs javítás során, mely az ultraibolya sugárzás hatására keletkezett pirimidin dimereket az eredeti pirimidin bázisokká alakítja vissza a fotoliáz enzim segítségével. Közvetlen hibajavítás történik, például a guanin metiláltságát megszüntető javítás során is. Ebben az esetben a metiltranszferáz enzim a guaninon lévő káros metil-csoportot a saját ciszteinjére helyezi át és ezáltal inaktiválja saját magát.

A károsodott rész újraszintetizálásával javító mechanizmusoknak több típusa van. A mismatch repair a hibás bázispárosodás kijavítását közvetlenül a replikáció után hajtja végre. Ez a hibajavítási mechanizmus az inkorrekt, de szabályosan párosodó bázisok korrigálásáért felelős, melyet a metiláció mechanizmusával biztosít. A helytelen bázispárt a PMS-családba tartozó fehérjék, valamint a MSH2, MSH3, MSH6 specifikus proteinek ismerik fel, majd ezután a metilálatlan láncban egy endonukleáz bemetszést hajt végre (Li, 2008). Helikáz és exonukleáz funkcióval bíró fehérjék eltüntetik a hibás nukleotidot tartalmazó szakaszt, majd DNS-polimeráz és ligáz helyreállítja a cukorfoszfát gerinc folytonosságát.

Az excíziós hibajavítás másik típusa a bázis-eltávolító javítás (base-excision repair). A hibajavítás során a DNS-ben normálisan elő nem forduló bázisok eltávolításáról specializált DNS-glikozilázok gondoskodnak. Ezek az enzimek képesek felismerni a nem megfelelő bázisokat és kivágni a helyükről. A kivágást követően végbemehet a hibás bázissal szemben lévő normális bázis alapján a helyes bázis cseréje (Friedberg, 2003).

Ezen hibajavító mechanizmusok harmadik típusa a nukleotid-eltávolító hibajavítás (nucleotide-excision repair). Előfordulnak olyan DNS károsodások, melyeket nem lehet báziskivágás által kijavítani. A károsodás felismerése után egy sok alegységes specifikus enzimszisztéma vágja el a hiba körüli szálakat a sérülés mindkét oldalán. A kivágás után a normális kettősszálú szerkezet ismét helyreáll a DNS polimeráz I és a DNS ligáz közreműködése által.

## **1. 5. A sejtciklus és a rák**

A checkpointok a sejt olyan túlélési mechanizmusai, amelyek biztosítják a genom minőségi kontrollját és fenntartják a genom sértetlenségét. A hibás checkpointok mutációkat és olyan genom átrendeződéseket okozhatnak, amelyeknek genom instabilitás az eredménye. A genom instabilitás pedig a fő oka a születési rendellenességeknek és

számos betegség, köztük a rák kialakulásának.

A DNS-ellenőrzési és hibajavítási gének által kódolt fehérjék képesek a sejtet ért DNS-károsodásokat kijavítani, ezáltal minimális szinten tartani a sejtben végbemenő genetikai változásokat. A sejtciklus során előfordulhat, hogy károsodik vagy hibásan másolódik le a DNS, de ha ez bekövetkezik, a sejtciklus folyamata a hibák kijavításaig abbamarad. A hibajavítási génekben létrejövő meghibásodások genetikai instabilitáshoz vezethetnek. A sejt károsodása során számos DNS-ellenőrzési és hibajavítási gén együttes mutációja figyelhető meg, mely végső soron rákos sejteltváltozást indukál.

A hibajavítási gének funkcióvesztése kapcsán ugyanakkor előfordulhat az is, hogy a sejtek különböző DNS károsító hatásokkal szemben (pl. kemoterápiás szerek) fokozott érzékenységet mutatnak. Az adott gén mutációja révén a sejt számos hibajavítási útvonala használhatatlanná válik, ami végső soron a sejt pusztulását eredményezi. A mai rákkutatás fő célkitűzései közé tartozik az ilyen típusú mutációk felderítése, hiszen így a különböző DNS-ellenőrzési és hibajavítási gének gátlása révén, a rákos sejtek kemoterápiás szerekkel szembeni érzékenysége specifikusan megnövelhető (Gabrielli, 2011). A végső cél pedig egy specifikusabb, személyre szabott rákterápia kidolgozása.

## **2. KEMOTERÁPIA**

A kemoterápia kezdete az 1900-as évek kezdetére tehető, amikor felismerték a nitrogén mustárok csontvelőműködést gátló hatását. A kemoterápiás kezelések előnye, hogy szétterjedt, metasztázisos rák is kezelhető vele, ami már nem műthető és nem sugarazható. Viszont számos hátránya is van, például, hogy nem lokálisan hat, hanem az egész szervezetet mérgezi. Az alkalmazott szer feldolgozása és kiválasztása a májon és vesén keresztül történik, ezért sérült vesék és máj esetén nem használható. A szerek farmakinetikája vagyis, hogy hogyan kezeli a test a drogot nagyon komplex. Ezen kívül elmondható, hogy más jellegű gyógyszerek esetleges átfedő metabolikus útja módosíthatják az adott hatást.

A daganatos betegségek kezelésére nagyon sokféle kemoterápiás szer áll rendelkezésre és a gyógyszergyártó cégek szinte naponta állnak elő újabbal. A szerek hatásmechanizmusuk alapján különböző csoportokba sorolhatók. Vannak DNS szintézis gátlók és interkalálódók, Topoizomeráz I gátlók, Topoizomeráz II gátlók, Topoizomeráz II gátlók és interkalálódók, DNS replikáció gátlók és interkalálódók, DNS alkiláló szerek,

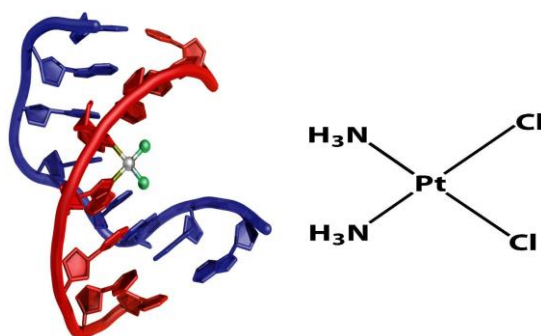
DNS keresztkötő szerek, mitózis és mikrotubulus gátló szerek és antimetabolitok.

