

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Az ultraibolya B sugárzás és egyéb genotoxikus ágensek hatása
interfázisos emlős sejtek kromatinszerkezetére**

Ujvárosi Kinga



DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2010

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Az ultraibolya B sugárzás és egyéb genotoxikus ágensek hatása
interfázisos emlős sejtek kromatinszerkezetére**

Ujvárosi Kinga

Témavezetők: Prof. Dr. Hunyadi János
Prof. Dr. Bánfalvi Gáspár



DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2010

Az értekezés címe:

Az ultraibolya B sugárzás és egyéb genotoxikus ágensek hatása interfázisos emlős sejtek kromatinszerkezetére

Doktori Iskola:

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezetők:

Prof. Dr. Bánfalvi Gáspár, az MTA doktora

Prof. Dr. Hunyadi János, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Szondy Zsuzsa, az MTA doktora
Dr. Kovács Péter, Ph.D.

A bíráló bizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora

opponensek: Dr. Tóth Sára, Ph.D.
Dr. Goda Katalin, Ph.D.

tagok: Prof. Dr. Szondy Zsuzsa, MTA doktora
Dr. Kovács Péter, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja és helye:

2010. május 27. 12:00 óra, az I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

1. BEVEZETÉS

A tézisek, melyet a tisztelt olvasók a kezükben tartanak, a genotoxikus ágensek hatásának vizsgálatát elemzi a kromatin kondenzálás szintjén, érintve az interfázisos kromatin szerveződés vizsgálatának előzményeit és problémakörét, a kondenzálódás mechanizmusának jellegzetes, minden fajra kiterjedő lépéseit, és a folyamatot károsító ágensek okozta tipizálható morfológiai elváltozásokat.

Az interfázisos kromatin szerveződése a replikáció során kevésbé ismert, mivel ebben a fázisban körülhatárolt kromoszómák nem különíthetők el. Eukariotákban, a genetikai információt hordozó deoxiribonukleinsav hiszton és nem-hiszton fehérjékhez kötött. A DNS kötő fehérjék interakciójának egyik leglátványosabb megnyilvánulása maga a kromatin kondenzálás folyamata. A sejtek mitotikus osztódása közben fénymikroszkóposan észlelhető metafázisos kromoszómákat először Karl Wilhelm von Nägeli svájci botanikus figyelte meg 1842-ben, illetve *Ascaris megalocephala*-ban, Edouard Van Beneden belga tudós. Bázikus anilin festék alkalmazásával, a német anatómus Walther Flemming már 1882-ben leírta a mitózis folyamatát szalamandrában. A kromatin szerveződésének közvetlen megfigyelésére irányuló vizsgálatok csupán részleges információkkal szolgáltak. A magmátrix szerepére a metafázisos kromoszómák kialakulásában kromatin eltávolítási kísérletek utalnak. A kromoszóma kondenzálásról és a kromoszóma struktúráról alkotott modellek és hipotézisek többsége metafázisos kromoszómákon végzett vizsgálatok eredményein alapul. Ismert a kromatin kondenzálás génregulációs szerepe, melyben a gének kölcsönösen visszahatnak a kromatin struktúrára. Számos magfehérjén azonosítottak 40-50 aminosavból álló kromodoméneket, melyek változatos interakciókat alakítanak ki hisztonokkal, DNS-el és RNS-el. A kromatin kondenzálása kapcsolatban áll a transzkripció aktivitással és korrelációt mutat a H3 hiszton foszforiláltságával. A kromatin nukleoszómaon végbemenő, ATP-függő újraszerveződési mechanizmus a DNS torziós dinamikájának szerepét mutatja a kromatinállomány szerveződésében. Az interfázisos kromatinállomány morfológiai vizsgálata azonban nehézségekbe ütközik, mivel paralell sorozat elektronmikroszkópos metszeteken csupán ragacsos hálózatként jelenik meg. A sejtmagban rejtetten és aránylag gyorsan végbemenő kromatin kondenzálás morfológiai vizsgálata ezért technikai akadályokba ütközik.

