

EGYETEMI DOKTORI (Ph. D.) ÉRTEKEZÉS

A $p16^{INK4A}$ és $p14^{ARF}$ tumor-szuppresszor gének genetikai és promóter metilációs változásainak szerepe a CML progressziójában és az EBV-fertőzött B-sejtek tumorgenezisében

Nagy Etelka

Témavezető: Dr. Beck Zoltán

DEBRECENI EGYETEM

Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Általános Orvostudományi Kar

Orvosi Mikrobiológiai Intézet

2005

TARTALOMJEGYZÉK

	OLDAL
RÖVIDÍTÉSEK	4
BEVEZETÉS	
5	
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
<i>Sejtciklus</i>	7
<i>Ciklin-dependens kinázok (CDK) és inhibitorok (CDKI)</i>	7
<i>Tumor-szuppresszor gének</i>	8
- <i>Retinoblasztóma (RB)</i>	11
- <i>p53</i>	11
- <i>p16^{INK4A} és p14^{ARF}</i>	12
<i>A p16^{INK4A} /p14^{ARF} gének szerepe a különböző tumorokban, sejtvonalakban</i>	14
<i>Krónikus mieloid leukémia (CML)</i>	17
<i>Epstein-Barr vírus (EBV)-asszociált tumoros sejtvonalak</i>	19
CÉLKITŰZÉSEK	22
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	23
<i>CML-es minták</i>	23
<i>Granulociták szeparálása</i>	23
<i>Sejtvonalak</i>	23
<i>B-limfociták szeparálása</i>	24
<i>EBV termelése</i>	24
<i>B-limfociták fertőzése EBV-vel</i>	24
<i>DNS izolálás</i>	25
<i>Polimeráz láncreakció (PCR)</i>	25
<i>Egyszálú konformációs polimorfizmus (SSCP) analízis</i>	25
<i>DNS szekvenálás</i>	26
<i>Metiláció-specifikus polimeráz láncreakció (MSP)</i>	26
<i>Citogenetikai vizsgálatok</i>	27
EREDMÉNYEK	28
<i>Hematológiai és citogenetikai adatok</i>	28
<i>De novo LCL-ek kialakítása</i>	29

<i>INK4A/ARF</i> lokusz kódoló szakaszainak PCR-SSCP analízise	29
<i>INK4A/ARF</i> lokusz szekvencia analízise	29
A $p16^{INK4A}$ és $p14^{ARF}$ promóterek metilációs vizsgálata	30
MEGBESZÉLÉS	32
A $p16^{INK4A}$ és $p14^{ARF}$ gének genetikai és promóter metilációs változásainak vizsgálata a CML krónikus és akcelerált fázisában (1. közlemény)	32
A $p16^{INK4A}/p14^{ARF}$ gének szekvenciális és metilációs eltéréseinek tanulmányozása EBV-vel fertőzött LCL-ekben és BL sejtvonalakban (2. közlemény)	34
ÖSSZEFOGLALÁS	37
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	38
IRODALOMJEGYZÉK	39
KÖZLEMÉNYEK	53
FONTOSABB ELŐADÁSOK, POSZTEREK	54

RÖVIDÍTÉSEK

AF	akcelerált fázis
BL	Burkitt limfóma
CML	chronic myeloid leukaemia (krónikus mieloid leukémia)
EBER	EBV által kódolt kis méretű RNS
EBNA	Epstein-Barr nuclear antigen (Epstein-Barr nukleáris antigén)
EBNA-LP	EBNA-leader protein
EBV	Epstein-Barr vírus
KF	krónikus fázis
FBS	fetal bovine serum (magzati borjúsavó)
LCL	lymphoblastoid cell line (limfoblasztoid sejtvonal)
LMP	latent membrane protein (látens membránfehérje)
MSP	methylation-specific PCR (metiláció-specifikus PCR)
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (perifériális vér mononukleáris sejtei)
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz lánreakció)
PDL	population doubling level (osztódások száma)
Ph	Philadelphia kromoszóma
RB	retinoblasztóma
SSCP	single-strand conformation polymorphism (egyszálú konformációs polimorfizmus)
TPA	tetra phorbol acetate (tetra-forbol-észter)

BEVEZETÉS

Az elmúlt évtized molekuláris genetikai kutatásainak eredményei alapján általánosan elfogadott, hogy a daganatképződés szempontjából kritikus fontosságú génekben (onkogének, tumor-szuppresszor és DNS kijavításában közreműködő gének) bekövetkező mutációk felhalmozódása vezet a tumorok kialakulásához (Cavenee WK 1995). A malignus fenotípus megjelenésében a genetikai változások mellett fontos szerepük van az epigenetikai inaktivációs mechanizmusoknak is. A fent említett kulcsfontosságú gének promótereinek hipermetilációja jelentős szerepet játszik a transzkripció és a sejtciklus folyamataiban. A celluláris és virális promóterek szabályzó régióban a CpG dinukleotidok metilációja direkt módon gátolja a transzkripciós faktorok kötődését, közvetetten pedig inaktív kromatinsztruktúra kialakulásához vezet, és a promóter kikapcsolását eredményezi (Lewis JD 1992, Esteller M 2001).

A $p16^{INK4A}$ és $p14^{ARF}$ tumor-szuppresszor gének genetikai és epigenetikai inaktivációjának gyakoriságát számos malignus kórképben vizsgálták. Azonban ezen gének károsodása és a tumor progressziója közötti összefüggést kevésbé tanulmányozták. Vizsgálataink egy részét az egyik leggyakoribb leukémia típus, a krónikus mieloid leukémia (CML) különböző fázisaiból származó mintákon végeztük. A CML progressziójával kapcsolatos korábbi molekuláris biológiai kutatások döntően a krónikus fázis (KF) és a blasztos krízis összehasonlítására szorítkoztak. Akcelerált fázisból (AF) származó mintákat kevés esetben vizsgáltak, és a kis esetszám miatt ezek az eredmények nem voltak alkalmasak definitív következtetések levonására. Ezekből az előzményekből kiindulva követéses vizsgálatokban hasonlítottuk össze a $p16^{INK4A}$ és a $p14^{ARF}$ tumor-szuppresszor gének változásait a CML krónikus és akcelerált fázisában.

A DNS tumorvírusok onkoproteinjei beavatkozhatnak a sejtciklus szabályozásába. Mivel kontrollálatlan sejtproliferációt is eredményezhetnek, ezért kísérleteinket Epstein-Barr vírussal (EBV) fertőzött mintákon is elvégeztük. Korábban Burkitt limfómás (BL) sejtvonalakon, biopsziákon és EBV-vel immortalizált limfoblasztoid sejtvonalakon (LCL) más szerzők már beszámoltak a $p16^{INK4A}$ gént érintő mutációs és metilációs változásokról. A $p14^{ARF}$ gént illetően azonban kevés vizsgálat történt. Nem tanulmányozták EBV-vel transzformált B-limfocitákban, frissen kialakított LCL-ekben és folyamatos passzálon átesett LCL-ekben a $p16^{INK4A}/p14^{ARF}$ génben bekövetkező genetikai és epigenetikai változások szerepét sem. A különböző EBV-vel asszociált tumorokban a vírusfehérjék expressziós mintázata eltérő. Az EBV-pozitív sejtvonalak látencia típusa és ezáltal az expresszált virális

proteinek jól ismertek. Közismert, hogy a humán populáció EBV fertőzöttsége nagy, azonban a vírus és a daganat kifejlődése közötti ok-okozati összefüggés számos esetben nem bizonyított. Ezért a vírus szerepe sejtvonalakon sokkal inkább tanulmányozható. Kísérleteink második felében normál B-limfocitákban, frissen kialakított LCL-ekben, immortalizált LCL-ekben és BL sejtvonalakban vizsgáltuk a fent említett 2 tumor-szuppresszor gén változásait.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Sejtciklus

A sejtek osztódáskor önmagukkal azonos vagy közel azonos utódsejteket hoznak létre a sejtciklus során. Az osztódások között megduplázzák genetikai állományukat, és azokat szétosztják két utódsejt között. A sejtciklus S fázisában a DNS replikációja történik. A sejtciklus M fázisában (mitózis) az összetömörített kromoszómák mikrotubuláris orsóra kerülnek, majd az anafázisban a testvérkromatidák szegregálódnak (Nurse P 1994). A sejtciklus ellenőrző mechanizmusa képes gátolni ezt a két szakaszt. Az S fázis előtt a citoplazmatömeg ellenőrzése történik, csak akkor kezdődhet meg a DNS szintézis ha az egy kritikus mértéket meghalad. A sejtek citoplazmájának növekedése a sejtciklus G_1 fázisában zajlik (Pardee AB 1989). Az M fázis előtt is létezik egy ellenőrző pont, ugyanis a kromatidák szétválasztása csak akkor következhet be, ha a DNS replikáció befejeződött, és a kromoszómák mindegyike a mitotikus apparátushoz kapcsolódott. A DNS hibajavító gének kijavítják a DNS hibákat, megakadályozva azok átadását az utódsejtekbe. Ez a sejtciklus G_2 fázisa. A G_1 , S, G_2 , M fázisok meghatározott sorrendjét egy bonyolult, fehérjékből álló szabályozó hálózat irányítja. A sejtek funkcióképesek tudnak maradni akkor is, ha nem proliferálnak, kilépnek a sejtciklusból, ezt az ún. nyugalmi állapotot G_0 fázisnak nevezzük (Pardee AB 1989, Nasmyth K 1996).

A sejtciklus szabályozásában, DNS kijavításában közreműködő gének, onkogének, tumor-szuppresszor gének és ciklin-dependens kinázok (CDK) vesznek részt. Az onkogének a sejtosztódás agonistái, a sejtciklus G_1 -S átmenete során fejtik ki funkciójukat, elősegítik a sejteknek a sejtcikluson való áthaladását. Ezzel szemben a tumor-szuppresszor gének a sejtosztódás antagonistái, gátolják a sejtek G_1 -ből S fázisba, valamint a G_2 -ből M fázisba történő átmenetét (Ho A 2002). A ciklin-függő kinázok az onkogénekhez hasonlóan a sejtek a sejtciklus különböző fázisán való átjutását segítik. Ezek a szabályzásban részt vevő elemek egymásra is hatnak, a sejtciklus szabályozó rendszerének alapját képezik (King RW 1996).

Ciklin-dependens kinázok (CDK) és inhibitoraik (CKI)

A sejtciklus szabályozásában olyan protein kinázok is részt vesznek, amelyek csak akkor aktívak, ha hozzájuk egy szabályzó fehérje alegység, ún. ciklin kapcsolódik, melyre jellemző, hogy koncentrációja folyamatosan változik a sejtciklus során. Ennek megfelelően

ezeket a protein kinázokat ciklin-függő kinázoknak (CDK) hívjuk. A ciklin oszcilláció háttérében részben mRNS-ük transzkripció szabályozása, részben ubiquitin ligáz által meghatározott proteolízis áll. A CDK-k szabályozásban a ciklinek mellett a CDK inhibitorai (CDKI) vesznek részt (Hunter T 1994, Ortega S 2002).

A CDK-k aktiválódhatnak ciklinkötődéssel, valamint treonin oldalláncuk foszforilációjával. Inaktiválódásuk az N-terminális vég közelében elhelyezkedő oldalláncok foszforilációjával, valamint CDKI-k által történhet.

A G₁ fázisban alacsony CDK aktivitás jellemző a CDKI-k jelenléte, illetve a ciklin gének transzkripciójának gátlása miatt. Az S fázisban a ciklinek szintézise után a CDK-k elindítják a replikációt. Az M fázisban a CDK-k aktiválják az anafázist elősegítő komplexeket (APC), ami a ciklinek lebontásához vezet. Az aktív APC-t a G₁ fázisban felhalmozódó CDK-k kapcsolják ki (King RW 1996).

A sejtciklus G₁ fázisának progresszióját a CDKI-k 2 csoportja szabályozza. Az egyik csoport a Cip/Kip családba tartozó p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2} proteinek, amelyek a Ciklin D-, E-, és A-dependens kinázok aktivitását befolyásolják. Heterodimer formában kötődnek a ciklin-CDK2 komplexhez, és gátolják annak aktivitását. A CDKI-k másik csoportja az INK4 (inhibiting cdk4) családba tartozó p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D} fehérjéket foglalja magában. Ezek a fehérjék csak a CDK4 és CDK6-hoz tudnak kötődni, magához a ciklin D-hez nem. A CDK4/6-hoz való kapcsolódásukkal megakadályozzák annak ciklin D-hez kötődését, így gátolják a sejtciklus G₀-G₁ átmenetét. A sejtciklus során további ciklin-CDK kapcsolatoknak van szabályzó szerepük: a ciklin B-CDK1 a G₂-átmenetet, a ciklin E-CDK2 a G₁-S átmenetet gátolják (Sherr CJ 1998, Sherr CJ 1999, Ho A 2002).

Tumor-szuppresszor gének

A sejtprolifерáció negatív szabályzói a tumor-szuppresszor gének, vagy antionkogének. A tumor-szuppresszor géntermékek negatív visszacsatoló mechanizmusokban vesznek részt. Gátolják a sejtek G₁ fázisból S fázisba jutását, illetve a szintézis után szabályozzák a G₂ és M fázisba történő átmenetet is. Felfedezésük normál és transzformált sejtek fúziójával létrehozott sejt kultúrán végzett kísérletekkel történt. Azt tapasztalták, hogy a fuzionált hibrid sejtek elveszítették onkogenitásukat. Csak akkor alakult ki tumor, ha a normál kromoszóma elveszett, vagy valamely génjében (tumor-szuppresszor gén) deléción következett be (Marsall CJ 1991).

A tumor-szuppresszor gének recesszívek, szemben a dominánsan ható onkogénekkal. Míg az onkogének egyik kópiájának szomatikus mutációja elégséges a malignus fenotípus kialakulásához, a tumor-szuppresszor gének funkciója akkor szűnik meg, ha a mutáció mindkét allélban bekövetkezik, vagy az egyik allélban létrejött mutációt követi a másik allél elvesztése, amely ezáltal homozigótaság kialakulásához vezet (Knudson AG 1971). Ezekben a génekben a mutáció a szomatikus és az ivarsejtekben is jelen lehet, azaz öröklhető. Az onkogének esetén csak a szomatikus sejtben következhet be mutáció, ezért nem öröklődik.

Daganatos megbetegedés alakulhat ki az onkogének aktivitásának, illetve expressziós spektrumának megváltozásán kívül akkor is, ha a tumor-szuppresszor gének inaktiválódnak. Ellentétben az onkogénekkal, ahol a fehérje megváltozott funkciója okozza a folyamatos sejtproliferációt, a tumor-szuppresszor gének esetében a fehérje funkciójának elvesztése okoz tumort. A tumor-szuppresszor fehérjék inaktiválódása leggyakrabban a génben bekövetkező aberrációra, vagy egyes DNS vírusok korai fehérjéinek szerepére vezethető vissza. Egy tumorgátló gén számos szövetben, míg adott onkogén csak kevés szövetben képes tumort okozni. A tumor-szuppresszor fehérjék jelentős része a magban (pl.: RB, p53, WT-1, p16^{INK4A}/p14^{ARF}, BRCA1) lokalizálódik. Közülük néhány transzkripciós faktor, illetve DNS kötőfunkcióval is rendelkezik, így részt vesz a génexpresszió szabályozásában. A sejtmagon kívül a citoszolban (pl.: APC, MCC), a sejtmembránban, illetve a membránhoz kötve (pl.: DCC, NF-1, NF-2, VHL) is elhelyezkedhetnek (Gao X 1995).

Az ismert tumor-szuppresszor géneket, azok kromoszomális lokalizációját és a különböző daganatokkal való kapcsolatukat az I. táblázat mutatja be. Ezek közül a *retinoblasztóma (RB)*, *p53*, *p16^{INK4A}/p14^{ARF}* géneket részletesebben is jellemezzük.