## 2. 1. A ciszplatin, mint kemoterápiás szer

A ciszplatin (cis-diamindikloroplatinum) egy igen elterjedt kemoterápiás gyógyszer. A ciszplatin az első tagja a platina-tartalmú kemoterápiás gyógyszerek osztályának, de ebbe a kategóriába sorolhatjuk a karboplatint és az oxaliplatint is. Közülük a leggyakrabban használt szer a ciszplatin, melyet a mai napig számos gyógyszergyár forgalmaz. Ezek a platina komplexek képesek *in vivo* reagálni, valamint kötődni és keresztkötéseket kialakítani a DNS molekulán belül, amelyek végül a sejt apoptózisához vezethetnek (Dasari & Tchounwou, 2014).

A ciszplatin a sejtekbe diffúzió révén képes bejutni. Mivel intracellulárisan a sejtekben a klorid-ionok koncentrációja alacsony, ezért a molekula két kloridionja lehasad és helyére két vízmolekula kerül. A sejtekben a pozitívan töltött vegyület felhalmozódik, majd kölcsönhatásba lép a nukleofil komplexekkel (Gonzalez, 2001).

Jellemző a ciszplatinra, hogy elsősorban a DNS molekula guanin és adenin purin bázisainak 7-es N-atomjához kötődik. Ennek következtében két, azonos szálon található guanin között létesül kapcsolat, mely a DNS molekula térszerkezetének megváltozáshoz vezet. A ciszplatin a nukleinsavakon kívül még képes bizonyos fehérjékhez, tiolokhoz kötődni és így megváltoztatni azok eredeti konformációját (Welters, 1999).



4. ábra: A DNS és a hozzákötött ciszplatin 3D modellje és a ciszplatin szerkezeti képlete

A ciszplatint elsősorban a here-, és petefészekrákban szenvedő betegek kezelésére alkalmazzák, de a hörgő-, méhnyak-, prosztatá-, és urotheliális rákok esetében is jelentős sikereket értek el vele. A ciszplatin kezeléseket követően fellépő mellékhatások a vesekárosodás, idegrendszeri károsodások, halláskárosodás (Ozols & Young 1985)

### **3. CÉLKITŰZÉSEK**

A rákos megbetegedések kialakulásának hátterében az örökítő anyagot érintő mutációk felhalmozódása áll. A sejtciklus ellenőrzési és DNS-hibajavító rendszerének összehangolt működése nélkülözhetetlen a sejtek épségének megőrzésében.

Az sejtciklus ellenőrzési és DNS-hibajavító folyamatokban résztvevő gének nagy részét már sikerült azonosítani és tanulmányozni számos modell organizmusokban, mint például *Drosophila melanogaster*-ben, valamint emlős és humán sejtekben is (Hartwell, 1992). Ezen gének közös jellemzője, hogy evolúciósan konzerváltak, illetve különösen érzékenyek a különböző genotoxikus szerekkel szemben (Eastman, 2004).

Munkám célja az volt, hogy megvizsgáljam a mai kemoterápiás kezelésekben is alkalmazott ciszplatin hatását *Drosophila melanogaster* sejtciklus ellenőrzési és DNS-hibajavítási mutáns törzsekben, illetve meghatározzam a relatív toxicitási teszt által a különböző mutánsok ciszplatinnal szembeni érzékenységét.

## **4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **4. 1. Felhasznált *Drosophila melanogaster* törzsek**

Kísérleteinkben felhasznált mutáns *Drosophila melanogaster* törzsek a bloomingtoni (Indiana University, USA) törzsközpontból, a transzgenikus RNS interferencia törzsek a Vienna *Drosophila* RNAi Center (VDRC)-ből származnak. A 1. táblázatban láthatóak az általunk felhasznált *Drosophila melanogaster* sejtciklus ellenőrzési és DNS-hibajavítási mutáns törzsek. A használt genetikai markerek leírása megtalálható a FlyBaseben ([www.flybase.org](http://www.flybase.org)).

| <b><i>Drosophila melanogaster</i> gén</b> | <b>A gén használt allélja</b>       |
|-------------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Rad1</i> (CG3240)                      | PBac(WH)Rad1 <sup>f02242</sup>      |
| <i>mei-9</i> (CG3697)                     | w1 mei-9A1                          |
| <i>Pms2</i> (CG8169)                      | P(GawB)NP2178                       |
| <i>Rev1</i> (CG12189)                     | 12189R-3 (X kromoszómás RNSi vonal) |
| <i>Rad-18 like</i> (CG9203)               | P{SUPor-P}CG9203KG05829             |
| <i>Spn-A</i> (CG7948)                     | spn-A1                              |
| <i>okra</i> (CG3736)                      | okr <sup>17-11</sup>                |
| <i>RecQ</i> (CG7670)                      | PBac(RB)CG7670 <sup>e04496</sup>    |
| <i>mus309</i> (CG6920)                    | mus309D2/mud309D3                   |
| <i>Rad17</i> (CG7825)                     | RNSi vonal<br>P{GD4236}v44723       |
| <i>p53</i> (CG33336)                      | y1 w1118; p535A-1-4                 |
| <i>mei-41</i> (CG4252)                    | mei-41 <sup>RT1</sup>               |
| <i>mus304</i> (CG7347)                    | Mus304 <sup>D1</sup>                |
| <i>loki</i> (CG10895)                     | P(EPgy2)EY15840                     |
| <i>Mad2</i> (CG17498)                     | P(EPgy2)mad2 <sup>EY21687</sup>     |

**1. táblázat:** Felhasznált sejtciklus-ellenőrzési és DNS hibajavítási génekre mutáns *Drosophila melanogaster* törzsek

## 4. 2. Az etetési kísérletek menete

### A táptalaj előkészítése:

A ciszplatinos kezeléseket 3 ml instant táptalajt tartalmazó fiolákban végeztük. A 3 ml táptalaj előállításához 1 g instant táptalajt és 1800 ml vizet használtunk. A fiolákban 15 pár muslicát petéztettünk 24 órán át, 25 °C-on. Egy nap elteltével a kikelt első stádiumos lárvákra 200 µl térfogatú, meghatározott koncentrációjú ciszplatint adtunk. A kontroll fiolákban a lárvák 200 µl vizet kaptak. Minden koncentrációt 3 párhuzamos fiolában teszteltünk. Az állatokat 25 °C-on neveltük.