A 30 nm átmérőjű kromatinszál fölötti szerveződés kialakulásáról kevés adat áll rendelkezésünkre. A kondenzálási folyamat köztitermékeinek meghatározásához egy olyan permeabilizációs technika kidolgozására volt szükség, amely a sejtek életképességét nem csökkenti. Hazánkban elsőként Gárdos György alkalmazta a permeabilizálást egy nukleotid, az ATP bevitelére

emlős sejt intracelluláris vízterébe. A kromatin kondenzálással kapcsolatos kísérleti munkánk előzményei a reverzibilis permeabilizálást követő, interfázisos sejtek magjának kromatin kondenzálására vezethetők vissza. A permeábilis sejtek replikációs közttermékeit C-5 pozícióban szubsztituált pirimidin analógok felhasználásával vizsgálták, mivel ebben a pozícióban úgy helyezhetők nagy térkitöltésű szubsztituensek, mint például a Hg, hogy azok a DNS nagy árkába épülve, a DNS polimeráz funkcióját nem korlátozzák. A biotin beépítése a nukleotidok C-5 pozíciójába szintén nem zavarja meg a replikációt, ugyanakkor inkorporálódik a permeábilis sejtekbe. A biotinált nukleotidok segítségével immunfluoreszcens módszerrel láthatóvá tehetők az újonnan szintetizálódott DNS szakaszok. A permeabilizált sejtek regenerálásával a membrán funkció, a sejtek életképessége és a replikációs gépezetének intaktsága megőrizhető. Az előzetes vizsgálatok azt is leírták, hogy a biotin beépülése lassította a kromatinállomány kondenzálásának folyamatát, így alkalmas lehet a rendszer dinamikájának pontosabb megfigyelésére. A biotinált DNS-sel feldúsíthatók a kromatin kondenzálás lépéseire jellemző közttermékek. Ezeknek a módszereknek a kidolgozásával sikerült meghatározni a kromatin kondenzációjának alapvető jellegzetes lépéseit, ezáltal jól elkülöníthető morfológiai stádiumokat lehet megkülönböztetni egymástól, illetve az egyes stádiumokban megfigyelhető kromatinszerkezetek és a sejtciklus adott szakaszában a sejt méret és a DNS tartalom közötti szoros összefüggések feltárására is sor kerülhetett. A különböző sejt típusokban mindenhol hasonló formákat sikerült elkülöníteni.

A kromatin kondenzációjának folyamatáról elmondható, hogy nem sejt típusra vagy fajra jellemző módon megy végbe, hanem általános sémát követ. Ezért a további vizsgálatok arra irányultak, hogy a különböző genotoxikus ágensek milyen morfológiai elváltozásokat okoznak a kromatin kondenzáció szintjén. A genotoxikus ágensek a kromatinállomány fizikokémiai sebezhetőségének köszönhetően fejtik ki destruktív hatásukat. A kromatin dekondezálalt állapotában, így a DNS replikáció, és a kromatin kondenzálása során az örökítőanyag sérülékenyebb. A korábbi vizsgálatok, a kadmium és a gamma sugárzás genotoxicitásának kromatinkondenzálást befolyásoló szerepét tárták fel. A CHO sejtek kromatinállományának vizsgálatánál is alkalmazott - nagy felbontású elutriálással végrehajtott - sejtszinkronizálással sikerült követni a gamma sugárzás hatását egér preB-M8 sejttenyészetben. Az irodalmi előzményeknek megfelelően elsősorban apoptotikus testek megjelenése volt várható és tapasztalható gamma sugárzás hatására.

Korábban elsősorban metafázisos kromoszómákon végeztek vizsgálatokat, melyek alapján számos adat vált ismertté a kondenzált kromoszómák biokémiai és morfológiai változásairól. Az eukarióta DNS topológiai (harmadlagos) szerkezetére és magasabbrendű, kromoszomális

szerveződésére vonatkozó hipotézisek és modellek máig nem nyertek bizonyítást, a tényleges morfológiai struktúrái feltáratlanok maradtak. Ráadásul a metafázis időtartama a sejtciklusnak csupán mintegy 10%-át teszi ki, míg a kromoszómák kondenzálási és dekonzenzálsási folyamata az interfázisban történik. Munkacsoportunk az interfázisban zajló kromatin kondenzálási folyamatok vizsgálatára szakosodott és azok struktúráit írta le kezeletlen sejtekben és különböző genotoxikus kezelések után.