I. táblázat: Tumor-suppresszor gének lokalizációja, funkciója és velük összefüggésbe hozható daganattípusok

<i>Kromoszóma</i>	<i>Gén</i>	<i>Funkció</i>	<i>Jellemző daganat és társuló kórkép</i>
2p16	MSH6/GTBP	DNS-repair	HNPCC, endometrium-, petefészek-,
2p22-21	MSH2	DNS-repair	húgyvezeték-, vastagbél-, végbél-,
3p21.3-p23	MLH1	DNS-repair	gyomorrák
3p25	VHL	?	VHL, világossejtes veserák, retinális angióma, hemangioblasztóma, KIR
5q11-13	MSH3	DNS-repair	
5q21	APC	β -katenin-szabályozás	FAP, vastagbél-, végbéladenóma, retina-daganat, dezmoid tumorok
	MCC	?	vastagbél-, tüdő-, gyomor-, nyelőcső-, emlő-, prosztatata-, petefészekrák
9p13	MLM	?	familiáris melanóma
9p21-22	INK4A	CDK-gátlás	melanóma, hasnyálm.-, tüdő-, vastagbél-, végbélrák, vérképzés betegsége
9q22.3	PTCH	jelátadás	Gorlin-szindróma, bőr-, petefészekrák
10q23.3	PTEN/MMAC	tirozin-foszfátáz	Cowden-betegség, pajzsmirigy-, urogenitális daganat, gangliocitóma
11p13	WT1	Transzkripció faktor	Wilms-tumor, szem-, húgyhólyagrák,
11p15	p57/KIP2	sejtciklus szabályozás	WBS, Wilms-tumor, hepatoblasztóma, fejlődési rendell., adrenokortikális rák
11q13	MEN1	?	MEN1., pancreas carcinoma
11q22	ATM	DNS-repair	ATM, limfóma, emlőrák
13q12-13	BRCA2	DNS-repair	emlő-, hasnyálmirigyrák
13q14.3	RB	sejtciklus-szabályozás	RB, csont-, emlő-, tüdő-, vese-, méhnyak-, csontvelőrák
17p13.1	P53	Transzkripció faktor	LFS, szarkóma, emlőrák, leukémia, agy-, tüdő-, vastagbél-, vese-, máj-, gyomor-, hasnyálm.-, hererák
17q11	NF1	p21 GTPáz	NF1, neurofibróma, agy-, csonttrák
17q21	BRCA1	DNS-repair	emlő-, prosztatata-, petefészekrák
18q21.1	SMAD4/DPC4	TGF β -jelátvivő	hasnyálmirigyrák
18q21.3	DCC	sejtdhézió	vastagbél, gyomor, szájüreg, nemi szervek, hasnyálmirigy daganata
19p	LKB1	szerin-treonin kináz	PJS, vastagbélrák
22q12.2	NF2	sejtdhézió	NF2, akusztikus neuróma, glióma

Rövidítések: ATM: Ataxia teleangiectasia, FAP: Familiaris adenomatous polyposis, HNPCC: hereditær nem polyposus colorectalis carcinoma, KIR: központi idegrendszer, LFS: Li-Fraumeni-szindróma, MEN: multiplex endokrin neoplasia, NF: Neurofibromatosis, PJS: Peutz-Jeghers szindróma, VHL: von Hippel-Lindau-szindróma, WBS: Wiedemann-Beckwith-szindróma

Retinoblasztóma (RB)

A *RB* gén a 13-as kromoszóma hosszú karján helyezkedik el. Erről egy 105 kD molekulású, 928 aminosavból álló nukleáris foszfoprotein, a retinoblasztóma fehérje íródik át (Yunis JJ 1978, Lee WH 1987, Hong FD 1989). Az *RB* fehérje a sejtciklus szabályozásában vesz részt, működése a foszforiláltsági állapotától függ (Lee WH 1987, Herwig S 1997).

A sejtciklus G_0/G_1 fázisában az *RB* protein hipofoszforilált, azaz aktív állapotban van, ilyenkor köti az E2F transzkripciós faktort. A *RB*-E2F komplex gátolja az E2F transzkripcióját, ezáltal a sejtproliferációt, illetve azt, hogy a sejt az S fázisba lépjen. Az inaktív *RB* fehérje hiperfoszforilált, ezáltal elveszíti a nukleáris mátrix-, és transzkripciós faktor-kötő képességét, így az E2F szabaddá válik. Ez azt eredményezi, hogy a sejtek a G_1/G_0 fázisból az S fázisba lépnek (Alberts AS 1993). Az *RB* fehérjét a DNS tumorvírusok korai fehérjéi is inaktiválhatják (pl.: EBNA-3C, EBNA-LP) (Jiang WQ 1991, Parker GA 1996). Az *RB* több onkogén transzkripciójának befolyásolása által is szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában (Gao X 1995, Grana X 1998).

p53

A *p53* gén megközelítőleg 20 kb nagyságú, a 17-es kromoszóma rövid karján lokalizálódó DNS szakasz (Isobe M 1986). A gén terméke 393 aminosavból épül fel, öt funkcionális doménből áll: N-terminális transzkripciós aktivátor (Unger T 1992), prolinban gazdag szabályzó régió, a középső szekvencia-specifikus DNS-kötő szakasz (el Deiry 1992), valamint a C-terminálisan lokalizálódó tetramerképzésért felelős oligomerizációs rész (Kraiss S 1988) és a *p53* aktivitását befolyásoló szabályzó domén (Ko LJ 1996, Shaw P 1996, Okorokov AL 1997).

A *p53* a genom stabilitását biztosítja, így központi szerepet játszik a tumorok kialakulásának gátlásában (Lane DP 1992). A gén DNS károsodásra, hipoxiára, onkogén szignálra aktiválódhat, amely a fehérje mennyiségének gyors növekedését okozza. A protein aktiválhat sejtproliferációt gátló géneket, vagy gátolhat sejtproliferációt serkentőket. A sejtet a G_1 fázisban tartják, időt hagyva a DNS repair mechanizmusoknak. Ha ez a mechanizmus a hibát nem tudja kijavítani, a *p53* programozott sejthalált (apoptózist) indukál (Levine AJ 1997). A *p53* normális funkcióját számos virális onkoprotein (pl.: HPV E6, adenovírus E1B,

EBNA-LP) és celluláris fehérje (pl.: MDM-2, p14^{ARF}) is modulálhatja. Ezek a fehérje-fehérje kölcsönhatások a p53 specifikus DNS-kötő képességének és/vagy transzaktiváló hatásának (pl.: adenovírus E1B, MDM-2) gátlásával, illetve a fehérje degradációjának fokozásával (pl.: HPV E6) idézik elő a fehérje funkciójának kiesését (May P 1999).

p16^{INK4A} és p14^{ARF}

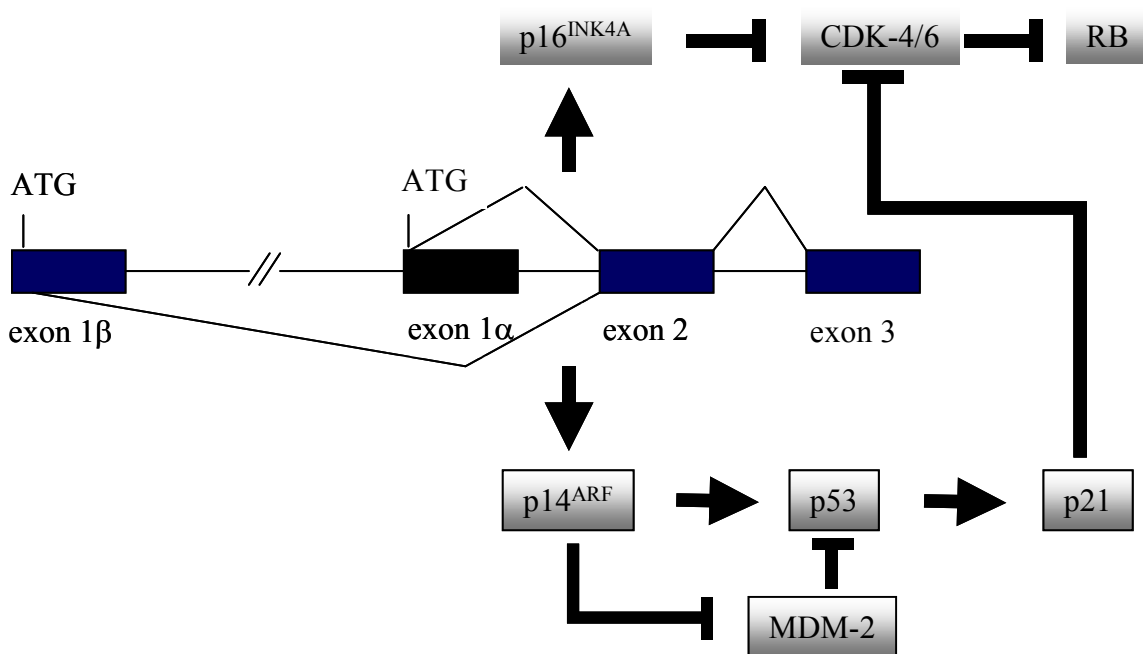
1993-ban egy új gént fedeztek fel a humán 9-es kromoszóma rövid karján (9p21) (Serrano M 1993). Az első közlemények még csak egy, a cDNS-ről átíródó 16 kDa molekulású proteinről számoltak be. Élesztő két-hibrid rendszer alkalmazásával egyértelművé vált, hogy ez a fehérje CDK4 inhibitor funkcióval (inhibiting cdk4) rendelkezik, ezért a gént *INK4A*-nak, az átíródott fehérjét pedig a p16^{INK4A}-nak nevezték el. A későbbi tanulmányokban különböző nevekkel illették ezt a gént. Mivel számos tumorban írtak le korábban 9p21 abnormalitást, ezért többféle szövetre specifikus tumor-szuppresszor génnek, *MTSI*-nek (multiple-tissue tumor suppressor gene) (Fountain JW 1992, Olopade OI 1992), az aberráció következtében kialakuló melanóma miatt melanómára hajlamosító génnek, azaz *MLM1*-nek (melanoma susceptibility gene) (Cannon-Albright LA 1992), illetve a humán genom projektben a lókuszt elnevezése alapján *CDKN2*-nek is nevezik (Ruas M 1998).

Korábban az *INK4A* génről úgy tudták, hogy 3 exont foglal magában. Majd 1995-ben felfedezték, hogy az első exont 20 kb távolságra egy további exon előzi meg, amely még az *INK4A* gén része. Ezt az exont, amelyről eleinte azt gondolták, hogy nem transzlálódik, exon 1 β -nak, a korábbi első exont pedig exon 1 α -nak nevezték el. További vizsgálatok eredményeként kiderült, hogy az *INK4A* génről 2 tumor-szuppresszor fehérje íródik át. Az egyik az exon 1 α , exon 2, és exon 3 kódoló régiók felhasználásával létrejött p16^{INK4A}. A másik az exon 1 β és exon 2 alkalmazásával létrejött fehérje, melynél a közös második exon eltérő leolvasási kerettel íródik át (1. ábra). Ezt a génterméket p14^{ARF}-nek (alternative reading frame) nevezték el. Ennek megfelelően a későbbiekben a p16^{INK4A} és a p14^{ARF} gén, illetve INK4A/ARF lókuszt elnevezés is általánossá vált. Mivel két különböző génről van szó, ezek eltérő promóterekkel rendelkeznek (Mao L 1995, Quelle DE 1995).

A sejtmagban lokalizálódó p16^{INK4A} fehérje 148 aminosavból áll, az első exon az 1-42, a második a 43-144, a harmadik exon pedig az utolsó 4 aminosav kódolásáért felelős (Serrano M 1993). A p16^{INK4A} proteinben egy citoskeletális fehérjekötő (ankyrin) domént azonosítottak, mely a protein-protein interakciókban játszik szerepet. Ezáltal a fehérje kötődni képes a CDK4 és CDK6-hoz, így a CDK-k inaktív állapotba kerülnek, nem tudnak a ciklin

D-hez kapcsolódni (Reymond A 1995). A CDK-ciklin D komplex kialakulásának hiányában az RB fehérje foszforilálatlan marad (Medema RH 1995). Mivel a RB hipofoszforiláltan köti az E2F transzkripciósi faktort, ezáltal a p16^{INK4A} fehérje közvetett úton gátolja meg a sejtproliferációt, a G₁/S átmenetet (Koh J 1995).

A p14^{ARF} fehérje 132 aminosavból épül fel, az exon 1 β kódolja az első 64 aminosavat, a többi a közös második exonról különböző leolvasási keretet alkalmazva íródik át (Stott FJ 1998). A p14^{ARF} protein is a sejtciklus negatív szabályozásában vesz részt. A protein N-terminálisával az MDM-2 C-terminálisához tud kötödni, melynek eredményeként a p14^{ARF} gátolja az MDM-2 kotranszformációs aktivitását. Mivel az MDM-2 N-terminálisán keresztül a p53-hoz képes kapcsolódni, a p14^{ARF} az MDM-2 proteinen keresztül indirekten szabályozza a p53 fehérjét. Megakadályozza annak MDM-2-függő poliubiquitinációs mechanizmuson alapuló lebontását, illetve fokozza a p53-al összefüggő transzkripciót és az apoptózist. A p14^{ARF}, az MDM-2 és a p53 fehérjék a sejtmagban lokalizálódnak. A p14^{ARF} az MDM2-p53 komplexet a sejtmagban visszatartja, megakadályozva a p53 citoplazmában való degradációját. Nemcsak a p14^{ARF} stabilizálja a p53 proteint, de a p53 is visszahat negatív *feedback* mechanizmussal a p14^{ARF} expressziójára. A p14^{ARF} protein tehát a korábbiakban részletezett p53 útvonalon keresztül befolyásolja a sejtciklust (Kamijo T 1998, Pomerantz J 1998, Sherr CJ 1998, Zhang Y 1998).



1. ábra : A p16^{INK4A} és a p14^{ARF} gének kódoló szakaszai és a fehérjék szabályozó szerepe

A p16^{INK4A} és a p14^{ARF} gének szerepe a különböző tumorokban

A 9p21 kromoszómát érintő genetikai aberrációk számos tumorról hozhatók összefüggésbe. A INK4A/ARF lókuszból bekövetkező genetikai és epigenetikai változások hatására gátlódhat a p16^{INK4A} és a p14^{ARF} proteinek expressziója. A tumor-szuppresszor fehérjék hiánya következtében megszűnik a G₁/S átmenet gátlása, a sejtek proliferációja kontrollálatlanná válik, ami malignus kórkép kialakulásához vezethet.

Kamb-, Nobori és mások különböző tumorokból származó sejtvonalakban számos deléciót detektáltak ebben a kromoszomális régióban. Deléció nélküli pontmutációt tudtak kimutatni melanómás sejtvonalakon (Kamb A 1994, Nobori T 1994). Az első közlemények után számos tanulmány vizsgálta az INK4A/ARF lókuszból bekövetkező inaktivációs mechanizmus és a daganatos megbetegedés kialakulása közötti összefüggést humán, rágcsáló és majom tumoros sejtkultúrákon (He J 1994, Liu Q 1995, Ragione FD 1995). Mutációs eltéréseket (misszensz, nonszensz, leolvasási keret eltolódás, splicing defektus) azonosítottak melanóma, szarkóma, húgyhólyag-, prosztatata- és tüdődaganatos sejtvonalakban. A mutációs gyakoriság különböző volt a sejtvonalakban, illetve a friss tumoros mintákban. Például emlőrákos sejtvonalakban az *INK4A* gén deléciós gyakorisága 60%-nak adódott, míg friss emlődaganatokból származó mintákban sem deléciót, sem mutációt nem tudtak kimutatni (Xu L 1994, Quesnel B 1995). A deléció előfordulása a magasabb kockázatú gliómákban gyakoribb volt, mint az alacsony kockázatú gliómás minták esetében. Gyakoribb volt a deléció a melanómák közül a metasztatikus esetekben (Reed JA 1995). Ezen adatokból valószínűsíthető, hogy az *INK4A* gén deléciója a tumor kifejlődése szempontjából egy későbbi, másodlagos esemény. Ezekből a vizsgálati eredményekből kiindulva a későbbiekben kiterjedt citogenetikai, LOH (loss of heterozygosity; heterozigótaság elvesztése) és egyéb genetikai, valamint epigenetikai analízisek célpontja lett számos daganatfélése, mint pl.: leukémiák, limfómák, melanómák, multiplex mielómák, szarkómák, agy-, fej- és nyak-, nyelöcső-, emlő-, tüdő-, gyomor-, vastagbél- és egyéb carcinómák. Ezekben a betegségekben az *INK4A* tumor-szuppresszor gén különböző mechanizmusokkal (deléció, mutáció, metiláció) történő alterációjának százalékos arányát és az irodalmi hivatkozásokat a II. és III. táblázat mutatja be.