### Keresztezések menete:

Kísérleti rendszerünkben a homozigóta mutánsok heterozigóta testvérei modellezik a tumorok környezetében található egészséges szövetet. Ezért a vizsgálatban használt gének homozigóta életképes mutációit balanszer kromoszóma fölé vittük. Így a tesztek során a heterozigóta mutánsokkal történt keresztezések lehetővé tették, hogy homozigóta mutáns és heterozigóta (kontrol) egyedek pontosan ugyanolyan körülmények között nevelkedjenek.

Az egyes törzsek keresztezése a következőképpen zajlott:

1. *Mutáns/TM3 Sb, Ser* heterozigóta legyeket kereszteztünk a 3. kromoszómán lévő *Mad2* (CG17498), *SpnA1* (CG7948), *mus309* (CG6920), *p53* (CG33336), *mus304* (CG7347) gének esetén. *Mutáns/CyO,GFP* állatokat kereszteztünk a 2. kromoszómán lévő *Rad1* (CG3240), *Pms2* (CG8169) és *loki* (CG10895) mutánsok esetén.

2. A *mei9* (CG3697), *mei41* (CG4252), és *Rad-18 like* (CG9203) gének az X-kromoszómán helyezkednek el, ezért itt a *mutáns/FM6,w* heterozigóta nőstényeket a hemizigóta mutáns hímekkel kereszteztük.

3. Az *okra* (CG3736) gén *okr17-11* azonosítójú mutánsa egy háttérmutáció következtében homozigóta letális, ezért ezt a vonalat csak deléción felett tudtuk tesztelni: a *w; okr17-11/CyO, GFP* nőstényeket *w/Y; Df(2L) Ed206/CyRoi* deléciós hímekkel kereszteztük.

4. *Rev1* (CG12189) és *Rad17* (CG7825) gének esetén nincs elérhető mutáns allél, ezért ezen gének esetén transzgenikus RNS interferencia vonalat használtunk

tesztjeinkben, melyekben *w; Actin5C-GAL4/CyO,GFP* genotípusú állatokhoz történő keresztezéssel indukáltuk a géncsendesítést.

#### Az eredmények kiértékelése:

Az eredmények kiértékelésekor a homozigóta és heterozigóta utódokat a törzsek által hordozott balanszer kromoszómák alapján különítettük el. Az 1. csoportba tartozó törzsek esetén a homozigóta és heterozigóta utódok várható aránya 1:3. A 2. és 3. csoportban ez az arány 1:1, míg a 4. csoportban lévő mutánsok esetén a Rev1 törzsnél 1:1, a Rad17 törzsnél pedig 1:3 a várt arány, mivel ez utóbbi vonal homozigóta letális.

Törzsenként, minden koncentráció értéknél a három párhuzamos fiolából kikelt utódok számát összeadva, meghatároztuk a túlélő utódok számát. A homozigóták és heterozigóták számát összeadva megkaptuk az összes túlélő utód számát. A homozigóták számát az összes túlélő számával elosztva megkaptuk a túlélő homozigóta utódok százalékos arányát. Ezeket az arányszámokat a koncentráció függvényében ábrázoltuk. A pontokat összekötöttük, majd az egyenes azon pontját, ahol a homozigóták aránya a kontroll fiolához képest felére csökkent visszavetítettük a koncentrációkat tartalmazó tengelyre. Az így kapott koncentráció érték az adott szerre vonatkozó Relatív Letális Koncentráció (R-LC<sub>50</sub>). Az R-LC<sub>50</sub> érték az adott kemoterápiás szer hatóanyagának azon mennyiségét jelenti, amelynél a homozigóta utódok 50%-os pusztulási arányt mutatnak. A R-LC<sub>50</sub> értékek molban számolt negatív logaritmusát oszlopdiagramon ábrázoltuk.

#### **4. 3. Felhasznált kemoterápiás szer: ciszplatin**

Kísérleteinkben az Accord Healthcare cég által forgalmazott 1 mg/ml koncentrációjú ciszplatin törzsoldattal dolgoztunk. Az oldatot a szegedi Onkoterápiás Klinika biztosította. A különböző koncentrációjú ciszplatin oldatok előállításához, oldószerként desztillált vizet használtunk.

## 5. EREDMÉNYEK

Tizenöt sejtciklus ellenőrzési és DNS hibajavítási útvonalban szereplő gén mutációját hordozó *Drosophila melanogaster* törzs ciszplatinra mutatott érzékenységet vizsgáltuk (2.táblázat). Kísérleti rendszerünkben a homozigóta mutánsok ciszplatin érzékenységét a heterozigóta testvéreikéhez hasonlítottuk. Az etetési kísérletek során a homozigóta mutáns és heterozigóta egyedek pontosan ugyanolyan körülmények között nevelkedtek, mivel a vizsgált mutációra heterozigóta szülők utódait kezeltük ciszplatinnal.