Feladatuk kaptam az interfázisos kromatin kondenzálás biokémiai és morfológiai változások feltárását. UVB, illetve UVA sugárzás, valamint egyéb genotoxikus ágensek, elsősorban nehézfémek hatását tanulmányoztam *in vitro* emlős és humán sejt vonalakon.

Célkitűzések

Célunk az UVB sugárzás hatására az interfázisos kromatin kondenzálás szintjén történő biokémiai és morfológiai változások bemutatása a K562 humán eritroleukémia sejtvonal segítségével, valamint az egyéb genotoxikus ágensek hatására kialakuló, a normálistól és egymástól eltérő struktúrák, apoptotikus jelenségek összevetése és rendszerezése:

§ UVB sugárzás hatására bekövetkező **biokémiai változások** vizsgálata permeabilizált K562 sejtekben:

- Reverzibilisen permeabilizált sejtek regenerálásának vizsgálata [³H]timidin és [³H]timidin-trifoszfát inkorporáció mérésével
- UVB kezelést követően a DNS szintézis helyreállításának vizsgálata a nukleozid inkorporáció mértéke alapján
- UVB sugárzás hatására kialakuló apoptózis vizsgálata
- UVB kezelést követően ATP dependens replikatív DNS szintézis és ATP independens repair DNS szintézis vizsgálata
- Az UVB kezelt majd szinkronizált sejtfrakció C érték (haploid genom tartalmának) meghatározása

§ UVB sugárzás hatására bekövetkező **morfológiai változások** tanulmányozása:

- A sejtciklus során az apoptotikus morfológia időbeli változásának vizsgálata szinkronizált sejtpopulációkon
- UVA és UVB sugárzás hatásának kromatinszerkezet szintjén történő összehasonlítása
- A gamma sugárzás által okozott kromatin változások összehasonlítása az UVB sugárzás okozta morfológiai módosulásokkal
- Hozzájárulás a kromatin károsodások genotoxikus „ujjlenyomatainak” rendszerezéséhez, egyéb toxikus ágensek okozta morfológiai mintázatok összehasonlítása alapján (gamma, UVA, UVB sugárzás, Cd, Hg, Pb, Ni)

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtvonalak, sejtenyésztés

A humán eritroleukémia K562 szuszpenziós sejtek eritroid és megakariocita irányba is differenciáltható leukémiás progenitorok, differenciálatlan granulocita sejtek, melyek a krónikus mieloid leukémia blasztos transzformációi. Luzzio & Luzzio által szabadalmaztatott immortalizált sejtvonal (1985 júl. 22.), melyet egy végső stádiumban lévő mielogén leukémiában szenvedő 53 éves nő pleurális folyadékából nyertek. A Philadelphia kromoszóma (t(9;22) transzlokáció) mellett még egy reciprok transzlokációt tartalmaz, amely a 15-ös kromoszóma hosszú karja és a 17 kromoszóma között jött létre. RPMI 1640 médiumban tartottuk fenn, kiegészítve 10% FBS-sel, valamint 50 U/ml penicillinnel és 50 µg/ml streptomycinnel.

Az egér pre-B 70Z/3-M8 adherens sejtvonal, az egér pre-B 70Z/3 stabilizált, pSVLM8p53 által transzfektált szubklónja. A tenyésztet 37 °C-on, 5% CO₂- és telített vízgőztartalom mellett, RPMI 1640 médiumban tartottuk fenn, kiegészítve 10% FBS-sel, 2µg/ml mikofenolsavval, 150 µg/ml xantinnal, 15 µg/ml hipoxantinnal, 2x10⁻⁵M β-merkaptotetanollal, valamint 50 U/ml penicillinnel és 50 µg/ml streptomycinnel.