II. táblázat: Az INK4A gént érintő eltérések gyakorisága tumoros kórképekben

<i>Tumortípus</i> <i>(Hematológiai)</i>	<i>Deléció</i> <i>(%)</i>	<i>Mutáció</i> <i>(%)</i>	<i>Metiláció</i> <i>(%)</i>	<i>Referenciák</i>
ALL B-sejtes	16	1		Siebert R 1996, Ruas M 1998
ALL T-sejtes	58	7		Siebert R 1996, Ruas M 1998
ALL	19-39	2	38-80	Ogawa S 1995, Siebert R 1996, Drexler HG 1998, Ruas M 1998, Claus R 2003
AML	2	1	30-90	Ogawa S 1995, Siebert R 1996, Ruas M 1998, Claus R 2003
ATL	14-35	6		Ogawa S 1995, Ruas M 1998
CLL	13		10	Ogawa S 1995, Ruas M 1998, Claus R 2003
CLL B-sejtes	3	1		Ruas M 1998
CLL T-sejtes	0	0		Ruas M 1998
CML	1-35	0	24	Ogawa S 1995, Siebert R 1996, Ruas M 1998, Drexler HG 1998
CML limfoid blaszt	24-50	0		Sill H 1995, Ruas M 1998
CML mieloid blaszt	0			Ruas M 1998
Hajassejtes leukémia	0			Ruas M 1998
Hodgkin-kór	0		61	Siebert R 1996, Ruas M 1998, Krug U 2002
MDS	0	0	20-79	Ogawa S 1995, Siebert R 1996, Drexler HG 1998, Claus R 2003
Multiplex mielóma	0-3	0	46-71	Ogawa S 1995, Siebert R 1996, Ruas M 1998, Krug U 2002, Claus R 2003
NHL B-sejtes	3	1		Ruas M 1998
NHL T-sejtes	0	0		Ruas M 1998
NHL	13	3	10-88	Ogawa S 1995, Siebert R 1996, Ruas M 1998, Drexler HG 1998, Claus R 2003
PLL	0	3		Ruas M 1998
BL			52	Krug U 2002

Rövidítések: ALL: akut limfoblasztoid leukémia, AML: akut mieloid leukémia, ATL: felnőtt T-sejtes leukémia, CLL: krónikus limfocitikus leukémia, MDS: mielodiszpláziás szindróma, NHL: non-Hodgkin limfóma, PLL: prolimfocitikus leukémia

III. táblázat: Az INK4A gént érintő változások gyakorisága szolid tumorokban és sejtvonalakban

Tumortípus	Szolid tumor			Sejtvonal			Referenciák
	Deléció (%)	Mutáció (%)	Metiláció (%)	Deléció (%)	Mutáció (%)	Metiláció (%)	
Agy	1	0,5	19-30	82	0		Kamb A 1995, Ruas M 1998, Esteller M 2001
Bőr	ND	14					Ruas M 1998
Emlő	2	1	17-31	60	0	33	Herman JG 1995, Ruas M 1998, Esteller M 2001
Endometrium	0	4					Ruas M 1998
Fej- és nyak	15	7	17-47	33	11		Kamb A 1995, Ruas M 1998, Esteller M 2001
Glióma	35-68	3	19	74	0		Kamb A 1995, Ruas M 1998, Nakamura M 2001,
Gyomor	4	1	52				Ruas M 1998, Serrano J 2000
Hasnyálmirigy	21-37	27-49	18-39	50	30		Kamb A 1995, Ruas M 1998, Ueki T 2000, Esteller M 2001
Húgyhólyag	49	7	9-67	38	19		Kamb A 1995, Ruas M 1998, Esteller M 2001
Máj	0	3	15				Ruas M 1998, Esteller M 2001
Méh	10		20				Ruas M 1998, Nakashima R 1999, Esteller M 2001
Melanóma	11	8-15	10	58	17		Kamb A 1995, Ruas M 1998, Holland EA 1999,
Mesothelium	22	0		85	3		Kamb A 1995, Ruas M 1998,
NPC	35	0	22-46				Ruas M 1998, Kwong J 2002
NSCLC	31	5	21-28	25	0		Kamb A 1995, Ruas M 1998, Sanchez-Cespedes M 1999
Nyelőcső	17	14-52	27-40	67	0		Kamb A 1995, Ruas M 1998, Esteller M 2001
Pajzsmirigy	1	2	13				Ruas M 1998, Xing EP 1999
Petefészek	8	3	18	29	0		Kamb A 1995, Ruas M 1998
Prosztata	3	5	69			60	Esteller M 2001
Szarkóma	5	3		20	31	0	Herman JG 1995, Ruas M 1998, Konishi N 2002
SCLC	3	ND	0	4	0		Kamb A 1995, Ruas M 1998
Vastagbél	0	0	30-40	0	0	92	Ruas M 1998
Vese	8		23	56	0	23	Herman JG 1995, Kamb A 1995, Ruas M 1998

Rövidítések: NPC: nasopharyngealis carcinoma, NSCLC: non-small cell lung cancer (nem kis-sejtes tüdőcarcinoma), SCLC: small cell lung cancer (kis-sejtes tüdőcarcinoma)

A táblázat adataiból kitűnik, hogy az *INK4A* gén eltéréseit a tumorok széles körében tanulmányozták. A korábban ismertett emlőrákos esethez hasonlóan a sejtvonalakban ezen gének alterációja nagyobb arányban figyelhető meg, mint a frissen izolált biopsziákban (III. táblázat). Gyakori deléció ALL-ben, B-sejtes limfoid CML-ben, gliómákban, hasnyál-, és húgyhólyag carcinomákban mutattak ki. Jelentős mutációs eltéréseket találtak hasnyálmirigy-, nyelőcső- és bőrdaganatokban. A *p16^{INK4A}* gén promótere metilált állapotban volt számos tumor esetében (AML, ALL, BL, NPC, fej- és nyak-, gyomor- és prosztatadaganatok). A *p14^{ARF}* gén promóterének metiláltságát, és az exon 1 β -ban bekövetkező mutációt kevesen vizsgálták. Ezen adatok alapján a *p14^{ARF}* gén hipermetiláltsága nagy százalékban fordult elő szekunder glioblasztóma (31%) (Nakamura M 2001), gyomor- (26%), vastagbél daganat (28%) (Esteller M 2001) és NPC (20%) (Kwong J 2002) mintákban.

Az *INK4A* gén expresszióját a genetikai- és epigenetikai változások mellett a – korábban már az RB/p53 útvonal ismertetése során leírt – tumorvírusok onkoproteinjei (pl.: SV40 T-Ag, HPV E6 és E7, adenovírus E1A és E2B, EBV LMP-1) is különböző módon befolyásolják (fehérje-fehérje, fehérje-DNS interakció, RB degradáció). Utaltunk az *INK4A* gén és a tumor progressziója közötti összefüggésre, illetve arra, hogy a gén változásai eltérően alakulnak különböző tumoros sejtvonalakban és frissen izolált daganatos mintákban. Ezekből az ismeretekből kiindulva vizsgálatainkban a tumor progressziója és az *INK4A* gén aberrációja közötti kapcsolatot terveztük tanulmányozni a klinikai minták mellett sejtvonalakon, valamint vírusmentes és vírussal asszociált tumoros esetekben. Így esett választásunk a CML különböző fázisaiból származó klinikai mintákra, illetve EBV-vel immortalizált limfoblasztoid sejtvonalakra (LCL) és Burkitt limfómás sejtkultúrákra.

Krónikus mieloid leukémia (CML)

A leukémiák egyik leggyakoribb formája a krónikus mieloid leukémia (CML), amely a csontvelői multipotens őssejt mieloid sejt sorának klonális daganatos proliferációja. A betegségnek két, illetve három klinikai stádiuma különböztethető meg (Dickstein JI 1993, Kantarjian HM 1993). A kezdeti krónikus fázist rendszerint az akcelerált fázis követi. Azok a betegek, akik túlélnek az akcelerált fázist, a betegség blasztos krízisébe lépnek (Sokal JE 1988, Kantarjian HM 1998). Ez a malignus hematológiai kórkép elsősorban a középkorostályt érinti, általában 30-60 éves korban alakul ki.

A *krónikus fázisban* a beteg vagy tünetmentes, – és csak a rutinvizsgálatok hívják fel a figyelmet a betegségre, – vagy nem specifikusak a tünetek. Bár a betegség felismerésekor rendszerint még együtt van jelen a kóros és egészséges vérképzés, a fehérvérsejtszám igen magas ($>50 \times 10^9/l$). A perifériás vérben a granulocitasor aránya emelkedett. A csontvelő hipercelluláris, amihez granulocitás hiperplázia társul. A mieloid maturáció balratolódása figyelhető meg. Az *akcelerált fázisra* a krónikus fázisban alkalmazott terápiával szembeni rezisztencia, a klinikai állapot hirtelen rosszabbodása jellemző. A kórkép progressziójának jelei heterogének. A perifériás vérben a blasztsejtek aránya 20% körüli értéket érhet el, egyes betegekben a blasztok és promielociták együttes aránya megközelítheti a 30%-ot. Az egyéb hematológiai jellemzők közül a bazofiliát, trombocitózist és a terápia iránt refrakter anémiát kell kiemelni. Nagyon karakterisztikus tünet a splenomegália. A *blasztos fázisban* a klinikum és a vérkép az akut leukémiához hasonló. A mieloid őssejt elveszti terminális differenciálódásra való képességét, az éretlen hemopoetikus sejtek gyorsan proliferálnak. A blasztsejtek aránya a perifériás vérben meghaladja a 20%-ot, a csontvelőben pedig 30% fölé emelkedik. Az esetek kisebb hányada (20-25%) limfoblasztos, többsége (60%) mieloblasztos vagy kevert típusú terminális fázisba megy át. Egyes esetekben megakarioblasztos transzformációt is megfigyeltek.

A CML citogenetikai jellemzője az esetek több mint 90%-ában megtalálható Philadelphia (Ph) kromoszóma jelenléte, mely a 9-es és a 22-es kromoszóma reciprok transzlokációja révén jön létre (Nowell PC 1960, Rowley JD 1973). A 22-es kromoszóma azáltal rövidül meg, hogy az *ABL* proto-onkogén, mely normális körülmények között a 9-es kromoszóma hosszú karjának 34-es régiójában található, a kromoszóma disztális részével transzlokálódik a 22-es kromoszómára. A 22-es kromoszómáról „letört” vég viszont a 9-es kromoszómára kerül át. Az *ABL* transzlokációjának helye rendszerint a 22-es kromoszóma hosszú karjának 11-es régiójában van, mely ezért a „break-point cluster” régió (*BCR*) elnevezést kapta (Heisterkamp N 1983). A létrejövő *BCR-ABL* fúziós génről egy 8,5 kb-os mRNS íródik át (Shtivelman E 1985). Ez a mRNS egy 210 kDa molekulásúlyú fehérjét kódol, melynek megnövekedett tirozin kináz aktivitása van a normál *ABL* fehérjéhez képest (Konopka JB 1984). A Ph-negatív kórképek nagy részében is sikerült a *BCR-ABL* fúziós gén létrejöttét igazolni.

A típusos, Ph-kromoszóma-pozitív CML progressziója során a betegek többségében további citogenetikai abnormalitások is megfigyelhetők, ezek leggyakrabban a 8-as, 19-es és 21-es kromoszómák triszómiája, újabb Ph-kromoszóma, illetve 17q izokromoszóma

megjelenése, több kromoszóma elvesztése pl.: 9-es, 5-ös, 13-as, 17-es vagy valamely részének deléciója (Cervantes F 1986, Bernstein R 1988).

Már citogenetikai vizsgálatokkal is arra a következtetésre jutottak, hogy a CML progresszióját szekunder genetikai változások indítják el (Bernstein R 1988). A molekuláris onkogenológiai módszerek megjelenésével mód nyílt arra, hogy ezeket a genetikai aberrációkat még részletesebben megismerjük.

Az onkogén expresszió változásait számos munkacsoport vizsgálta. Ezek közül főleg *RAS* gén mutációt (Liu E 1988, LeMaistre A 1989), *MYC* és *ABL* expressziót mutattak ki (Blick M 1984, Rothberg PG 1984), továbbá *SIS* génnel történő vizsgálatokat (Groffen J 1983, Romero P 1986) végeztek a CML krónikus és blasztos fázisában.

A tumor-szuppresszor gének közül kiterjedten vizsgálták a *p53* aberrációit a CML blasztos krízisében (Ahuja H 1989, Feinstein E 1991, Nakai H 1992), valamint az *RB* gén anomáliáit (Ahuja HG 1991, Ishikura H 1997) is. Mindkét gén eltéréseit ki lehetett mutatni már az akcelerált fázisban is (Beck Z 2000).

Munkacsoportunk korábban a fent említett onkogének expressziós spektrumát és a tumor-szuppresszor gének anomáliáját tanulmányozta a CML krónikus és akcelerált fázisában (Beck Z 1998, Beck Z 2000).

Az *INK4A* génben bekövetkező változásokat is tanulmányozták CML-ben, bár a betegség progressziója és ezen gén inaktiválódása közötti összefüggés még kevésbé ismert. A *p16^{INK4A}* génben deléció nem volt kimutatható a CML krónikus fázisában, azonban homozigóta deléciót detektáltak limfoid blaszt krízisben (34%) (Haidar MA 1995, Serra A 1995, Sill H 1995). A CML blasztos fázisában a *p16^{INK4A}* génben mutációt az esetek kis százalékában találtak (Ogawa S 1995, Siebert R 1996, Guran S 1998). Metilációs vizsgálatokkal a CML-es minták 24%-ában mutattak ki *p16^{INK4A}* gén promóter hipermetilációt (Claus R 2003). A *p14^{ARF}* génre vonatkozó mutációs és metilációs adatok nem állnak rendelkezésünkre ebben a leukémiatípusban.

Epstein-Barr vírus (EBV)-asszociált tumoros sejtvonalak

A Herpesviridae család Gammaherpesvirinae alcsaládjába tartozó Epstein-Barr vírus 120-200 nm átmérőjű, burokkal rendelkező, ikozahedrális szimmetriájú DNS vírus. A vírusgenom a daganatsejtekben extrakromoszomálisan, episzómális alakban perzisztál (Kieff E 1982, Raab-Traub N 1986).

Az EBV ubiquiter jellegű vírus, a populáció legnagyobb része fertőződik vele. A vírus elsősorban a nyál útján terjed. In vivo az oropharynx, parotis és méhnyak epitheliális sejtjeit, valamint a B-limfocitákat fertőzi meg. A vírussal való kölcsönhatás epitheliális sejtekben lítikus, produktív fertőzést, míg a B-limfocitákban általában látens, vírusprodukciónak nem okozó fertőzést eredményez (Richtsmeier WJ 1987, Wensing B 2000).

Míg a primer fertőzés mononucleosis infectiosa-t okoz (Evans AS 1972), a látens fertőzés számos malignus kórképpel hozható összefüggésbe. A B-sejtekből kiinduló limfómák pl.: Burkitt limfóma (Burkitt D 1965), immunkárosodott egyének limfoproliferatív megbetegedése (Craig FE 1993), Hodgkin-limfóma (Harris NL 1994), B-sejtes non-Hodgkin-limfóma (Hamilton-Dutoit SJ 1991); T-sejtes limfómák pl.: T-sejtes non-Hodgkin-limfóma (Jones JF 1988), letális „midline” granulóma (Harabuchi Y 1990) és epitheliális sejtekből kiinduló daganatok pl.: nasopharyngealis carcinoma (zur Hausen H 1970, Niedobitek G 2000), gyomorrák (Osato T 1996).