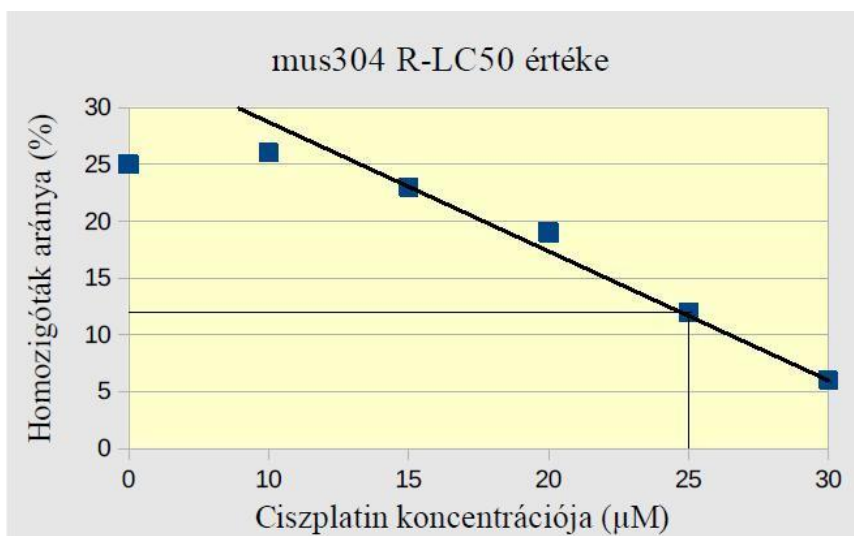
| Sejtciklus ellenőrzési és DNS hibajavítási útvonalak                   | Gének és elnevezéseik          |                                                                         |
|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
|                                                                        | <i>Drosophila melanogaster</i> | Humán                                                                   |
| Nukleotid-eltávolító javítás<br>(nucleotide excision repair)           | <i>Rad1</i> (CG3240)           | RAD1                                                                    |
|                                                                        | <i>mei-9</i> (CG3697)          | ERCC4<br>(excision repair cross-complementing rodent repair deficiency) |
| Mismatch repair                                                        | <i>Pms2</i> (CG8169)           | PMS2<br>(postmeiotic segregation increased 2)                           |
| Hibamentes DNS-hibajavítási útvonal<br>(error-free prone-repair)       | <i>Rad-18 like</i> (CG9203)    | SPRTN                                                                   |
| Hibára hajlamosító<br>DNS-hibajavítási útvonal<br>(error-prone-repair) | <i>Rev1</i> (CG12189)          | REV1                                                                    |
| Rekombinációs hibajavítás                                              | <i>Spn-A</i> (CG7948)          | RAD51                                                                   |
|                                                                        | <i>okra</i> (CG3736)           | RAD54L, RAD54-like                                                      |
|                                                                        | <i>RecQ</i> (CG7670)           | WRN<br>(Werner syndrome, RecQ helicase-like)                            |
| DNS-károsodási ellenőrzőpont                                           | <i>mus309</i> (CG6920)         | BLM<br>(Bloom syndrome, RecQ helicase-like)                             |
|                                                                        | <i>Rad17</i> (CG7825)          | RAD17                                                                   |
|                                                                        | <i>p53</i> (CG33336)           | TP53                                                                    |
| S-fázis ellenőrzési pont                                               | <i>mei-41</i> (CG4252)         | ATR                                                                     |
|                                                                        | <i>mus304</i> (CG7347)         | ATRIP                                                                   |
|                                                                        | <i>loki</i> (CG10895)          | CHK2<br>(checkpoint kinase2)                                            |
| Orsó összeszerelődési ellenőrzési pont                                 | <i>Mad2</i> (CG17498)          | MAD2L1, MAD2<br>(mitotic arrest deficient-like1)                        |

2. táblázat: A vizsgálatban használt sejtciklus ellenőrzési és DNS hibajavítási útvonalakban szereplő *Drosophila* gének és humán ortológjaik

Minden mutánst a ciszplatin öt különböző koncentrációjú oldatával kezelünk. A kezdeti koncentrációtartomány minden esetben 10, 15, 20, 25, 30  $\mu\text{M}$  volt. Amennyiben a homozigóta és heterozigóta állatok számában nem következett be jelentős változás a koncentrációtartományt 70  $\mu\text{M}$ -ig emeltük. Ezzel ellentétben, ha toxikusnak bizonyult a kezdeti kezelés, a ciszplatin oldatunkat a továbbiakban 1-10  $\mu\text{M}$  koncentrációtartományban alkalmaztuk.

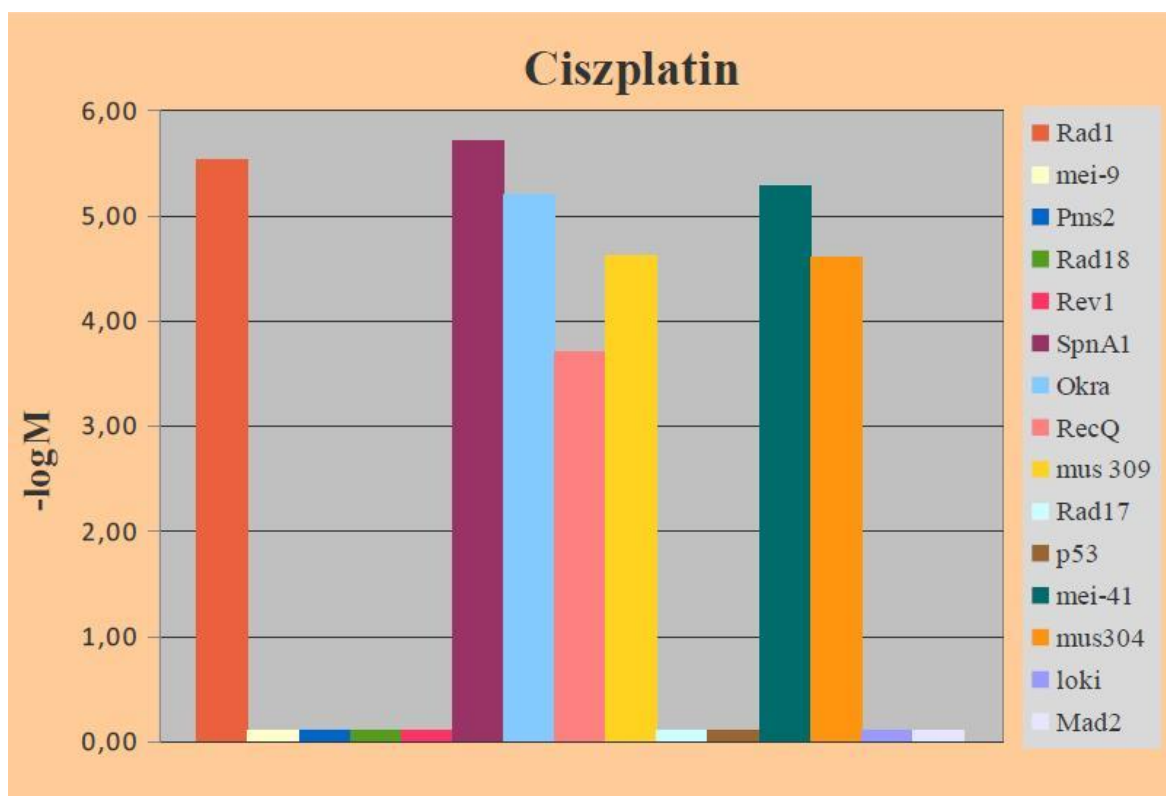
A ciszplatinnal szemben mutatott érzékenység alapján a törzseket két csoportba lehet osztani. Az egyik csoportba azok a törzsek tartoztak, amelyekben a kezelés hatására (egy adott koncentrációtartományban) a homozigóta mutáns egyedek száma lecsökkent a ciszplatin koncentrációjának emelkedésével párhuzamosan, míg heterozigóta társaiké számottevően nem változott. Ezt a csoportot a génekre nézve specifikusan érzékenyeknek neveztük el, mert a ciszplatin szelektíven csak a homozigóta mutáns egyedekre volt hatással. A másik csoportba azon törzsek sorolhatóak, amelyekben a hatásos koncentrációtartományt elérve, a szer nemcsak a homozigótákat, hanem a heterozigótákat is jelentős mértékben pusztította. Ezeket nem érzékenyeknek neveztük el, mert abban a koncentrációtartományban, ahol a szer hatást váltott ki, mindkét genotípusra egyformán toxikusnak bizonyult.