Munkánk során a kínai hörcsög ovárium sejteket (CHO-K1, ATCC #CCL61) 37 °C-on, 5% CO₂ és 95% levegő vízgőzzel telített keverékében tenyésztettük, letapadó kultúra formájában. A sejtek fenntartása F-12/Ham médiumban történt 5 %-os hőkezelt FBS és 50 U/ml penicillin/streptomycin jelenlétében. A kromatin állomány kondenzálódásával kapcsolatos kísérletekben a CHO-K1 sejtkultúrához T sejtenyésztő edényeket használtunk. Az egér pre-B 70Z/3-M8 és a CHO-K1 sejteket a kísérletek elvégzése előtt 24 órával frissen passzáltuk.

UVA, UVB kezelés

Az UV kezelésekhez használt lámpák: Philips **UVB** TL 20W/01 RS keskeny frekvenciasávú, 280-320 nm hullámhossztartományban emittáló cső, illetve Philips **UVA** TLK 40W 10R, 365 nm-es cső. Az UVB kezelést megelőzően a sejteket, 15 órás logaritmikus növekedési fázis után, majd PBS-sel való átmosást követően, 2-25 J/m² közötti UVB (280-320 nm), UVA (365 nm) sugárzásnak tettük ki, 10⁷ sejt/ml sejtsűrűség mellett PBS-ben felvéve. A továbbiakban a kezelt sejteket 3 óráig RPMI 1640 tápfolyadékban, 10% FBS tartalom mellett regeneráltattuk.

Gamma sugárzás

A K562 szuszpenziós sejt kultúrát ^{60}Co gamma sugárzásnak tettük ki. A nagyenergiájú sugárforrással történő besugárzást az ATOMKI-ban végeztük. A sejteket a lehető legvékonyabb folyadék rétegben terítettük szét (2 mm) a sugárforrás alatt. A várható károsodások mértékéül szolgált az a sugárdózis (400 R, 4 Gy), melyet egér pre-B, és CHO sejtek besugárzásakor alkalmaztak korábban kooperációban, a Weizmann Intézetben. A sejteket 15 órán keresztül tenyésztettük, majd a 2.5×10^8 sűrűségű logaritmikus fázisban lévő tenyészetet a ^{60}Co forrással ellátott MDS Nordion Kanata, Ontario, Canada 150 sugármodellel kezeltük 90 rad/min ($\sim 0,9$ Gy/min, 0,9 Joule/kilogramm) dózisteljesítmény mellett. Minden kísérletben 400 R (~ 4 Gy) dózist alkalmaztunk. Besugárzás után a sejteket 2 óráig inkubáltuk a szinkronizálás megkezdéséig. Minden esetben párhuzamos kísérlet folyt kontroll (kezeletlen) sejtekkel.

Nehézfémmelkezelés

A higany-acetátot ($\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), nikkel-kloridot (NiCl_2), ólom-nitrátot ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$), kadmium-kloridot (CdCl_2) a Sigma-Aldrich Kft.-től rendeltük. A törzsoldatokat steril bidesztillált vízben 0.22 μm -es steril filteren átszűrve sterilizáltuk, és készítettük el a hígítási sorokat. Minden esetben párhuzamos kísérlet folyt kontroll sejtekkel. A 24 órás kezeléseket pedig logaritmikus fázisban lévő sejteken végeztük.