A vírussal fertőzött sejtek immortalizálásában és transzformálásában a látens ciklus vírusspecifikus fehérjéinek lehet szerepe. Az EBV látens ciklusa során 6 magfehérje (EBNA- 1, 2, 3A, 3B, LP, 3C), 3 sejtmembránfehérje (LMP-1, LMP-2A, LMP-2B) és 2 nukleáris RNS (EBER-1, EBER-2) fejeződik ki. Az EBV látenciájának 3 típusa ismeretes, melyek a látens vírusfehérjék expressziós spektrumában különböznek egymástól. Az I. típusú látenciában csak az EBNA-1 és EBER antigének mutathatók ki. A II. típusú látenciára az EBNA-1, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B, EBER-1 és EBER-2 expressziója jellemző. A III. típusú látenciában valamennyi látens protein jelen van. Az I. típusú látencia csak endémiás Burkitt limfómában, a III. típusú látencia immunszuppresszióhoz társuló limfoproliferatív kórképekben, valamint EBV-vel immortalizált limfoblasztoid sejtvonalakban (LCL) figyelhető meg. Az EBV-pozitív limfómák többségére és a NPC-re a II. típusú látencia jellemző (Wensing B 2000, Niedobitek G 2001).

A humán tumorvírusok a sejtciklus stimulálásával és deregulálásával játszanak kofaktoriális szerepet a daganatok etiopatogenezisében. Különösen fontos a malignus transzformáció kiváltásában a tumor-szuppresszor gének és géntermékek funkciójának gátlása. Az LP fehérje a p53 fehérje kötésére és inaktiválására képes (Szekely L 1993), az LP és EBNA-3C antigének pedig az RB fehérjék (pRB, p107) inaktiválásában játszanak szerepet (Jiang WQ 1991, Parker GA 1996). Az LMP-1 fehérje konstitutívan aktív receptor molekulaként működik a sejtmembránban (Gires O 1997), és a Bcl-2 valamint A20 proteinek szintézisének indukálásával gátolja az apoptózist (Henderson S 1991, Laherty CD 1992),

illetve az NF- κ B és INK transzkripciós faktorokat aktiválva stimulálja a sejtproliferációt (Huen DS 1995, Kieser A 1997).

A humán B-sejtekben látens fertőzés kétféleképpen, a perifériás vérből szeparált B-limfociták EBV-vel való immortalizálásával, illetve a vírus hatására BL-es vagy B-sejtes tumorokból származó sejtekben alakulhat ki. Míg a limfoblasztoid sejtek III. típusú látenciát mutatnak, addig a BL tumorsejtek kezdetben I. látenciatípusba sorolhatók, majd a folyamatos osztódás során további EBV látenciafehérjék jelenhetnek meg, amely leggyakrabban a III. látenciamintázatot mutatja (Nilsson K 1992).

A sporadikus és endémiás BL-ből származó EBV-pozitív sejtvonalak t(8,14), t(2,8) vagy t(8,22) kromoszomális transzlokációt mutatnak. Bár a legtöbb EBV-vel transzformált LCL-re normál kariotípus jellemző, Okubo és társai kimutatták, hogy átlag 160 osztódás (PDL) után aneuploidia, kromoszomális átrendeződés és erős telomerázaktivitás figyelhető meg. Ezek az események az LCL-ek EBV hatására történő immortalizációs folyamataival párhuzamosan jelentkeznek (Okubo M 2001).

Az *INK4A* gén aberrációit (mutáció, deléció) BL sejtvonalakon, biopsziás anyagokon és LCL-eken is tanulmányozták (Ruas M 1998). Nagy gyakorisággal figyelték meg a *p16^{INK4A}* gén aberráns metiláltságát (Klangby U 1998, Esteller M 2001). EBV-pozitív limfómákban nagyobb a *p16^{INK4A}* gén aberrációk és promóter metilációk gyakorisága, mint a *p14^{ARF}* gén esetében. Ennek ellenére a *p14^{ARF}* fehérje az esetek mintegy felében nem fejeződik ki, vagy abnormális lokalizációt mutat a sejtmagon belül (Lindstrom MS 2001, Sanchez-Aguilera A 2002). A különböző tanulmányokban eltérések vannak a mutációk, deléciók, metilációk gyakoriságát illetően, amely eltérések a viszonylag kis mintaszámból és az alkalmazott módszerek különbözőségéből adódhatnak. Valószínűsíthető, hogy a genetikai és epigeneikai változások következtében létrejött *p16^{INK4A}/p14^{ARF}* funkcióvesztésnek fontos szerepe van a Burkitt limfóma és az LCL-ek kialakulásában is (Drexler HG 1998, Klangby U 1998, Baur AS 1999, Lindstrom MS 2001, Krug U 2002).

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánkban az irodalmi áttekintésben ismertetett adatokból kiindulva információt kívántunk kapni a CML progressziója és az EBV-vel fertőzött B-sejtek tumorgenezise során a $p16^{INK4A}$ és $p14^{ARF}$ tumor-szuppresszor génekben bekövetkező különféle genetikai és az epigenetikai történésekhez tartozó promóter metilációs változások gyakoriságáról, valamint ezek egymáshoz viszonyított arányáról. Vizsgálatainkkal választ kívántunk adni az alábbi kérdésekre:

1. Szerepet játszik-e a CML progressziójában a $p16^{INK4A}/p14^{ARF}$ gének inaktivációja? Ha igen, ebben milyen mechanizmusok vesznek részt, és ezek milyen gyakorisággal következnek be?
2. A genetikai változások milyen jellegűek, érintik-e mindkét gént, illetve egy-egy gén mindkét allélját? Vannak-e mutációs forrópontok? Ezek a genetikai változások mekkora kromoszómaszakaszt érintenek? Milyen a citogenetikai háttér a CML akcelerációja során? A citogenetikai vizsgálatok eredménye korrelál-e a $p16^{INK4A}/p14^{ARF}$ gént érintő változásokkal?
3. A $p16^{INK4A}/p14^{ARF}$ promótereinek metilációja az esetek hány százalékában figyelhető meg a CML AF-ában? Előfordul-e mindkét promóter együttes metilációja?
4. A tumoros sejtvonalakban az EBV jelenléte befolyásolja-e a tumor-szuppresszor génekben bekövetkező eltérések gyakoriságát?
5. Van-e különbség normál B-sejtek, EBV-vel *de novo* transzformált LCL-ek, immortalizált LCL-ek, és BL sejtkultúrákban detektált $p16^{INK4A}/p14^{ARF}$ alterációk között?
6. A B-sejtek tumorgenezisében a $p16^{INK4A}/p14^{ARF}$ génben bekövetkező genetikai vagy a promóter metilációs eltéréseknek van jelentősebb szerepe?
7. A limfomagenezis mely stádiumában következik be ezen tumor-szuppresszor gének inaktivációja?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

CML-es minták

Vizsgálatainkhoz a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum II. számú Belgyógyászati Klinikájáról származó CML-es betegek vérmintáit használtuk. Mindegyik beteg esetén 2 mintát vizsgáltunk. Az egyiket a diagnózis felállításakor, a terápia megkezdése előtt, a másikat az akceleráció megjelenésekor, a terápiaváltást megelőzően vették le. A CML fázisainak a diagnózisa a már ismertetett klinikai és hematológiai kritériumok alapján történt (Slamon DJ 1984, Kantarjian HM 1988).

Granulociták szeparálása

Kísérleteinkhez a granulocita sejteket CML-es betegek és egészséges egyének perifériális vérmintáiból szeparáltuk. A heparinnal alvadásgátolt vérből a granulocitákat 74 és 55%-os Percoll oldatból készített discontinuus gradiens centrifugálással (350 g, 20 perc) szeparáltuk (Hjorth R 1981). Az egészséges egyének érett granulocitái, valamint a CML-es betegekből származó érett és éretlen granulocitaalakok az interfázisban jelentek meg. A granulocitapopuláció tisztasága meghaladta a 97%-ot.

Sejtvonalak

Kísérleteink második részében EBV-negatív BL sejtvonalakat: BL 41 (Rowe M 1986), Ramos (Klein G 1975) és EBV-pozitív BL sejtkultúrákat: AG 876 (Magrath IT 1980), Akata (Takada K 1984), Akuba (Klein G 1972), Daudi (Klein E 1968), Jijoye (Hinuma Y 1967), Mutu III clone 99 (Gregory CD 1990), Namalwa (Nadkarni JS 1969), Rael (Klein G 1975), Raji (Bodescot M 1984), valamint kétféle LCL csoportot alkalmaztunk. Az egyikbe a normál B-sejtek EBV-vel történő infekciójával *de novo* létrehozott, transzformált, de nem immortalizált (pre-immortalizált) sejtvonalak tartoztak: LCL_{Mutu}, LCL_{Akuba}, LCL_{Jijoye}, LCL_{Rael}. A másikba a korábban kialakított, 160 osztódást meghaladó immortalizált LCL-ek: CB-M1-Ral-STO (Hedman H 1992), Cherry (Ernberg I 1986), IARC 171, JY (Speck SH 1985), LCL-721 (Kavathas P 1980). Mindegyik BL sejtvonalat és LCL-t 10% FBS-t, 2 mM glutamint, 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint tartalmazó RPMI 1640-es tápfolyadékban tartottuk fenn.

B-limfociták szeparálása

Az EBV fertőzéshez szükséges perifériális vér mononukleáris sejteket (PBMC) Ficoll-Histopaque (Sigma, USA) sűrűséggradiens centrifugálással (800 g, 30 perc, 4°C) nyertük ki "buffy coat" preparátumokból. A PBMC frakciót az interfázisból szívtuk le, PBS-sel mostuk, majd ebből a normál B-sejteket pan-B Dynabeads M450 (Dyna, Norvégia) vasgyöngyöt tartalmazó anti-CD 19 ellenanyaggal gyűjtöttük össze a Sinclair és munkatársai által leírt mágneses szeparálási protokoll szerint (Sinclair AJ 1994). A CD 19 ellenanyaghoz kötött B-limfocitákat 37 °C-on 5% CO₂-ot tartalmazó termosztátban 16-20 órán át inkubáltuk, míg a gyöngyök le nem váltak a B-sejtekről. Mágneses szeparátorral a gyöngyöket eltávolítottuk a rendszerből, majd a B-limfocitákat 15%-os FBS-t és antibiotikumot tartalmazó RPMI 1640-es tápfolyadékban vettük fel 2×10^6 sejt/ml végkoncentrációban.

EBV termelése

Az EBV törzseket a kísérleteinkhez használt EBV-pozitív BL sejt kultúrákon termeltük. A sejt vonalakat 6 napig 20 ng/ml tetra-forbol-észterrel (TPA) kezeltük, majd a sejteket 690 g-vel 15 percig centrifugáltuk. A felülúszóból ultracentrifugálással (113000 g, 60 perc, 4 °C) ülepítettük ki a vírust. Az üledéket tápfolyadékkal óvatosan mostuk, majd a vírust az eredeti térfogat harmincad részét képező tápfolyadékban (RPMI-1640, 20% FBS, antibiotikum) szuszpendáltuk. A víruskoncentrátumokat felhasználásukig -70 °C-on tároltuk.

B-limfociták fertőzése EBV-vel

Nyugvó B-limfocitákból EBV-vel történő infekcióval LCL-eket alakítottunk ki. A frissen izolált B-sejteket 96-lyukú mikrotiter plate-re helyeztük (10^5 sejt/lyuk), és 37 °C-on 6 órán át inkubáltuk. Ezt követően a sejteket az eltérő BL sejt vonalakból származó EBV-vel alacsony multiplicitással fertőztük. A fertőzött sejteket hetente egyszer 15% FBS-t és antibiotikumot tartalmazó RPMI-1640-es tápfolyadékkal passzáltuk. Négy-hat hét után a kialakult limfoblasztoid sejteket tenyésztőpalackba helyeztük, és szaporítottuk. Amikor a sejtszám elérte a 10^7 sejt/ml nagyságrendet, a mintákból DNS-t izoláltunk.

DNS izolálás

CML-es mintákból származó granulocitákból, vizsgált EBV-negatív és EBV-pozitív BL sejtvonalakból, korábban és frissen kialakított LCL-ekből valamint normál B-limfocitákból (5×10^6 - 10^7 sejt/ml) QIAGEN Blood kit (QIAGEN, USA) segítségével, a mellékelt protokollt követve DNS-t izoláltunk. Az extraktum DNS tartalmát és tisztaságát spektrofotometriásan ellenőriztük. A 200-1000 ng/ μ l koncentrációjú DNS mintákat -20 °C-on tároltuk felhasználásukig.

Polimeráz láncreakció (PCR)

Granulocitákból, a fent leírt sejtvonalakból és a B-sejtekből izolált DNS-ből az INK4A/ARF lókuszon exonjait PCR-rel amplifikáltuk. A $p16^{INK4A}$ exon 1, exon 3 szakaszok felszorzásához már korábban leírt primereket (Baur AS 1999, Chen TC 2000), míg a $p14^{ARF}$ exon 1 és $p16^{INK4A}$ exon 2 szekvenciák esetében saját tervezésű oligonukleotid primereket használtunk. A különböző exonokra specifikus primerpárok szekvenciáit, az amplimerek méreteit, illetve a különböző reakciók annelációs hőmérsékleteit az első közlemény I. táblázata foglalja össze.

Az 50 μ l végtérfogatú PCR elegy összetétele a következő volt: 300 ng genomiális DNS, 25-25 pmol primer, 50 mM KCl, 1,1 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 0,1% zselatin, 200 μ M dNTP, 5% DMSO és 1,5 U RED Taq polimeráz (Sigma). A reakció az Applied Biosystem Gene Amp[®] PCR System 2700 típusú (Applied Biosystem, USA) készülékében történt. A kezdeti 94 °C-os 5 perc időtartamú denaturáció után az amplifikációt 30-35 cikluson keresztül végeztük a következő paraméterek mellett: 94 °C 1 perc, 55-60 °C 1 perc, 72 °C 1 perc, majd egy végső lánchosszabbító lépés (72 °C 7 perc) következett. A PCR termékeket etidium-bromid festéssel tettük láthatóvá UV fény alatt, 2%-os agarózt tartalmazó gélelektroforézist követően.

Egyszálú konformációs polimorfizmus (SSCP) analízis

Az SSCP igen érzékeny és gyors módszer, mely alkalmas a génekben bekövetkező változások kimutatására. Megfelelő módszer a DNS szakaszban bekövetkező genetikai polimorfizmusok, mutációk, deléciók vagy inszerciók detektálására. Azonban a technika érzékenysége fordítottan arányos a vizsgált szakaszok hosszával, és az SSCP

alkalmazhatósága nagymértékben függ a kísérleti körülmények megfelelő beállításától (Orita M 1989 a, Orita M 1989 b).

A PCR során amplifikált termékek 2 µl-éhez 38 µl 95%-os deionizált formamid/10 mM NaOH/0,05% brómfenolkék/0,5% xilén-cianol elegyét adtuk. A mintákat 70 °C-on 5 percig denaturáltuk, majd jégen gyorsan lehűtöttük. A denaturált DNS szálakat natív, 7,5%-os poliakrilamid gélben futtattuk 4 °C-on 4-5 órán át, 300 V feszültség mellett.

Az elektroforézist követően a DNS szakaszokat az ezüst-festés standard protokollját alkalmazva mutattuk ki, melynek során a gélt először 10% etanol/0,5% ecetsav tartalmú oldatban fixáltuk, majd AgNO₃ oldatban festettük (Goldman D 1982). Az előhívás 1,5% NaOH/0,1% formaldehid elegyével történt, majd ezt követően a gélt 0,75% Na₂CO₃ oldattal kezeltük, végül megszáritottuk. A gélen látható futási különbségek jelezték az exonokban bekövetkezett genetikai eltéréseket.