A túlélő homozigóta utódok százalékos arányát a koncentráció függvényében ábrázolva megadható az adott génhez tartozó Relatív Letális Koncentráció (R-LC<sub>50</sub>) (5. ábra). Az R-LC<sub>50</sub> érték a ciszplatin azon mennyiségét jelenti, amelynél a homozigóta állatok 50%-a elpusztul a kezelés hatására.



5. ábra Az R-LC<sub>50</sub> érték kiszámolásának módja a mus304 példáján keresztül

A könnyebb összehasonlíthatóság érdekében az R-LC<sub>50</sub> értékek mólban számolt negatív logaritmusát oszlopdiagramon ábrázoltuk (7. ábra).



**6. ábra:** Az R-LC<sub>50</sub> értékek mólban számolt negatív logaritmusai *Drosophila melanogaster* DNS-ellenőrzési és hibajavítási mutánsokban

### 5. 1. A ciszplatinra specifikusan érzékeny mutánsok

A ciszplatin szelektíven hatott a *Rad1*, a *Spn-A*, az *Okra*, a *mus309*, a *mei41*, a *RecQ* és a *mus304* mutáns törzsekre. Az R-LC<sub>50</sub> értékeket összehasonlítva azt is megállapíthatjuk, hogy nem volt azonos az a koncentráció, amelynél a homozigóta állatok fele elpusztult, vagyis van különbség az egyes mutánsok érzékenységében.

A *Spn-A1* bizonyult a legérzékenyebbnek a ciszplatin kezelése során, hiszen már 2  $\mu$ M koncentrációban a homozigóta utódok pusztulását okozta. Ez a gén emberben és *Drosophilában* is egyaránt a rekombinációs hibajavításban vesz részt. Az általa kódolt fehérje képes kölcsönhatásba lépni az ssDNS-kötő fehérjével az RPA-val és a RAD25-tel. Ezekről feltételezik, hogy szerepet játszanak a homológok párosodásában. Ezek mellett kapcsolatban áll a BRCA1 és BRCA2 fehérjékkel, melyek fontosak a DNS-károsodás

következtében létrejövő celluláris válasz kialakításában. Hiányában a BRCA2 inaktiválódik, ami genetikai instabilitást eredményez (Subramanyam, 2013).

Az érzékenységi sorban a *Spn-A1* mutánsokat a *Rad1* követi, hiszen ezek a mutáns legyek a ciszplatint már 3  $\mu\text{M}$  koncentrációban nem képesek tolerálni. A *Rad1* gén egy olyan heterotrimer sejtciklus ellenőrzési pont komplex komponensét kódolja, amely képes a sejtciklus leállítását indukálni DNS-károsodás vagy hiányos DNS replikáció esetén. A hibamentes DNS-hibajavítási útvonal (error-free repair) egyik fontos résztvevője, illetve jelentős szerepet játszik a transzléziós DNS szintézisben is.

A *mei41* gén által kódolt G1/S-fázis ellenőrzési pontban résztvevő fehérje, a DNS-károsodást követő sejtválasz kialakítását biztosítja. A ciszplatin kezelést 6  $\mu\text{M}$  koncentrációig képes tolerálni. Mutációja következtében a homológ rekombinációs hibajavítás lépéseiben nem képes részt venni.

Az *Okra* egy DNS-hibajavítási ellenőrzőpontban résztvevő gén, melynek homozigóta mutánsai a ciszplatin 12  $\mu\text{M}$ -nál nagyobb koncentrációjú oldatára jelentős érzékenységet mutatnak. *Drosophilában* a gén által kódolt fehérje szerepet játszik a homológ rekombinációval kapcsolatos duplaszálú DNS-törés javításában. A kettőszálú DNS-hez való kötődése indukálja a DNS topológiai változását, ami könnyebbé teszi a DNS vágását és a rekombináció stimulálását.

A *mus304* az G1/S-fázis ellenőrzési pontjában résztvevő gén. DNS-sérülés hatására kölcsönhatásba kerül az egyszálú DNS-hez kötődő replikációs protein A-val. A *mus304* mutáns homozigóták 30  $\mu\text{M}$  koncentrációjú ciszplatin oldatra bizonyultak érzékenyek.