Sejtek szinkronizálása elutriálással

A sejtek nagysága és a DNS tartalma közötti összefüggés alapján a sejteket méretük szerint szinkronizálva frakciókra bontottuk. Az ugyanahhoz a frakcióhoz tartozó sejtek a sejtciklus azonos szakaszát képviselték. Az összes frakció a sejtciklus teljes spektrumát felölelte. A frakciók elkülönítése az ellenáramláson alapuló centrifugálásos elutriálás segítségével történt, mely eljárás méret szerint különíti el a sejteket, emelkedő folyadékáramlási sebességet vagy növekvő centrifugális erőt alkalmazva. Mi állandó centrifugális erő mellett az átáramoltatott folyadék sebességét növeltük. A sejtek növesztését követően 500 g centrifugális erővel, 5 percig, 5 °C-on centrifugáltuk, majd 1% FBS-tartalmú RPMI 1640 médiumba reszuszpendáltuk a 10^7 sejt/ml sűrűségűre beállított tenyészetet. Az elutriáló kamrába összesen 1.8×10^8 sejt/ml sejtet juttattunk. Az elutriáláshoz Beckman J-6 MI centrifugát használtunk, amely egy JE-5.0 elutriáló rendszerrel és egy Sanderson kamrával volt felszerelve (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA). A sejteket egy MasterFlex típusú

perisztaltikus pumpa (Cole-Parmer Instruments) segítségével juttattuk az elutriáló kamrába. Az elutriálást 20 °C-on végeztük, melynek során 20 frakciót gyűjtöttünk, egyenként 100 ml-es térfogatban. Az egymást követő frakciókat egyre növekvő áramlási sebesség mellett 1% FBS-t tartalmazó RPMI 1640 médiumba gyűjtöttük. A betöltést követő első frakciót, az elpusztult sejtek nagy aránya miatt nem vizsgáltuk. Az utolsó frakciókat (19-20.) a sejtek heterogenitása, aggregációja, és az alacsony sejtszám miatt ugyancsak nem használtuk fel. Az összes frakciót fénymikroszkópos rutinvizsgálattal ellenőriztük, valamint FACS analízisnek vetettük alá. A szétválasztást követően a sejteket átmostuk PBS-ben, és 10%-os FBS tartalmú RPMI 1640-ben reszuszpendáltuk, majd 3 órán át inkubáltuk. Az aggregálatlan sejtek mérete az egymást követő a frakciókban egyre nőtt. A sejtek számát, méretét, illetve térfogatát Coulter Multisizer, illetve Channelizer segítségével határoztuk meg. A sejtszámot Bürker-kamrás vizsgálat segítségével is ellenőriztük, valamint tripán-kék festéssel viabilitást is mértünk az összes frakcióban. Az összes vizsgálati módszert háromszor megismételtük és azonos eredményeket kaptunk.

A sejtciklus vizsgálata FACS analízissel

A sejteket megfestettük 0.1 M ammónium-citrátot és 50 µg/ml propidium-jodidot (Sigma) tartalmazó oldatban 15 percig, 0 °C-on jégen, majd egyenlő térfogatú 70 %-os metanol hozzáadásával fixáltuk. A sejteket FACS flow cytometer (Becton Dickinson) a CellQest (Becton Dickinson) software felhasználásával vizsgáltuk. A mag DNS tartalmát C értékben fejeztük ki (1 C érték a haploid genom tartalomnak felel meg). Az emlős sejtek DNS tartalma 2 C értékről (G₀/G1 fázis) 4 C értékre (G₂/GM fázis) gyarapodik az S fázis során. Az egyes frakciók C értékeit a flow citometriás profilokról készült grafikus ábrák megfelelő területeinek elemzése alapján számítottuk ki, majd minden frakció esetében a DNS tartalom átlagát vettük.

ATP dependens replikatív DNS szintézis a permeabilizált sejtekben

A sejteket (10⁶/ml) reverzibilisen permeabilizáltuk, majd *in vitro* DNS szintézist hajtottunk végre a replikáció szubsztrátjainak (dNTP) hozzáadásával. Ez a vizsgálat a K562 sejtek radioszenzitivitásának meghatározását szolgálta UVB besugárzást követően. Mivel a K562 sejtek radioszenzitivitása alapvetően alacsonyabb a sejtvonal ellenálló tulajdonságából fakadóan, így magasabb UVB dózisú kezelést (15, 25 J/m²) is alkalmaztunk. Az inkubációs keverék (100 µl) tartalmazott 100 mM, 7.8 pH-jú HEPES-t, 210 mM NaCl-ot, 15 mM ATP-t, 0.3 mM dATP-t, dGTP-t,