DNS szekvenálás

Valamennyi CML-es minta, illetve BL sejtvonal esetén a *p16^{INK4A}* exon 1, 2, 3 és *p14^{ARF}* exon 1 szekvenciáit direkt szekvenálással határoztuk meg. A PCR reakciót követően az amplifikált DNS-t Microcon (Millipore, USA) oszlopon tisztítottuk standard protokoll szerint. Az így kapott termékekből szekvenáló PCR-t (96 °C 30 sec, 50 °C 15 sec, 60 °C 4 perc /25 ciklus/) végeztünk ABI Prism Big Dye Terminator Ready Reaction Kit segítségével (Applied Biosystem). Az amplifikált termékeket DyeEx Spin Kit-tel (QIAGEN) tisztítottuk. A szekvenálandó DNS mintákat 20 µl formamidban vettük fel, majd denaturálást (92-95 °C-on 2 perc) követően a mintákat ABI Prism 310 (Applied Biosystem) automata szekvenátorban futtattuk.

Metiláció-specifikus polimeráz láncreakció (MSP)

A *p16^{INK4A}* és *p14^{ARF}* gének promótereinek metilációját Herman és társai által korábban leírt metiláció-specifikus PCR-rel vizsgáltuk (Herman JG 1996). A CML krónikus és akcelerált fázisaiból szeparált DNS, valamint BL sejtvonalak, korábban illetve frissen kialakított LCL-ek, és normál B-sejtekből származó genomiális DNS 1-1 µg-ját 1 mM Hidroquinon/3,8 M Na-biszulfit elegyében modifikáltuk, majd Wizard DNA Clean-Up oszlop (Promega, USA) segítségével tisztítottuk. Az etanolos kicsapást követően a modifikált DNS-t

30 µl desztillált vízben szuszpendáltuk. Modifikálás után a metilált és a nem metilált DNS PCR alkalmazásával megkülönböztethető.

A 25 µl végtérfogatú PCR elegy összetétele a következő volt: 30 ng modifikált DNS, 20 pmol primer, 50 mM KCl, 1,1 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 0,1% zselatin, 200 µM dNTP, 5% DMSO és 1,5 U RED Taq polimeráz (Sigma). A reakció a következő módon történt: egy előzetes denaturáció (94 °C/5 perc), az ezt követő fő reakció: (95 °C/45 sec, 60-64 °C/45 sec, 72 °C 45 sec; 35 ciklus) majd egy végső lánchosszabbító lépés (72 °C/4 perc). A reakció után a metilált, illetve a nem metilált DNS szakaszokat etidium-bromidos festést követő agaróz-gélelektroforézissel mutattuk ki. A *p16^{INK4A}* és *p14^{ARF}* gének metiláció-, és nem metiláció-specifikus primerek szekvenciái, az amplimerek mérete és az annealációs hőmérsékletek az első közlemény I. táblázatában láthatók.

Citogenetikai vizsgálatok

A CML-es minták citogenetikai vizsgálatait a Debreceni Egyetem Gyermekgyógyászati Klinikájának genetikai laboratóriumában végezték. A kromoszómák identifikálása a G és Q sávozási technikával történt (Caspersson T 1970, Seabright M 1971). A klasszifikálásnál az „International System for Human Cytogenetic Nomenclature” szabályai voltak a mérvadóak (ISCN 1978).

EREDMÉNYEK

Munkánk első részében a CML krónikus és akcelerált fázisából származó vérmintákból granulocitákat szeparáltunk, melyből DNS-t izoláltunk. Vizsgálataink második felében szintén DNS-t izoláltunk BL sejtvonalakból, immortalizált és transzformált LCL-ekből, valamint normál B-sejtekből. A fent felsorolt DNS mintákat használtuk fel a *p16^{INK4A}* és *p14^{ARF}* gének genetikai és promóter metilációs eltéréseinek tanulmányozására.

Hematológiai és citogenetikai adatok

Az 1. közlemény II. táblázata a betegek hematológiai paramétereit és citogenetikai adatait foglalja össze. Vizsgálatainkhoz 30 beteg krónikus, és akcelerált fázisából levett vérmintapárok álltak rendelkezésünkre. A betegek átlagéletkora 55 év volt, közülük 16 volt nő és 14 férfi. Valamennyi betegnél szignifikáns granulocitózist figyelhettünk meg. Az akcelerált fázis kezdetén blasztsejtek jelentek meg a vérben. Az AF további hematológiai jellegzetessége közé tartozott a bazofil sejtek nagy százalékos aránya (II. táblázat 2, 8, 11, 15, 16, 19, 24, 27 és 30-as számú minták), a trombocitózis (4, 9, 13, 14, 18, 22, 24 és 25-ös számú minták) és az anémia (2, 3, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 18, 20, 22, 23, 27 és 30-as számú minták). A betegség krónikus fázisában az interferon- α (IFN) kezelés alkalmazása előtt hidroxiureával (HU) tartották a fehérvérsejtszámot 20×10^9 sejt/l alatt. Akcelerált fázisban növekedett dóziszú IFN-t kisebb dóziszú arabinozid C-vel (ara-C) kombinálták. Egyes betegeknél a terápiát HU-val is kiegészítették. A terápia az egységes kritériumok szerint a hematológiai és citogenetikai paraméterek alapján történt.

A krónikus fázisú mintákban – eltekintve a Ph kromoszóma jelenlététől – a kariotípus normális volt. Azonban 30 betegből 14 esetben az AF kezdetekor a Ph kromoszóma mellett további kromoszomális eltérések jelentek meg. A 13-as kromoszóma vagy annak hosszú karjának elvesztését 3 esetben, a 17-es kromoszóma, illetve annak rövid karjának rövidülését vagy hosszú karjából kialakult izokromoszómát 5 betegnél figyeltünk meg. Második Ph kromoszóma jelent meg 2 beteg esetében. További kromoszomális aberrációk közé sorolható a 8-as, 19-es, 21-es kromoszóma triszómiája, az 5-ös, 7-es, 18-as, 20-as, 21-es kromoszómák, valamint a 2-es kromoszóma hosszú karjának, a 16-os kromoszóma rövid karjának az elvesztése. Citogenetikai vizsgálattal kimutatható, a 9-es kromoszómát érintő aberráció nem volt. A citogenetikai eltérést mutató minták közül 11 rendelkezett többszörös kromoszomális aberrációval.

De novo LCL-ek kialakítása

A pan-B Dynabeads mágneses szeparálással „buffy coat”-ból B-limfocitákat izoláltunk. A különböző BL sejtvonalakban termelt EBV törzsekkel fertőztük a frissen szeparált B-sejteket. Négy-hat hét elteltével limfoblasztoid sejtek alakultak ki. Négy új sejtvonalat (LCL_{Mutu}, LCL_{Akuba}, LCL_{Jijoye}, LCL_{Rael}) sikerült kialakítanunk Mutu, Akuba, Jijoye és Rael sejtvonalakból származó EBV-vel fertőzött nyugvó B-limfocitákból.

INK4A/ARF lókuszt kódoló szakaszainak PCR-SSCP analízise

A krónikus és akcelerált fázisból származó CML-es vérmintákból Percoll gradiensen történő centrifugálással granulocitákat szeparáltunk. Ezekből a sejtekből, a „régiből”, és a *de novo* kialakított LCL-ekből, az EBV-negatív és pozitív BL sejtvonalakból, valamint a normál B-sejtekből *DNA Blood kit* segítségével DNS-t izoláltunk. Az INK4A/ARF lókuszt exonjait PCR-rel sokszoroztuk fel, majd az amplifikáció hatékonyságát agaróz-gélelektroforézissel ellenőriztük. A módszer az amplimer kimutatása mellett a nagyobb genetikai eltérések, deléciók kimutatására is egyaránt alkalmas. A különböző exonok amplimerjeit a korábban leírt SSCP technikával elemeztük. A futási különbségeket mutató mintákat szekvenáltuk.

INK4A/ARF lókuszt szekvencia analízise

Az PCR-SSCP módszer alkalmas ugyan az adott DNS szakaszon belüli genetikai eltérések kimutatására, azonban a mutáció helyéről és jellegéről csak a szekvenálás adhat pontos választ. A PCR-rel felsokszorozott *p16^{INK4A}* exon 1, 2, 3 és a *p14^{ARF}* exon 1 amplimer szekvenciáinak meghatározásához közvetlen DNS szekvenálást végeztünk. A CML-es minták szekvenálási eredményeit az első közlemény III. táblázata mutatja be. Nem találtunk genetikai változást egyetlen krónikus fázisú mintában sem. Ezzel szemben 17 AF minta esetén tudtunk mutációt kimutatni, azonban a szekvenáló kromatogramm alapján valamennyi eltérés heterozigóta mutáció volt.

A *p16^{INK4A}* 1. exonjában 10 betegnél találtunk mutációt. Egyik esetben a 12. kodonban a G→A átmenet nem eredményezett aminosavváltozást (Ala→Ala). Mivel ez a nukleotid csere a KF-ben nem jelent meg, inkább tekinthető csendes mutációnak, mint polimorfizmusnak. Hat AF mintában a 35. kodonban az AGT→ATT változás

szerein→izoleucin aminosavváltást okozott. Egy mintában a 26. kodonban bekövetkező pontmutáció (GCG→GTG) az alanint valinra változtatta. A fennmaradó 2 beteg esetén a 18. kodonban detektáltunk nonszensz mutációt (GAG→TAG).

A *p16^{INK4A}* 2. exonjában 11 mutációt tudtunk kimutatni. A 80. kodonban csendes mutációt (Glu→Glu) 5 minta esetében, a 61. (Glu→Gln), 105. (Leu→Met), 123. (Arg→His), 130. (Arg→Ile) kodonokban misszensz mutációt 6 esetben figyeltünk meg. Mivel a *p16^{INK4A}* és *p14^{ARF}* géneknek eltérő ugyan a leolvasási keretük, de közös a 2. exonjuk, ezért a *p16^{INK4A}* génben talált mutációk 7 esetben érintették a *p14^{ARF}* gént is. A 80. kodonban bekövetkező csendes mutáció a *p14^{ARF}* gén 103. kodonjában misszensz mutációt (Gly→Arg) eredményezett. A 61. és a 105. kodonban detektált misszensz mutáció a *p14^{ARF}* gén 83. és 127. kodonjában szintén misszensz mutációt okozott.

A *p14^{ARF}* 1. exonjában 3 mintában találtunk misszensz mutációt. A 21. kodonban G→A átmenet arginin→lizin aminosavváltást eredményezett 2 beteg esetében. A harmadik mutáció a 34. kodont érintette, mely Trp→Arg váltással járt.

Az 3. exonban mutációt egyik minta esetében sem tudtunk detektálni.

A vizsgált EBV-negatív és pozitív BL sejtvonalak, valamint frissen kialakított LCL-ek és normál B-sejtek szekvenálási eredményeit a második közlemény II. táblázata foglalja össze. Három BL sejtvonalban tudtunk heterozigóta mutációt kimutatni. A Namalwa sejtvonalban a *p16^{INK4A}* 2. exon 98. kodonjában talált G→T átmenet valin→leucin aminosavváltást eredményezett. Ez a mutáció érintette a *p14^{ARF}* gén 120. kodonját is (CGT→CTT) és arginin→leucin aminosavcsereét okozott.

A *p16^{INK4A}* 1. exonjában 2 mutációt detektáltunk. A Mutu sejtvonalban a 27. kodonban (GGG→TGG) történő mutáció a glicint triptofánra változtatta. A Daudi sejtvonalban nonszensz mutáció (GAG→TAG) következett be a 18. kodonban (Glu→Stop).

Az 3. exonban, és a *p14^{ARF}* gén 1. exonjában mutációt egyik minta esetében sem tudtunk kimutatni. A frissen kialakított LCL-ekben és a B-limfocitákban genetikai eltérést nem sikerült detektálni.

A p16^{INK4A} és p14^{ARF} promóterek metilációs vizsgálata

A 30 CML-es beteg mintapárjaiból, valamint 2 EBV-negatív, 9 EBV-pozitív BL sejtvonalból, 5 korábban kialakított, 4 *de novo* létrehozott LCL-ből és normál B-limfocitákból izolált DNS mintákban a *p16^{INK4A}* és a *p14^{ARF}* tumor-szuppresszor gének

promótereinek hipermetiláltságát MSP módszerrel határoztuk meg. Az MSP során a metilált, illetve a nem metilált allél megkülönböztethető az eltérő szekvenciák alapján, ugyanis Na-biszulfit hatására a modifikált DNS nem metilált alléljában a citozin uracilra cserélődik, míg a metilált allél változatlan marad. Specifikus primerpárokkal a metilált és a nem metilált DNS PCR-rel amplifikálható. A krónikus fázisú mintákban metilációt nem tudtunk kimutatni egyik gén esetében sem. Azonban a vizsgált akcelerált fázisú minták nagy százalékában volt metilált mind a $p16^{INK4A}$, mind a $p14^{ARF}$ gének promótere. Metilációs eredményeinket az első közlemény III. táblázata foglalja össze.

A 30 mintából a $p16^{INK4A}$ promótere 12 esetben (III. táblázat 1-10, 13, és 14 számú minták), a $p14^{ARF}$ promótere szintén 12 betegben (1-12 számú minták) volt metilált. A két gén együttes metiláltságát 10 esetben figyeltük meg. Egy ábrán valamennyi minta MSP analízisét nem tudtuk bemutatni, azonban az 1. közlemény 1. ábrája jól reprezentálja a metiláció eredményeit. Egyes esetekben ugyanazon mintán belül a metilált, illetve a nem metilált specifikus primerekkel is jelet kaptunk. Nyolc AF mintában (8-10, 12-14 számú betegek) a mutációs és a metilációs eltérések együtt jelentkeztek. Hat AF minta esetében genetikai aberráció nélkül detektáltunk promóter metilációt.

A BL sejtvonalakra, LCL-ekre, normál B-sejtekre vonatkozó metilációs eredményeinket a második közlemény I. táblázata mutatja be.

Valamennyi vizsgált EBV-negatív és pozitív BL sejtvonalban $p16^{INK4A}$ promóter metilációt tudtunk kimutatni. A Ramos, Jijoye, Namalwa sejtvonalakban ezen gén metilációja részleges volt. Ezzel szemben egyik BL kultúrában sem találtunk $p14^{ARF}$ promóter metilációt, kivétel a Ramos sejtvonal, melyben csak részleges metilációt detektáltunk.

A korábban kialakított 5 LCL-ben 4 esetben figyeltük meg mindkét gén promóterének együttes metilációját. Ezek közül a $p14^{ARF}$ promóter csak részleges metilációt mutatott a Cherry sejtvonalban. A CB-M1-Ral-STO limfoblasztoid sejtvonal az egyetlen kivétel, amelyben a $p14^{ARF}$ gén promótere metilálatlan volt. Azonban ebben az LCL-ben is kimutattuk a $p16^{INK4A}$ promóter részleges metilációját.

A *de novo* kialakított LCL-ekben és normál B-limfocitákban egyik tumor-szuppresszor gén promótere sem volt metilált. Az MSP analízist a BL sejtvonal egy-egy példáján keresztül a 2. közlemény 1. ábrája, míg a korábban kialakított LCL-ek, valamint normál B-sejtek esetében ugyanezen közlemény 2. ábrája szemlélteti.

MEGBESZÉLÉS

A p16^{INK4A} és p14^{ARF} gének genetikai és promóter metilációs változásainak vizsgálata a CML krónikus és akcelerált fázisában (1. közlemény)

A CML-nek jól elkülöníthető fázisai vannak, így alkalmas modell a daganat kialakulásakor, illetve a betegség progressziójakor bekövetkező molekuláris genetikai változások tanulmányozására. A t (9,22) kromoszomális transzlokáció molekuláris történései és klinikai jelentősége már jól ismertek (Heisterkamp N 1983). Azonban a CML KF-AF átmenet során több további genetikai esemény is lejátszódik, pl. további citogenetikai aberrációk jelennek meg, változások következnek be az onkogének és a tumor-szuppresszor gének expressziójában.