*Drosophilában* a *mus309* gén által kódolt RecQ helikáz felelős a duplaszálú hibajavításokért. Mutációja során ezeket a hibajavítási mechanizmusokat nem képes ellátni, ezáltal érzékenyebbé válnak a különböző DNS-károsító szerekre. A *mus309* homozigóta mutánsok a *mus304* mutáns törzshöz hasonlóan, a 30  $\mu\text{M}$  koncentrációjú ciszplatinra voltak fokozottan érzékenyek.

A *RecQ* gén által kódolt fehérje egy a RecQ családba tartozó helikáz, amely működése révén részt vesz a genetikai stabilitás megtartásában. A gén meghibásodása emberben összefüggésbe hozható a Werner szindrómával, ami egy autoszomális recesszív rendellenesség, mely korai öregedéssel és számos rákbetegség kifejlődésével jár együtt (Bernstein, 2010).

Megállapíthatjuk, hogy a vizsgált gének közül több tartozott a sejtciklus ellenőrzési gének közé, illetve, hogy a vizsgált sejtciklus ellenőrzési gének többsége érzékeny volt a

ciszpaltinra.

## 5. 2. A ciszpaltinra nem érzékeny mutánsok

A homozigóta és heterozigóta állatok azonos mértékben pusztultak a ciszpaltinos kezelések hatására a következő törzsek esetén: *mei-9*, *Pms2*, *Rad17*, *p53*, *loki*, *Rev1*, *Mad2* és *Rad-18 like*.

A *mei-9*, a *Rad17* és a *p53* törzsek esetén 30  $\mu\text{M}$  volt az a ciszpaltin mennyiség, aminek még nem volt semmilyen hatása az állatok életképességére. Viszont a 30  $\mu\text{M}$  koncentrációt meghaladó érték felett a heterozigóták és a homozigóták egyformán pusztultak, vagyis a ciszpaltin mérgező volt rájuk. Ezen mutánsok esetén nem állapítható meg tehát olyan koncentráció tartomány, amelyre csak a homozigóta mutánsok érzékenyek, a heterozigóták pedig jól tolerálják.

A *mei-9* gén által kódolt fehérje jelentős szerepet játszik a DNS 5' szál menti nukleotid kivágó hibajavításban. A gén mutációja egy autoszomális recesszív öröklődésű genetikai betegség, a Xeroderma pigmentosum kialakulásáért felelős.

A *Rad17* génről átíródó *Rad17*-homológ az ellenőrzési pont gének körében jelentős szerepet tölt be, valamint a DNS-károsodást követő válaszban szenzor proteinként funkcionál. Humánban a DNS-károsodás helyén képes a kromatinhoz kötődni, ahol a ATR kináz foszforilálja. Ezeken kívül részt vesz még a 9-1-1 komplex összeszerelődésében (Bao, 2001).

A *p53* fehérjét az Mdm2 ubikvitin ligáz lebontásra jelöli ki, ezért normális sejtekben csak alacsony koncentrációban fordul elő. DNS-károsodás hatására az ATR protein kináz és az ATM aktiválódik, melynek következtében képessé válnak a *p53* fehérje foszforilációjára, mellyel stabilizálják a sejtben belüli koncentrációját. A *p53* fehérje számos sejtciklus szabályozó folyamatban vesz részt. Ilyen például a sejtciklus felfüggesztése, az apoptotikus útvonal indukálása, illetve a DNS-károsodást helyreállító fehérjék aktiválása (Levine & Oren, 2009).

A *Pms2* mutánsok ciszpaltinos kezelése során a maximális koncentráció a 70  $\mu\text{M}$  volt. Ennél nagyobb koncentrációtartományban a *Pms2* mutánsok homozigóta és heterozigóta utódai kivétel nélkül elpusztultak. A gén terméke részt vesz a mismatch hibajavításban. Mutációja humán esetében örökletes nonpolyposis vastagbél rák és Turcot

szindróma kialakulásáért felelős.

A *loki*, a *Rev1*, a *Mad2* és a *Rad-18 like* mutáns törzseknél 70  $\mu$ M ciszplatin koncentrációnál tapasztaltunk csak hatást, de itt már nemcsak a homozigótákra volt hatással a szer, hanem a heterozigótákra is.

A *loki* által kódolt fehérje az G1/S-fázis ellenőrzési pontjában vesz részt. Aktiválódása során a fehérje gátolja a Cdc25c foszfatázt, megakadályozza a mitózis elkezdését, valamint stabilizálja a p53 tumor szupresszor fehérjét. A gén mutációjával kapcsolatba hozható a Li-Fraumeni daganatos betegség, a szarkóma, a mellrák, illetve az agydaganat kialakulása (Xu, 2001).

A *Rev1* génnek által kódolt fehérjék BRCT domént tartalmaznak, amely fontos szerepet játszik a fehérje-fehérje kölcsönhatásokban. Hiánya következtében a transzléziós DNS szintézis elmarad.

A *Mad2* gén az orsó összeszerelődési ellenőrzési pontban résztvevő fehérjét kódolja. Hiányában rendellenessé válik a testvérkromatidák szétválása, illetve gátlódik a metafázis-anafázis átmenete a sejtciklus során (Avram, 2014).

A *Rad-18 like* gén által kódolt fehérje egy úgynevezett „ring-finger” motívumot hordoz, amely lehetővé teszi a Rad6 ubiquitin konjugáló enzimmel való kapcsolódást. (Huang, 2009). Jelentős szerepet tölt be a DNS-replikációt követő hibamentes DNS-hibajavítási útvonalban (error-free repair) és a DNS-károsodás utáni transzléziós DNS-szintézisben.