A vérképző rendszer malignus kórképeinek tanulmányozása során a tanulmányok p16^{INK4A} alteráció két fő típusáról számoltak be különböző leukémia- és limfómátípusokban. Gyakori homozigóta delécióként írtak le ALL, ATL és a CML limfoid blasztos fázisában. A másik fő p16^{INK4A} inaktivációs mechanizmus a promóter metiláció. Nagy százalékban volt a p16^{INK4A} gén promóter metilált az AML, ALL, BL, NHL és MM mintákban (lásd II. táblázat). Ezzel ellentétben a p14^{ARF} gén szerepe a hematológiai daganatokban kevésbé ismert. T-sejtes ALL-ben kimutatták, hogy az INK4A/ARF lókuszban bekövetkező homozigóta deléció egyaránt érinti a p16^{INK4A} és a p14^{ARF} gént is (Gardie B 1998).

Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a p16^{INK4A}/p14^{ARF} génekben milyen inaktivációs mechanizmusok vezethetnek a CML akcelerációjához, és ezek milyen gyakorisággal következnek be. Összhangban a korábbi tanulmányokkal, nem tudtunk homo-, vagy heterozigóta delécióként kimutatni a CML KF és AF-ában (Ogawa S 1995, Sill H 1995, Guran S 1998). A CML AF-ben relatíve nagy számban sikerült heterozigóta mutációt detektálni, korábban ilyen eredményekről nem számoltak be. Mivel a KF-ben, azaz a kezelése előtt, genetikai eltérést egyetlen esetben sem tapasztaltunk, nem zárható ki az a feltevés, hogy a kemoterápiás kezelés indukálta a mutációk létrejöttét. Az exon 1 α -ban 10, az exon 1 β -ban 3 esetben detektáltunk báziscserét. A mindössze 4 aminosavat kódoló exon 3-ban eltérést egyik AF-ú mintában sem találtunk. Az exon 2-ben a 11-ből 7 olyan nukleotidváltozást figyeltünk meg, amely érinti mind a p16^{INK4A}, mind a p14^{ARF} gént. Nagyobb számban találtunk misszensz, mint csendes vagy nonszensz mutációt. Valamennyi mutáció heterozigóta volt. Az INK4A/ARF lókuszban 2 mutációs forrópontot azonosítottunk a p16^{INK4A} 1. exon 35. (Ser→Ile), és a 2. exon 80. kodonjában (Glu→Glu). Ez a nukleotidváltás érinti a p14^{ARF} gént

is, a gén 103. kodonjában eredményez Gly→Arg aminosavcserét. Ezek a mutációs forrópontok különböznek attól, mint amiről más tumorokban beszámoltak (Caldas C 1994). A heterozigóta mutációk azért fontosak, mert a heterozigótaság elvesztésével megteremthetik a lehetőségét a tumor-szuppresszor fehérjék funkcióvesztéséhez.

A CML AF-ben a $p16^{INK4A}$ gén promóterének metiláltságát elsőként mutattuk ki. Eredményünk ellentétben áll azzal az egyetlen tanulmánnyal, melyben nem tudtak $p16^{INK4A}$ metilációt detektálni. Ennek oka feltételezhetően a kis mintaszám volt (Nguyen C 2001). A CML KF-ben egyetlen mintában sem találtunk promóter metilációt. Ezzel szemben az esetek közel felében figyeltünk meg $p16^{INK4A}$ és $p14^{ARF}$ promóter metilációt. Ha a promóter metilált, nem történik génexpresszió, a $p16^{INK4A}$ és a $p14^{ARF}$ proteinek hiányában pedig – az irodalmi áttekintésben részletezett módon – károsodik mind a p53, mind a retinoblasztóma útvonal sejtciklust szabályzó működése. Így a tumorsejtek szelektív szaporodási előnyre tesznek szert. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a $p16^{INK4A}$ és a $p14^{ARF}$ gének metiláció okozta transzkripció inaktiválása egy fontos mechanizmus lehet a CML akcelerációjában.

Más tumor-szuppresszor gének strukturális eltérései is vezethetnek a CML progressziójához. Az AF-ben 6 beteg esetében találtunk 13-as (*RB*) és/vagy 17-es kromoszóma (*p53*) aberrációt. Néhány betegnél 2q-, -5, -7, 16p- és -18 kariotípus abnormalitások voltak. Ezek a kromoszómák további tumor-szuppresszor gének lokalizálódnak (Hesketh R 1995). A *PMS-1* a 2-es, az *APL* az 5-ös, a *PMS-2* a 7-es, a *TSC-2* a 16-os, és a *DCC* a 18-as kromoszómán helyezkedik el. Bár ezen gének szignifikáns változásai nem ismertek, az *APL*, *DCC*, *PMS-1*, *PMS-2* és *TSC-2* gének inaktivációja is fontos lehet a CML KF-ből AF-be történő átmenetében. Két betegnél az AF-ben talált második Ph kromoszóma jelenléte tovább növelheti a leukémiás sejtek szaporodását, bár plusz Ph kromoszóma megjelenése ritka esemény a CML AF-ában (Swolin B 1985). Más genetikai események, pl. különböző onkogének expressziójának változásai is szerepet játszhatnak a betegség progressziójában (Beck Z 1998).

A p16^{INK4A}/p14^{ARF} gének szekvenciális és metilációs eltéréseinek tanulmányozása EBV-vel fertőzött LCL-ekben és BL sejtvonalakban (2. közlemény)

B-limfocitákból EBV-vel történő fertőzéssel frissen kialakított LCL-ek, korábban létrehozott immortalizált LCL-ek és BL sejtvonalak kiváló in vitro modell rendszert nyújtanak az EBV vírussal fertőzött B-sejtek tumorgenezise során bekövetkező molekuláris biológiai változások vizsgálatához.

A humán B-limfoblasztoid sejtvonalak tumorgenezise többlépcsős folyamat. Az LCL-ek immortalizációja a limfomagenezis későbbi stádiumában játszódik le. Ez a folyamat tumor-szuppresszor gén inaktivációval, kromoszomális aberrációkkal, telomerázaktivitás- és onkogénexpressziós változásokkal jár együtt (Lindstrom MS 2001, Okubo M 2001). Az EBV fertőzést követő transzformáció nem jelent feltétlenül immortalizációt, ugyanis kimutatták, hogy az EBV-transzformált LCL-ek immortalizációja csak átlag 160 osztódás után következik be (Kataoka H 1997). Az erőteljes telomerázaktivitás sejtproliferációt eredményez LCL-ekben, azonban a telomerázaktivitás nélkülözhetetlen, de nem elégséges feltétele az EBV-transzformált B-limfoblasztoid sejtvonalak folyamatos osztódásához (Kataoka H 1997). Kariotípus analízissel igazolták, hogy a kromoszomális átrendeződés szintén lényeges lépésnek tekinthető az LCL-ek immortalizációjában (Kataoka H 1997, Okubo M 2001). Kimutatták, hogy a kromoszomális eltérések, és az erős telomerázaktivitás párhuzamosan jelentkeznek az immortalizációs folyamatban (Okubo M 2001). Továbbá azt, hogy LCL-ek és BL sejtvonalak esetén az immortalizált fenotípus megjelenéséhez a tumor-szuppresszor génekben bekövetkező genetikai és epigenetikai változások vezetnek, melyek hatására kontrollálatlan sejtosztódás következik be (Lindstrom MS 2001). A p16^{INK4A}/p14^{ARF} tumor-szuppresszor gének genetikai vagy epigenetikai mechanizmussal történő inaktivációjának szerepe a limfomagenezis során nagyrészt még tisztázatlan. Ezért ezen két gén mutációs és metilációs eltéréseit vizsgáltuk nyugvó B-limfocitákban, *de novo* transzformált B-sejtekben (pre-immortalizált LCL), post-immortalizált LCL-ekben, EBV-pozitív és negatív BL sejtvonalakban.

Nem sikerült kimutatni deléció és homozigóta mutációt B-limfocitákban, pre-, és post-immortalizált LCL-ekben, valamint BL sejtvonalakban egyik gén esetében sem. Az INK4A/ARF lókuszbán az LCL-ek, BL sejtvonalak szekvenenciaanalízisével 3 EBV-pozitív BL sejtvonalban találtunk heterozigóta mutációt (2. közlemény/II. táblázat). Normál B-limfocitákban, frissen kialakított LCL-ekben nem tudtunk mutációt kimutatni a p16^{INK4A}/p14^{ARF} gének egyik exonjában sem. A korábbi tanulmányokkal egyetértésben

megállapíthatjuk, hogy BL-ben ritka történés a két gén genetikai eltérések hatására bekövetkezett inaktivációja (Herman JG 1997, Drexler HG 1998, Krug U 2002).

A daganatok kifejlődésének kockázatát adott tumor-szuppresszor génben létrejött genetikai eltérések mellett az epigenetikai változások is növelik. A fő epigenetikai változásnak elsősorban a tumor-szuppresszor gének szabályzó régiójában bekövetkező CpG szigetek metilációja tekinthető (Esteller M 2001). A metiláció típusa és mértéke szövetspecifikus, és egy adott tumor esetében sem metilált az összes tumor-szuppresszor gén. Számos malignus kórképben – közöttük limfómákban is – kimutatták, hogy a $p16^{INK4A}$ és $p14^{ARF}$ gének metilációjával a fehérjeexpresszió csökken, ezen tumor-szuppresszor fehérjék hiányában pedig megszűnik a sejtosztódásra gyakorolt antagonistá hatás, szabályozatlan sejtprolifерáció következik be (Esteller M 2001, Sanchez-Aguilera A 2002). Ezeket a változásokat ezért BL sejtvonalakban és különböző stádiumban lévő LCL-ekben tanulmányoztuk.

Metilációs vizsgálataink eredménye azt mutatja, hogy valamennyi BL sejtvonalban a $p16^{INK4A}$ gén részlegesen vagy teljesen metilált. Eredményeinkkel összhangban Klangby és társai ugyanebben a tumortípusban hasonlóan gyakori $p16^{INK4A}$ metilációról számoltak be, míg vizsgálataikban az LCL-eknek csak kis százalékában találtak metilációt (Klangby U 1998). A primer B-sejtekben, illetve *de novo* immortalizált LCL-ekben mi sem tudunk $p16^{INK4A}$ metilációt kimutatni, azonban a 160 osztódást elért LCL-ek szinte mindegyikében ez a gén hipermetilált volt. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a BL sejtvonalak, és LCL-ek tumorgenezisében központi szerepet játszhat a $p16^{INK4A}$ gén epigenetikai inaktivációja. A $p16^{INK4A}$ proteinek hiánya a B-sejtek immortalizációjához vezethet.

A normál B-limfocitákban, frissen létrehozott LCL-ekben és EBV-pozitív BL sejtvonalakban a $p14^{ARF}$ gén nem volt metilált. A 160 PDL-t meghaladó post-immortalizált LCL-ekben azonban egy minta kivételével valamennyi vizsgált sejt kultúrában a $p14^{ARF}$ promóter részleges (Cherry), vagy teljes metilációt mutatott. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a $p14^{ARF}$ gén hipermetilációja a B-sejtek immortalizációjához szükséges lehet, azonban a BL fenotípus kialakulásában nincs szerepe.

Néhány esetben a $p16^{INK4A}$ és $p14^{ARF}$ gének promótere részleges metilációt mutatott (2. közlemény I. táblázata), amely szintén eredményezheti a 2 tumor-szuppresszor gén inaktiválódását. Kimutatták ugyanis, hogy a metiláció szintje (részleges vagy teljes metiláció) a fehérjeszintézis mértékével korrelál. Minél inkább metilált a gén promótere, annál kisebb mértékű a génről történő fehérjeexpresszió (Klangby U 1998, Zheng S 2000).

A virális proteinek szerepet játszhatnak a daganatok kifejlődésében, és elősegíthetik a sejtekben azon genetikai változások létrejöttét, melyek a tumor progressziójához és immortalizációhoz szükségesek. Az EBV látens proteinek jelenléte elősegítheti a B-sejtek transzformációját, illetve az apoptózis gátlásával kontrollálatlan sejtproliferációt eredményezhet (Young LS 2003). Az LMP-1 fehérjéről leírták, hogy a metil-transzferáz enzim aktiválásával képes metilálni egyes gének promóterét (Tsai CN 2002). A vizsgált LCL-ek mindegyikére és BL sejtvonalak nagy részére III. látenciatípus jellemző, tehát számos EBV látens protein expresszálódik, melyek a $p14^{ARF}$ fehérje kifejeződése ellenére az LCL és BL sejtek szelektív szaporodási előnyét biztosíthatja. Míg a $p16^{INK4A}$ metilációt mutató BL sejtvonalak között EBV-pozitívak és negatívak egyaránt voltak, az egyetlen $p14^{ARF}$ metilációt mutató sejtvonal (Ramos) EBV mentes volt. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy nem elsődlegesen az EBV látens fehérjéinek van szerepe a $p16^{INK4A}/p14^{ARF}$ gének metilációjának kiváltásában.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy az EBV-transzformált LCL-ek evolúciója egy többlépcsős folyamat, magában foglalja a tumor-szuppresszor gének inaktiválását, amely a sejtciklus negatív kontrolljának elvesztését eredményezheti. A vizsgált BL sejtvonalak esetén a $p16^{INK4A}$, az LCL-ekben pedig a $p16^{INK4A}$ és $p14^{ARF}$ tumor-szuppresszor gének együttes epigenetikai inaktiválása játszhat fontos szerepet a tumoros fenotípus kiváltásában, illetve az immortalizációban.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. Megállapíthatjuk, hogy a CML progressziójában alapvető szerepe van a $p16^{INK4A}$ és $p14^{ARF}$ tumor-szuppresszor gének genetikai és epigenetikai úton való inaktivációjának.
2. Nagyobb genetikai aberrációt, deléciót és a 9-es kromoszómát érintő citogenetikai eltérést nem találtunk. A CML akcelerált fázisában a 30 minta közül $p16^{INK4A}$ 1. exonjában 10, 2. exonjában 11, $p14^{ARF}$ 1. exonjában pedig 3 esetben mutattunk ki heterozigóta mutációt. A 2. exonban talált eltérések közül 7 érintette a $p14^{ARF}$ gént is. Két mutációs forrópontot azonosítottunk a $p16^{INK4A}$ 1. exon 35. (Ser→Ile) és a 2. exon 80. kodonjában (Glu→Glu).
3. A $p16^{INK4A}$ gén 12, a $p14^{ARF}$ gén promótere szintén 12 AF-ú betegnél volt metilált. A két gén együttes metiláltságát 10 esetben figyeltük meg.
4. Mivel az EBV-mentes BL sejtvonalak metilációs mintázata nem különbözött jelentősen az EBV-pozítív mintákétól, feltehetőleg a $p16^{INK4A}/p14^{ARF}$ gének metilációjának kiváltásában nem elsődlegesen az EBV látens fehérjéi játszanak szerepet.
5. Három BL sejtvonalban azonosítottunk heterozigóta mutációt, 2 esetben a $p16^{INK4A}$ 1. exonjában, 1 mintában pedig a $p16^{INK4A}$ 2. exonjában, amely változás érintette a $p14^{ARF}$ gént is. Valamennyi vizsgált EBV-negatív és pozitív BL sejtvonalban $p16^{INK4A}$ promóter metilációt tudtunk kimutatni. Ezzel szemben egyik BL kultúrában sem találtunk $p14^{ARF}$ promóter metilációt, kivétel a Ramos sejtvonal, melyben csak részleges metilációt detektáltunk. A korábban kialakított LCL-ek nagy részében mindkét gén promóterének együttes metilációját figyeltük meg. A *de novo* kialakított LCL-ekben és normál B-limfocitákban sem a $p16^{INK4A}$, sem a $p14^{ARF}$ gén promótere nem volt metilált.
6. Vizsgálati eredményeink alapján, a $p16^{INK4A}/p14^{ARF}$ promóterek metilációja fontosabb mechanizmus lehet a tumor progressziójában és az immortalizációban.
7. A B-sejtek tumorgenezise egy többlépcsős folyamat, melynek csak egy későbbi stádiumában játszik szerepet az INK4A/ARF gén inaktiváció.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Legelőször is köszönettel tartozom Dr. D. Tóth Ferenc professzor úrnak, akinek személyesen már sajnos nem tudtam kifejezni hálámat a kiváló és fáradhatatlan szakmai segítségéért. Köszönöm a Ph. D. munkám során a kísérleti körülmények megteremtésében nyújtott segítségét és nélkülözhetetlen, hasznos tanácsait.

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Beck Zoltán egyetemi adjunktusnak, az elméleti és gyakorlati munkámban való lelkiismeretes irányítását, segítségét és baráti támogatását.

Köszönet illeti Kozmáné Markovics Erika asszisztent, aki a kísérletek kivitelezésében mindvégig önzetlenül segített, és barátságával mellettem állt.

Köszönöm az intézet valamennyi munkatársának, valamint Ph. D. hallgatótársaimnak a segítséget és a támogatást.

Köszönetet mondok a szakmai együttműködésért a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum II. számú Belgyógyászati-, és Gyermekklinikája dolgozóinak.

Végül szeretnék köszönetet mondani Dr. Gergely Lajos professzor úrnak, amiért lehetővé tette számomra az Orvosi Mikrobiológiai Intézetben végzett kutatómunkát.

IRODALOMJEGYZÉK

Ahuja H, Bar-Eli M, Advani SH, Benchimol S, Cline MJ. Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Sep;86(17):6783-7.

Ahuja HG, Jat PS, Foti A, Bar-Eli M, Cline MJ. Abnormalities of the retinoblastoma gene in the pathogenesis of acute leukemia. *Blood*. 1991 Dec 15;78(12):3259-68.

Alberts AS, Thorburn AM, Shenolikar S, Mumby MC, Feramisco JR. Regulation of cell cycle progression and nuclear affinity of the retinoblastoma protein by protein phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jan 15;90(2):388-92. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Mar 15;90(6):2556.

Baur AS, Shaw P, Burri N, Delacretaz F, Bosman FT, Chaubert P. Frequent methylation silencing of p15(INK4b) (MTS2) and p16(INK4a) (MTS1) in B-cell and T-cell lymphomas. *Blood*. 1999 Sep 1;94(5):1773-81.

Beck Z, Bacsi A, Kovacs E, Kiss J, Kiss A, Balogh E, Telek B, Toth FD, Andirko I, Olah E, Udvardy M, Rak K. Changes in oncogene expression implicated in evolution of chronic granulocytic leukemia from its chronic phase to acceleration. *Leuk Lymphoma*. 1998 Jul;30(3-4):293-306.

Beck Z, Kiss A, Toth FD, Szabo J, Bacsi A, Balogh E, Borbely A, Telek B, Kovacs E, Olah E, Rak K. Alterations of P53 and RB genes and the evolution of the accelerated phase of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2000 Aug;38(5-6):587-97.

Bernstein R. Cytogenetics of chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol*. 1988 Jan;25(1):20-34.

Blick M, Westin E, Gutterman J, Wong-Staal F, Gallo R, McCredie K, Keating M, Murphy E. Oncogene expression in human leukemia. *Blood*. 1984 Dec;64(6):1234-9.

Bodescot M, Chambraud B, Farrell P, Perricaudet M. Spliced RNA from the IR1-U2 region of Epstein-Barr virus: presence of an open reading frame for a repetitive polypeptide. *EMBO J*. 1984 Aug;3(8):1913-7.

Burkitt D, Hutt MS, Wright DH. The african lymphoma: preliminary observations on response to therapy. *Cancer*. 1965 Apr;18:399-410.

Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet*. 1994 Sep;8(1):27-32. Erratum in: *Nat Genet* 1994 Dec;8(4):410.

Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, Lewis CM, Anderson DE, Fountain JW, Hegi ME, Wiseman RW, Petty EM, Bale AE, et al. Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. *Science*. 1992 Nov 13;258(5085):1148-52.

Caspersson T, Zech L, Johansson C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res*. 1970 Jun;60(3):315-9.

Cavenee WK, White RL. The genetic basis of cancer. *Sci Am*. 1995 Mar;272(3):72-9.

Cervantes F, Ballesta F, Mila M, Rozman C. Cytogenetic studies in blast crisis of Ph-positive chronic granulocytic leukemia: results and prognostic evaluation in 52 patients. *Cancer Genet Cytogenet*. 1986 Apr 1;21(3):239-46.

Chen TC, Hsieh LL, Kuo TT, Ng KF, Wu Chou YH, Jeng LB, Chen MF. p16INK4 gene mutation and allelic loss of chromosome 9p21-22 in Taiwanese hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*. 2000 May-Jun;20(3A):1621-6.

Claus R, Lubbert M. Epigenetic targets in hematopoietic malignancies. *Oncogene*. 2003 Sep 29;22(42):6489-96.

Craig FE, Gulley ML, Banks PM. Posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol*. 1993 Mar;99(3):265-76.

Dickstein JI, Vardiman JW. Issues in the pathology and diagnosis of the chronic myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndromes. *Am J Clin Pathol*. 1993 Apr;99(4):513-25.

Drexler HG. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia*. 1998 Jun;12(6):845-59.

el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet*. 1992 Apr;1(1):45-9.

Ernberg I, Kallin B, Dillner J, Falk K, Ehlin-Henriksson B, Hammarskjold ML, Klein G. Lymphoblastoid cell lines and Burkitt-lymphoma-derived cell lines differ in the expression of a second Epstein-Barr virus encoded nuclear antigen. *Int J Cancer*. 1986 Nov 15;38(5):729-37.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*. 2001 Apr 15;61(8):3225-9.

Evans AS. Clinical syndromes associated with EB virus infection. *Adv Intern Med*. 1972;18:77-93.

Feinstein E, Cimino G, Gale RP, Alimena G, Berthier R, Kishi K, Goldman J, Zaccaria A, Berrebi A, Canaani E. p53 in chronic myelogenous leukemia in acute phase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jul 15;88(14):6293-7.

Fountain JW, Karayiorgou M, Ernstoff MS, Kirkwood JM, Vlock DR, Titus-Ernstoff L, Bouchard B, Vijayaradhi S, Houghton AN, Lahti J, et al. Homozygous deletions within human chromosome band 9p21 in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Nov 1;89(21):10557-61.

Gao X, Honn KV. Recessive oncogenes: current status. *Pathol Oncol Res*. 1995;1(1):7-22.

Gardie B, Cayuela JM, Martini S, Sigaux F. Genomic alterations of the p19ARF encoding exons in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1998 Feb 1;91(3):1016-20.

Gires O, Zimmer-Strobl U, Gonnella R, Ueffing M, Marschall G, Zeidler R, Pich D, Hammerschmidt W. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J*. 1997 Oct 15;16(20):6131-40.

Goldman D and Merrill CR. Silver staining of DNA in polyacrylamide gels: linearity and effect of fragment size. *Electrophoresis*. 1982, 3: 24-26.

Grana X, Garriga J, Mayol X. Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene*. 1998 Dec 24;17(25):3365-83.

Gregory CD, Rowe M, Rickinson AB. Different Epstein-Barr virus-B cell interactions in phenotypically distinct clones of a Burkitt's lymphoma cell line. *J Gen Virol*. 1990 Jul;71 (Pt 7):1481-95.

Groffen J, Heisterkamp N, Stephenson JR, van Kessel AG, de Klein A, Grosveld G, Bootsma D. c-sis is translocated from chromosome 22 to chromosome 9 in chronic myelocytic leukemia. *J Exp Med*. 1983 Jul 1;158(1):9-15.

Guran S, Bahce M, Beyan C, Korkmaz K, Yalcin A. P53, p15INK4B, p16INK4A and p57KIP2 mutations during the progression of chronic myeloid leukemia. *Haematologia (Budap)*. 1998;29(3):181-93.

Haidar MA, Cao XB, Manshour T, Chan LL, Glassman A, Kantarjian HM, Keating MJ, Beran MS, Albitar M. p16INK4A and p15INK4B gene deletions in primary leukemias. *Blood*. 1995 Jul 1;86(1):311-5.

Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G, Franzmann MB, Karkov J, Black F, Skinhoj P, Pedersen C. AIDS-related lymphoma. Histopathology, immunophenotype, and association with Epstein-Barr virus as demonstrated by in situ nucleic acid hybridization. *Am J Pathol*. 1991 Jan;138(1):149-63.

Harabuchi Y, Yamanaka N, Kataura A, Imai S, Kinoshita T, Mizuno F, Osato T. Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma. *Lancet*. 1990 Jan 20;335(8682):128-30.

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994 Sep 1;84(5):1361-92.

He J, Allen JR, Collins VP, Allalunis-Turner MJ, Godbout R, Day RS 3rd, James CD. CDK4 amplification is an alternative mechanism to p16 gene homozygous deletion in glioma cell lines. *Cancer Res*. 1994 Nov 15;54(22):5804-7.

Hedman H, Lundgren E. Regulation of LFA-1 avidity in human B cells. Requirements for dephosphorylation events for high avidity ICAM-1 binding. *J Immunol*. 1992 Oct 1;149(7):2295-9.

Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, Hansen PF, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1983 Nov 17-23;306(5940):239-42.

Henderson S, Rowe M, Gregory C, Croom-Carter D, Wang F, Longnecker R, Kieff E, Rickinson A. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell*. 1991 Jun 28;65(7):1107-15.

Herman JG, Civin CI, Issa JP, Collector MI, Sharkis SJ, and Baylin SB. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 1997;57:837-841.

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 3;93(18):9821-6.

Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res*. 1995 Oct 15;55(20):4525-30.

Herwig S, Strauss M. The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis. *Eur J Biochem*. 1997 Jun 15;246(3):581-601.

Hesketh R. *The Oncogene Facts Book*. San Diego, Academic Press, 1995, 295-336.

Hinuma Y, Konn M, Yamaguchi J, Wudarski DJ, Blakeslee JR Jr, Grace JT Jr. Immunofluorescence and herpes-type virus particles in the P3HR-1 Burkitt lymphoma cell line. *J Virol*. 1967 Oct;1(5):1045-51.

Hjorth R, Jonsson AK, Vretblad P. A rapid method for purification of human granulocytes using percoll. A comparison with dextran sedimentation. *J Immunol Methods*. 1981;43(1):95-101.

Ho A, Dowdy SF. Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev*. 2002 Feb;12(1):47-52.

Holland EA, Schmid H, Kefford RF, Mann GJ. CDKN2A (P16(INK4a)) and CDK4 mutation analysis in 131 Australian melanoma probands: effect of family history and multiple primary melanomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999 Aug;25(4):339-48.

Hong FD, Huang HJ, To H, Young LJ, Oro A, Bookstein R, Lee EY, Lee WH. Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jul;86(14):5502-6.

Huen DS, Henderson SA, Croom-Carter D, Rowe M. The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene*. 1995 Feb 2;10(3):549-60.

Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*. 1994 Nov 18;79(4):573-82.

ISCN An international system for human cytogenetic nomenclature (1978). Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. *Cytogenet Cell Genet*. 1978;21(6):309-409.

Ishikura H, Yufu Y, Yamashita S, Abe Y, Okamura T, Motomura S, Nishimura J, Nawata H. Biphenotypic blast crisis of chronic myelogenous leukemia: abnormalities of p53 and retinoblastoma genes. *Leuk Lymphoma*. 1997 May;25(5-6):573-8.

Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*. 1986 Mar 6-12;320(6057):84-5.

Jiang WQ, Szekely L, Wendel-Hansen V, Ringertz N, Klein G, Rosen A. Co-localization of the retinoblastoma protein and the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-5. *Exp Cell Res*. 1991 Dec;197(2):314-8.

Jones JF, Shurin S, Abramowsky C, Tubbs RR, Sciotto CG, Wahl R, Sands J, Gottman D, Katz BZ, Sklar J. T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med*. 1988 Mar 24;318(12):733-41.

Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitgian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*. 1994 Apr 15;264(5157):436-40.

- Kamb A. Cell-cycle regulators and cancer. *Trends Genet.* 1995 Apr;11(4):136-40.
- Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 7;95(14):8292-7.
- Kantarjian HM, Deisseroth A, Kurzrock R, Estrov Z, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: a concise update. *Blood.* 1993 Aug 1;82(3):691-703.
- Kantarjian HM, Giles FJ, O'Brien SM, Talpaz M. Clinical course and therapy of chronic myelogenous leukemia with interferon-alpha and chemotherapy. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1998 Feb;12(1):31-80.
- Kantarjian HM, Talpaz M, Gutterman JU. Chronic myelogenous leukaemia: past, present, and future. *Hematol Pathol.* 1988;2(2):91-120.
- Kataoka H, Tahara H, Watanabe T, Sugawara M, Ide T, Goto M, Furuichi Y, Sugimoto M. Immortalization of immunologically committed Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines accompanied by a strong telomerase activity. *Differentiation.* 1997 Dec;62(4):203-11.
- Kavathas P, Bach FH, DeMars R. Gamma ray-induced loss of expression of HLA and glyoxalase I alleles in lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Jul;77(7):4251-5.
- Kieff E, Dambaugh T, Heller M, King W, Cheung A, van Santen V, Hummel M, Beisel C, Fennewald S, Hennessy K, Heineman T. The biology and chemistry of Epstein-Barr virus. *J Infect Dis.* 1982 Oct;146(4):506-17.
- Kieser A, Kilger E, Gires O, Ueffing M, Kolch W, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *EMBO J.* 1997 Nov 3;16(21):6478-85.
- King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science.* 1996 Dec 6;274(5293):1652-9.
- Klangby U, Okan I, Magnusson KP, Wendland M, Lind P, Wiman KG. p16/INK4a and p15/INK4b gene methylation and absence of p16/INK4a mRNA and protein expression in Burkitt's lymphoma. *Blood.* 1998 Mar 1;91(5):1680-7.
- Klein E, Klein G, Nadkarni JS, Nadkarni JJ, Wigzell H, Clifford P. Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. *Cancer Res.* 1968 Jul;28(7):1300-10.

Klein G, Dombos L, Gothoskar B. Sensitivity of Epstein-Barr virus (EBV) producer and non-producer human lymphoblastoid cell lines to superinfection with EB-virus. *Int J Cancer*. 1972 Jul 15;10(1):44-57.

Klein G, Giovanella B, Westman A, Stehlin JS, Mumford D. An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection. *Intervirology*. 1975;5(6):319-34.

Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Apr;68(4):820-3.

Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*. 1996 May 1;10(9):1054-72.

Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, Harlow E. Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature*. 1995 Jun 8;375(6531):506-10.

Konishi N, Nakamura M, Kishi M, Nishimine M, Ishida E, Shimada K Heterogeneous methylation and deletion patterns of the INK4a/ARF locus within prostate carcinomas. *Am J Pathol*. 2002 Apr;160(4):1207-14.

Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell*. 1984 Jul;37(3):1035-42.

Kraiss S, Quaiser A, Oren M, Montenarh M. Oligomerization of oncoprotein p53. *J Virol*. 1988 Dec;62(12):4737-44.

Krug U, Ganser A, Koeffler HP. Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene*. 2002 May 13;21(21):3475-95.

Kwong J, Lo KW, To KF, Teo PM, Johnson PJ, Huang DP. Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2002 Jan;8(1):131-7.

Laherty CD, Hu HM, Opipari AW, Wang F, Dixit VM. The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem*. 1992 Dec 5;267(34):24157-60.

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):15-6.

Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee EY. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science*. 1987 Mar 13;235(4794):1394-9.

LeMaistre A, Lee MS, Talpaz M, Kantarjian HM, Freireich EJ, Deisseroth AB, Trujillo JM, Stass SA. Ras oncogene mutations are rare late stage events in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1989 Mar;73(4):889-91.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):323-31.

Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell*. 1992 Jun 12;69(6):905-14.

Lindstrom MS, Klangby U, Wiman KG. p14ARF homozygous deletion or MDM2 overexpression in Burkitt lymphoma lines carrying wild type p53. *Oncogene*. 2001 Apr 19;20(17):2171-7.

Liu E, Hjelle B, Bishop JM. Transforming genes in chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Mar;85(6):1952-6.

Liu Q, Neuhausen S, McClure M, Frye C, Weaver-Feldhaus J, Gruis NA, Eddington K, Allalunis-Turner MJ, Skolnick MH, Fujimura FK, et al. CDKN2 (MTS1) tumor suppressor gene mutations in human tumor cell lines. *Oncogene*. 1995 Mar 16;10(6):1061-7. Erratum in: *Oncogene*. 1995 Dec 7;11(11):2455.