## **6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA**

A kemoterápiás kezelés során gyakran fellépő probléma, hogy még az ugyanolyan típusú tumorról rendelkező betegek is eltérően reagálhatnak ugyanarra a kezelésre. Ennek oka valószínűleg a tumoros sejtek egyedi, megváltozott genotípusában keresendő. A mai tumor ellenes kezelések mellett a személyre szabott rákterápiának nagyobb teret kellene biztosítani, hiszen az egyénileg kiszabott kezelés eredményesebbnek bizonyulhat a rák gyógyítása szempontjából. A legtöbb gyógyszer több hatással rendelkezik, a kívánt hatás és a nem-kívánt mellékhatás a terápiás index meghatározásával fejezhető ki. A legtöbb kemoterápiás szerről elmondható, hogy ezeknek a készítményeknek a terápiás indexe meglehetősen rossz. Ha egy gyógyszer adagját emeljük, előbb-utóbb mellékhatások, majd toxikus hatások lépnek fel. A terápiás index két dózis-hatás görbe összevetése, amely megmutatja, hogy egy gyógyszer mennyire biztonságos. Egy anyagnak, a koncentráció függvényében egyaránt lehet jó és rossz hatása is. A rossz terápiás index- szel rendelkező szerek esetében ezeknek a különböző hatásoknak a koncentrációja nagyon közel van egymáshoz. Az lenne a megfelelő, ha olyan citosztatikumokkal kezelnék a betegeket, amelyeknél a jó hatás és a rossz hatás messze van a koncentrációtartományban.

A sejtciklus ellenőrzési és DNS hibajavítási útvonalakban betöltött szerepük révén, az gondolható, hogy ezen gének funkciókiesése jelentősen fokozza a sejtek érzékenységet a DNS károsító ágensekkel szemben, mint amilyen a ciszplatin is. Ez az alapja a kemoterápiás kezeléseknél is, ahol azt várják, hogy a citosztatikumok elpusztítják a káros mutációkat felhalmozó sejteket. Eredményeinkből azonban látható, hogy a különböző gének mutációit hordozó állatok eltérő érzékenységet mutatnak a ciszplatinnal szemben, vagyis egyáltalán nem mindegy, hogy milyen mutációt hordoz az a sejt, amit egy adott citosztatikummal kezelnek.

Megfigyeltük, hogy a *Rad1*, *Spn-A*, *Okra*, *mus309*, *mei41*, *RecQ*, *mus304* gének hibája fokozottan érzékennyé teszi a homozigóta mutáns állatokat a ciszplatinra, azonban az érzékenységük nem azonos. A legkisebb dózissal érzékenynek a *Spn-A1* mutáns bizonyult, míg a legnagyobb dózissal a *RecQ* mutáns. A *Spn-A1* mutáns esetén a *RecQ*-nál ható koncentráció már a heterozigótákra is toxikus, míg a *RecQ* esetén a *SpnA1*-nál hatásos koncentráció még nem pusztítja el a hibás sejteket.

A gének többségénél nem találtunk szelektív érzékenységet. Ezeknél a törzseknél abban a koncentrációtartományban ahol a szer hatásosnak bizonyult, vagyis elpusztította a

homozigóta mutáns állatokat, nemcsak a homozigóták életképességét romlott jelentős mértékben, hanem a heterozigótákét is. Azt mondhatjuk, hogy az ezeket a funkcióvesztéses allélokat hordozó törzsek egy bizonyos koncentráció tartományban egyáltalán nem érzékenyek a ciszplatinra, ezt meghaladó koncentrációtartományban pedig toxikussá válik a szer. Elképzelhető, hogy ezek a génhibák nem okoznak a sejtekben olyan számottevő genetikai instabilitást, ami befolyásolná a ciszplatinos kezelésre adott érzékenységi választ, vagy a sejtek képesek egyéb DNS hibajavítási útvonalakon keresztül kijavítani a keletkezett hibákat.

Megállapíthatjuk, hogy a megfelelő dózisnak nagyon fontos szerepe van a hatás szempontjából. Nem egyszerű megtalálni azt a már hatásos koncentrációt, aminek még a legkisebb a káros hatása az egészséges sejtekre. Ez a tény felhívja a figyelmet a gyógyászatban használt kemoterápiás dózis megállapításának nehézségére. A mai orvosi gyakorlatban a beteg testfelülete határozza meg a kapott szer mennyiségét. Valószínűsíthető, hogy ez nem a legmegfelelőbb meghatározási módszer.

A kísérlet eredménye alapján felmerül, hogy talán nem annyira új szerekre lenne szükség a rákos betegek kezeléséhez, mint inkább a személyre szabott rákterápiának kellene nagyobb teret biztosítani, jobban meg kellene határozni egy-egy tumor érzékenységét.

## **7. ÖSSZEFOGLALÁS**

A sejtciklus jól összehangolt és szigorúan szabályozott folyamatokból áll, melyeket különböző ellenőrzési pontok tesznek még hatékonyabbá. Ezekben az ellenőrzési mechanizmusokban és a DNS hibajavítási útvonalakban bekövetkező hibák vagy működési rendellenességek genetikai károsodások felhalmozódásához vezetnek, amelyek az egyik legfőbb kiváltó okai a rák kialakulásának.

A rákos megbetegedések kialakulásának hátterében az örökítő anyagot érintő mutációk felhalmozódása áll. A kemoterápiás kezelés során olyan gyógyszereket alkalmaznak, amelyek a gyorsan szaporodó daganatos sejteket elpusztítják, azonban nagy hátrányuk, hogy a szervezet normálisan osztódó sejteire is toxikus hatást fejtenek ki.

A sejtciklus ellenőrzési és DNS-hibajavító folyamatokban résztvevő gének közös jellemzője, hogy evolúciósan konzerváltak és mutánsaik különösen érzékenyek a genotoxikus szerekre. Munkánk során ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) sejtciklus ellenőrzési és DNS-hibajavító mutánsokat kezeltünk a kemoterápiás kezelésében használt egyik szerrel, a ciszplatinnal.

A különböző mutánsok ciszplatinnal szembeni érzékenységét relatív toxicitási tesztekben határoztuk meg. Ezek lényege, hogy a homo- és heterozigótákat azonos környezetben kezeljük, így meghatározható az eltérő érzékenységük a szerrel szemben. Törzsenként minden koncentráció értéknél meghatároztuk a túlélő homo- és heterozigóta adultak számát. Ezek arányából határoztuk meg a relatív letális koncentrációs (R-LC50) értékeket, ami a szer hatóanyagának azon mennyiségét jelenti, amelynél a homozigóta utódok aránya felére csökken az elméletileg várható értékhez képest.