Magrath IT, Pizzo PA, Whang-Peng J, Douglass EC, Alabaster O, Gerber P, Freeman CB, Novikovs L. Characterization of lymphoma-derived cell lines: comparison of cell lines positive and negative for Epstein-Barr virus nuclear antigen. I. Physical, cytogenetic, and growth characteristics. *J Natl Cancer Inst*. 1980 Mar;64(3):465-76.

Mao L, Merlo A, Bedi G, Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ, Sidransky D. A novel p16INK4A transcript. *Cancer Res*. 1995 Jul 15;55(14):2995-7.

Marshall CJ. Tumor suppressor genes. *Cell*. 1991 Jan 25;64(2):313-26.

May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*. 1999 Dec 13;18(53):7621-36.

Medema RH, Herrera RE, Lam F, Weinberg RA. Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jul 3;92(14):6289-93.

Nadkarni JS, Nadkarni JJ, Clifford P, Manolov G, Fenyó EM, Klein E. Characteristics of new cell lines derived from Burkitt lymphomas. *Cancer*. 1969 Jan;23(1):64-79.

Nakai H, Misawa S, Toguchida J, Yandell DW, Ishizaki K. Frequent p53 gene mutations in blast crisis of chronic myelogenous leukemia, especially in myeloid crisis harboring loss of a chromosome 17p. *Cancer Res*. 1992 Dec 1;52(23):6588-93.

Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, Asker C, Wiman K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol.* 2001 Apr;11(2):159-68.

Nakashima R, Fujita M, Enomoto T, Haba T, Yoshino K, Wada H, Kurachi H, Sasaki M, Wakasa K, Inoue M, Buzard G, Murata Y. Alteration of p16 and p15 genes in human uterine tumours. *Br J Cancer.* 1999 May;80(3-4):458-67.

Nasmyth K. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science.* 1996 Dec 6;274(5293):1643-5.

Nguyen C, Liang G, Nguyen TT, Tsao-Wei D, Groshen S, Lubbert M, Zhou JH, Benedict WF, Jones PA. Susceptibility of nonpromoter CpG islands to de novo methylation in normal and neoplastic cells. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Oct 3;93(19):1465-72.

Niedobitek G, Meru N, Delecluse HJ. Epstein-Barr virus infection and human malignancies. *Int J Exp Pathol.* 2001 Jun;82(3):149-70.

Niedobitek G. Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Mol Pathol.* 2000 Oct;53(5):248-54.

Nilsson K. Human B-lymphoid cell lines. *Hum Cell.* 1992 Mar;5(1):25-41.

Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature.* 1994 Apr 21;368(6473):753-6.

Nowell PC and Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132: 1497-1498.

Nurse P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell.* 1994 Nov 18;79(4):547-50.

Ogawa S, Hangaishi A, Miyawaki S, Hirosawa S, Miura Y, Takeyama K, Kamada N, Ohtake S, Uike N, Shimazaki C, et al. Loss of the cyclin-dependent kinase 4-inhibitor (p16; MTS1) gene is frequent in and highly specific to lymphoid tumors in primary human hematopoietic malignancies. *Blood.* 1995 Aug 15;86(4):1548-56.

Okorokov AL, Ponchel F, Milner J. Induced N- and C-terminal cleavage of p53: a core fragment of p53, generated by interaction with damaged DNA, promotes cleavage of the N-terminus of full-length p53, whereas ssDNA induces C-terminal cleavage of p53. *EMBO J.* 1997 Oct 1;16(19):6008-17.

Okubo M, Tsurukubo Y, Higaki T, Kawabe T, Goto M, Murase T, Ide T, Furuichi Y, Sugimoto M. Clonal chromosomal aberrations accompanied by strong telomerase activity in immortalization of human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001 Aug;129(1):30-4.

Olopade OI, Bohlander SK, Pomykala H, Maltepe E, Van Melle E, Le Beau MM, Diaz MO. Mapping of the shortest region of overlap of deletions of the short arm of chromosome 9 associated with human neoplasia. *Genomics.* 1992 Oct;14(2):437-43.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Apr;86(8):2766-70. (a)

Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics.* 1989 Nov;5(4):874-9. (b)

Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Mar 14;1602(1):73-87.

Osato T, Imai S. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Semin Cancer Biol.* 1996 Aug;7(4):175-82.

Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science.* 1989 Nov 3;246(4930):603-8.

Parker GA, Crook T, Bain M, Sara EA, Farrell PJ, Allday MJ. Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)3C is an immortalizing oncoprotein with similar properties to adenovirus E1A and papillomavirus E7. *Oncogene.* 1996 Dec 19;13(12):2541-9.

Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell.* 1998 Mar 20;92(6):713-23.

Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell.* 1995 Dec 15;83(6):993-1000.

Quesnel B, Fenaux P, Philippe N, Fournier J, Bonnetterre J, Preudhomme C, Peyrat JP. Analysis of p16 gene deletion and point mutation in breast carcinoma. *Br J Cancer.* 1995 Aug;72(2):351-3.

Quesnel B, Preudhomme C, Fenaux P. p16ink4a gene and hematological malignancies. *Leuk Lymphoma.* 1996 Jun;22(1-2):11-24.

Raab-Traub N, Flynn K. The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell*. 1986 Dec 26;47(6):883-9.

Ragione FD, Russo G, Oliva A, Mastropietro S, Mancini A, Borrelli A, Casero RA, Iolascon A, Zappia V. 5'-Deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase and p16INK4 deficiency in multiple tumor cell lines. *Oncogene*. 1995 Mar 2;10(5):827-33.

Reed JA, Loganzo F Jr, Shea CR, Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Bogdany JK, Shiel MJ, Haluska FG, Fountain JW, et al. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res*. 1995 Jul 1;55(13):2713-8.

Reymond A, Brent R. p16 proteins from melanoma-prone families are deficient in binding to Cdk4. *Oncogene*. 1995 Sep 21;11(6):1173-8.

Richtsmeier WJ, Wittels EG, Mazur EM. Epstein-Barr virus-associated malignancies. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1987;25(2):105-36.

Romero P, Blick M, Talpaz M, Murphy E, Hester J, Gutterman J. C-sis and C-abl expression in chronic myelogenous leukemia and other hematologic malignancies. *Blood*. 1986 Mar;67(3):839-41.

Rothberg PG, Erisman MD, Diehl RE, Rovigatti UG, Astrin SM Structure and expression of the oncogene c-myc in fresh tumor material from patients with hematopoietic malignancies. *Mol Cell Biol*. 1984 Jun;4(6):1096-103.

Rowe M, Rooney CM, Edwards CF, Lenoir GM, Rickinson AB. Epstein-Barr virus status and tumour cell phenotype in sporadic Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer*. 1986 Mar 15;37(3):367-73.

Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973 Jun 1;243(5405):290-3.

Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Oct 14;1378(2):F115-77.

Sanchez-Aguilera A, Sanchez-Beato M, Garcia JF, Prieto I, Pollan M, Piris MA. p14(ARF) nuclear overexpression in aggressive B-cell lymphomas is a sensor of malfunction of the common tumor suppressor pathways. *Blood*. 2002 Feb 15;99(4):1411-8.

Sanchez-Cespedes M, Reed AL, Buta M, Wu L, Westra WH, Herman JG, Yang SC, Jen J, Sidransky D. Inactivation of the INK4A/ARF locus frequently coexists with TP53 mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 1999 Oct 21;18(43):5843-9.

Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. 1971 Oct 30;2(7731):971-2.

Serra A, Gottardi E, Della Ragione F, Saglio G, Iolascon A. Involvement of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor (CDKN2) gene in the pathogenesis of lymphoid blast crisis of chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*. 1995 Nov;91(3):625-9.

Serrano J, Goebel SU, Peghini PL, Lubensky IA, Gibril F, Jensen RT. Alterations in the p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor gene in gastrinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Nov;85(11):4146-56.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993 Dec 16;366(6456):704-7.

Shaw P, Freeman J, Bovey R, Iggo R. Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene*. 1996 Feb 15;12(4):921-30.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999 Jun 15;13(12):1501-12.

Sherr CJ. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev*. 1998 Oct 1;12(19):2984-91.

Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*. 1985 Jun 13-19;315(6020):550-4.

Siebert R, Willers CP, Opalka B. Role of the cyclin-dependent kinase 4 and 6 inhibitor gene family p15, p16, p18 and p19 in leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 1996 Nov;23(5-6):505-20.

Sill H, Goldman JM, Cross NC. Homozygous deletions of the p16 tumor-suppressor gene are associated with lymphoid transformation of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1995 Apr 15;85(8):2013-6.

Sinclair AJ, Palmero I, Peters G, Farrell PJ. EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *EMBO J*. 1994 Jul 15;13(14):3321-8.

Slamon DJ, deKernion JB, Verma IM, Cline MJ. Expression of cellular oncogenes in human malignancies. *Science*. 1984 Apr 20;224(4646):256-62.

Sokal JE, Baccarani M, Russo D, Tura S. Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol*. 1988 Jan;25(1):49-61.

Speck SH, Strominger JL. Analysis of the transcript encoding the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen I: a potentially polycistronic message generated by long-range splicing of several exons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Dec;82(24):8305-9.

Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J*. 1998 Sep 1;17(17):5001-14.

Swolin B, Weinfeld A, Westin J, Waldenstrom J, Magnusson B. Karyotypic evolution in Ph-positive chronic myeloid leukemia in relation to management and disease progression. *Cancer Genet Cytogenet*. 1985 Sep;18(1):65-79.

Szekely L, Selivanova G, Magnusson KP, Klein G, Wiman KG. EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jun 15;90(12):5455-9.

Takada K. Cross-linking of cell surface immunoglobulins induces Epstein-Barr virus in Burkitt lymphoma lines. *Int J Cancer*. 1984 Jan 15;33(1):27-32.

Tsai CN, Tsai CL, Tse KP, Chang HY, Chang YS The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jul 23;99(15):10084-9.

Ueki T, Toyota M, Sohn T, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH, Goggins M. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2000 Apr 1;60(7):1835-9.

Unger T, Nau MM, Segal S, Minna JD. p53: a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer. *EMBO J*. 1992 Apr;11(4):1383-90.

Wensing B, Farrell PJ. Regulation of cell growth and death by Epstein-Barr virus. *Microbes Infect*. 2000 Jan;2(1):77-84.

Xing EP, Nie Y, Song Y, Yang GY, Cai YC, Wang LD, Yang CS. Mechanisms of inactivation of p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1999 Oct;5(10):2704-13.

Xu L, Sgroi D, Sterner CJ, Beauchamp RL, Pinney DM, Keel S, Ueki K, Rutter JL, Buckler AJ, Louis DN, et al. Mutational analysis of CDKN2 (MTS1/p16ink4) in human breast carcinomas. *Cancer Res*. 1994 Oct 15;54(20):5262-4.

Young LS, Murray PG. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene*. 2003 Aug 11;22(33):5108-21.

Yunis JJ, Ramsay N. Retinoblastoma and subband deletion of chromosome 13. *Am J Dis Child*. 1978 Feb;132(2):161-3.

Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*. 1998 Mar 20;92(6):725-34.

Zheng S, Chen P, McMillan A, Lafuente A, Lafuente MJ, Ballesta A, Trias M, Wiencke JK. Correlations of partial and extensive methylation at the p14(ARF) locus with reduced mRNA expression in colorectal cancer cell lines and clinicopathological features in primary tumors. *Carcinogenesis*. 2000 Nov;21(11):2057-64.

zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P, Santesson L. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature*. 1970 Dec 12;228(276):1056-8.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezésben felhasznált közlemények:

1. **Etelka Nagy**, Zoltán Beck, Attila Kiss, Eszter Csoma, Béla Telek, József Kónya, Éva Oláh, Kálmán Rák, Ferenc D. Tóth: Frequent methylation of *p16^{INK4A}* and *p14^{ARF}* genes implicated in evolution of chronic myeloid leukemia from its chronic to accelerated phase. *European Journal of Cancer*, 39 (16), 2298-305 (2003) **IF: 3,694**
2. **Etelka Nagy**, György Veress, Krisztina Szarka, Eszter Csoma, Zoltán Beck: Frequent methylation of *p16^{INK4A}/p14^{ARF}* promoters in tumorigenesis of Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid cell lines
Anticancer Research in press **IF: 1,347**

Egyéb közlemények:

1. Eszter Csoma, Attila Bácsi, Xiangdong Liu, Judit Szabó, Peter Ebbesen, Zoltán Beck, József Kónya, István Andirkó, **Etelka Nagy**, and Ferenc D. Tóth: Human Herpesvirus 6 Variant A Infects Human Term Syncytiotrophoblasts In Vitro and Induces Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Dually Infected Cells.
Journal of Medical Virology, 67, 67-87 (2002) **IF: 2,629**
2. Zoltán Beck, Attila Bácsi, Xiangdong Liu, Peter Ebbesen, István Andirkó, Eszter Csoma, József Kónya, **Etelka Nagy**, and Ferenc D. Tóth: Differential Patterns of Human Cytomegalovirus Gene Expression in Various T-Cell Lines Carrying Human T-Cell Leukemia-Lymphoma Virus Type 1: Role of Tax-Activated Cellular Transcription Factors.
Journal of Medical Virology, 71 (1), 94-104 (2003) **IF: 2,371**
3. Beck, Z., Bácsi, A., **Nagy, E.**, Csoma, E. and Tóth, F.D.: Induction of full replication cycle of human cytomegalovirus by the Tax protein of HTLV-I in CD4+ T cells
AIDS Res. Hum. Retroviruses 19, p:80 (2003) **IF: 2,291**

FONTOSABB ELŐADÁSOK, POSZTEREK

1. **Nagy E.**, Beck Z., Csoma E., Bácsi A., D. Tóth F.: Az INK4A/ARF lókuszt genetikai változásai a krónikus myeloid leukémia akcelerációjában
Magyar Onkológusok Társaságának Tudományos Konferenciája, 2002. október 4-5., Kecskemét (előadás)
2. **Nagy E.**, Beck Z., Csoma E., D. Tóth F.: Loss of p16^{INK4A} protein expression in Epstein-Barr virus immortalized B-cells: Role of the LMP-1 protein
14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, October 9-11., 2003., Balatonfüred (poszter)
3. **Nagy E.**, Beck Z., D. Tóth F.: Az INK4A gén metilációjának szerepe a krónikus myeloid leukémia progressziójában
Magyar Onkológusok Társaságának XXV. Kongresszusa, 2003. november 12-15., Szeged (előadás)
4. **Nagy E.**, Beck Z., Csoma E., D. Tóth F.: A p16^{INK4A} protein expresszió hiánya Epstein-Barr vírus által immortalizált B-sejtekben: Az LMP-1 protein szerepe
Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság I. Kongresszusa, 2003. november 28-29., Pécs (előadás)
5. **Nagy E.**, Csoma E., Beck Z.: A p16^{INK4A} és p14^{ARF} gének genetikai és epigenetikai változásai Epstein-Barr vírus által transzformált B-sejtvonalakban
Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 2004. október 7-9., Keszthely (előadás)
6. Beck Z., Csoma E., P. Ebbesen, **Nagy E.**, D. Tóth F.: Human Immunodeficiency Virus Type I Pseudotype With Envelope Antigens Of Human Cytomegalovirus Permissively Infects Human Syncytiotrophoblasts
14th International Congress of Hungarian Society For Microbiology, Balatonfüred, October 9-11, 2003 (előadás)

7. Beck, Z., Bácsi, A., **Nagy, E.**, Csoma, E. and Tóth, F.D.: Induction of full replication cycle of human cytomegalovirus by the tax protein of HTLV-I in CD4+ T cells
11th International conference on human retrovirology, 2003, San Francisco, USA

8. Beck Z., **Nagy E.**, Csoma E: Gyakori *p16^{INK4A}* és *p14^{ARF}* gén deléció, valamint promóter metiláció HTLV-I által fertőzött T-sejtvonalakban
Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 2004. október 7-9., Keszthely (előadás)