Eredményeinkből az látható, hogy a különböző sejtciklus ellenőrzési és DNS-hibajavító gének mutánsai eltérő érzékenységet mutatnak a ciszplatinnal szemben. Találtunk olyan mutánsokat, melyeknél az adott gén hibája fokozottan érzékennyé tette a homozigóta mutáns állatokat a ciszplatinnal, azonban ezek specifikitása eltérő volt. A gének többségénél azonban nem találtunk szelektív érzékenységet. Humán tumorokra vonatkoztatva, eredményeink azt jelezhetik, hogy a tumorok tapasztalt eltérő kemoszenzitivitásáért esetleg különböző checkpoint, vagy DNS-hibajavítási mutációk lehetnek felelősek.

## **8. IRODALMI HIVATKOZÁSOK**

Avram S, Mernea M, Mihailescu DF, Seiman CD, Seiman DD, Putz MV (2014) Mitotic checkpoint proteins Mad1 and Mad2 - structural and functional relationship with implication in genetic diseases. *Curr Comput Aided Drug Des.* 2014;10(2):168-81.

A. J. Levine, M. Oren (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer.* 2009 October; 9(10): 749–758.

Bao S, Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Fang Y, Richardson DA, Ali A, Chen SM, Abraham RT, Wang XF. (2001) ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. *Nature* 411(6840):969-74.

Bernstein, K.A., Gangloff, S., and Rothstein, R. (2010) The Role of the RecQ Helicases in DNA repair. *Annual Review of Genetics*, 44: 393-417.

Eastman A. (2004) Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies. *J. Cell. Biochemistry* 91, 223-231

Dasari S, Tchounwou PB. (2014) Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014 Oct 5;740:364-78. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025. Epub 2014 Jul 21.

Gabrielli B, Brooks K, Pavey S., (2012) Defective Cell Cycle Checkpoints as Targets for Anti-Cancer Therapies, *Front Pharmacol.* 2012 Feb 2;3:9

Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. (2001) Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol.* 2001 Apr;59(4):657-63.

Friedberg EC.(2003) DNA damage and repair. *Nature* 421(6921):436-40.

FlyBase: <http://flybase.org/>

- Hartwell L. H., (1991) Twenty-five years of cell cycle genetics. *Genetics*. 129(4):975-80.
- Hartwell L.H. (1992) Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 13;71(4):543-6.
- Huang J, Huen MS, Kim H, Leung CC, Glover JN, Yu X, Chen J. (2009) RAD18 transmits DNA damage signalling to elicit homologous recombination repair. *Nat Cell Biol*. (5):592-603.
- Lee SJ. , Park MT. ,(2003) Cell Cycle and Cancer. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36(1) 60-65.
- Li GM. (2008) Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res*. 18(1):85-98.
- M J P Welters, A M J Fichtinger-Schepman, R A Baan, A J Jacobs-Bergmans, A Kegel, W J F van der Vijgh, and B J M Braakhuis (1999) Pharmacodynamics of cisplatin in human head and neck cancer: correlation between platinum content, DNA adduct levels and drug sensitivity in vitro and in vivo, *Br J Cancer*. Jan 1999; 79(1): 82–88.
- Morgan D. O., (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors *Annu Rev Cell Dev Biol*. 13:261-91.
- Morgan, D. O. (2006). The Cell Cycle: Principles of Control. *New Science Press* ISBN:978-0878935086.
- Ozols, R. F. and Young, R. C. High-dose cisplatin therapy in ovarian cancer. *Semin. Oncol.*(12), 21-30. 1985. Parrilla-Castellar ER, Arlander SJ, Karnitz L. (2004) Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA Repair (Amst)* 3(8-9):1009-14.
- Peters JM. (1998) SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr Opin Cell Biol*. 1998 Dec;10(6):759-68.

- Tan AL, Rida PC, Surana U. (2005) Essential tension and constructive destruction: the spindle checkpoint and its regulatory links with mitotic exit. *Biochem J.* 2005 Feb 15;386(Pt 1):1-13.
- Shapiro G.I., and Harper J.W. (1999) Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *J. Clin. Investigation* 104(12), 1645-1653.
- Subramanyam S<sup>1</sup>, Jones WT, Spies M, Spies MA. (2013) Contributions of the RAD51 N-terminal domain to BRCA2-RAD51 interaction. *Nucleic Acids Res.* 2013 Oct;41(19):9020-32. doi: 10.1093/nar/gkt691. Epub 2013 Aug 8.
- Xu J, Xin S, Du W. *Drosophila* Chk2 is required for DNA damage-mediated cell cycle arrest and apoptosis. *FEBS Lett.* 2001 Nov 23;508(3):394–398.

## **9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Mindenekelőtt, szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Deák Péternek, aki lehetőséget biztosított rá, hogy bekapcsolódjak a csoportjában folyó kutatásba és tudásával, hasznos tanácsaival és segítőkészségével támogatta szakdolgozatom létrejöttét.

Külön köszönettel tartozom, Tomisa Bernadettnek a rengeteg hasznos tanácsért és tanításért, a laborban használt tudományos technikák elsajátításáért és a szakdolgozatom megírásához nyújtott fáradhatatlan segítségéért.

Továbbá szeretném megköszönni, Dr. Pál Margitnak és Kovács Leventének az elmúlt évben nyújtott segítségüket, valamint családomnak, hogy tanulmányaim során türelemmel és megértéssel támogattak, illetve minden helyzetben mellettem álltak.

## **10. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS**

Alulírott *Ottlik Dorottya* a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- táptalajok előkészítését
  - megfelelő ciszplatin koncentrációtartományok meghatározását és kimérését
  - 15 mutáns törzs ciszplatinnal való kezelését
  - a ciszplatinos kezelések kiértékelését
  - az R-LC50 értékek meghatározását
- végeztem el.

---

Szeged, 2014 november 13.