valamint dCTP-t, 0.01 mM dTTP-ot, [^3H]dTTP-ot (37 kBq, 3.03 TBq mmol/l), 5.8 mM dithiothreitol-t (DTT), 2 mM MgCl_2 -ot, illetve 0.2 mM CaCl_2 -ot. A 37 °C-on végzett 10 perces radioaktív izotópos nyomjelző kezelés után a DNS szintézist 1ml 5%-os triklórecetsav (TCA) oldat hozzáadásával állítottuk le. Miután a minták 1 órán át jégen álltak, a csapadékokat üvegszálas szűrőn (Glass Fiber Filter) keresztül mostuk át. A TCA-ban nem oldódó újonnan szintetizált DNS mennyiségét a permeábilis sejtekbe beépült radioaktív nukleotid alapján határoztuk meg.

[^3H]timidin bejutása a sejtekbe

Az ép permeabilizálatlan K562 sejteket ($10^6/\text{ml}$) 0.5 ml RPMI 1640 médiumban szuszpendáltuk, majd 37 kBq [^3H]timidin ($2.86 \text{ TBq mmol}^{-1}$) hozzáadásával 10 percig 37 °C-on inkubáltuk. A timidin nukleozid a timidin trifoszfát nukleotiddal szemben bejut az ép sejtekbe is és beépülése a DNS szintézis mértékeként szolgál. A reakciót a médiummal azonos térfogatú TCA hozzáadásával állítottuk le. Miután a minták 1 órát jégen álltak, a csapadékokat üvegszálas szűrőre vittük. TCA-val és abszolút alkohollal történt mosás után a sejtekbe felvett, TCA-ban nem oldódó radioaktivitás (beépült radioaktív nukleotid) szolgált a DNS szintézis mértékeként.

Kromatinszerkezetek izolálása

Reverzibilis permeabilizálás

Eredetileg ezt a metodikát a munkacsoportunk az egér limfociták reverzibilis permeabilizálására fejlesztette ki, melyet átdolgoztunk a humán K562 sejtvonalra. Röviden, 10^6 sejthez 1 ml hipotóniás puffert adtunk, dextrán T-150 jelenlétében, mely, mint egy molekuláris kabát védelmezi a sejtet a sejtmembrán felszakadásától, a sejt dezintegrálódásától. A permeabilizálást 2 percig alkalmaztuk 0 °C-on, majd a folyamatot a hipotóniás oldat lecserélésével szüntettük meg. A permeabilizálást követően a sejteket ($10^6/\text{ml}$) 10% FBS tartalmú tápfolyadékban regeneráltuk 3 óráig a sejtenyészésnek megfelelő körülményei között.

Sejtmagizolálás

Számításba véve a kromatin kondenzáció és a kromoszóma dekonzenzáció ciklikusan ismétlődő sajátosságát, a szinkronizált sejtpopulációkat, kolcemides kezelésnek vetettük alá, amely a sejtciklust metafázisban blokkolja. A $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ kolcemides kezelés 2 óráig 5% CO_2 -tartalmú 37 °C-os inkubátorban történt. Ezek után a PBS-sel átmostuk, majd 37 °C-on, 10 percig inkubáltuk a sejteket

Swelling pufferben. Ezután pedig a sejteket 500g-n 5 percig centrifugáltuk. A sejtmagokat rögzítő oldat cseppenkénti hozzáadása közben izoláltuk (methanol: jégecet=3:1), majd 500g-n 5 percig centrifugáltuk. Tiszta magpreparátum nyerése érdekében a rögzítő oldat hozzáadását kétszer megismételtük, végül 1 ml rögzítő oldatban vettük fel, és felhasználásig (1-2 hét) +4 °C-on tároltuk az izolált sejtmagokat. Coulter Multisizer segítségével határoztuk meg a sejtek, illetve a sejtmagok térfogatát és átmérőjét.

Kromatin preparálás

A preparálás során a metafázisos kromoszómákra alkalmazott metodika módosított változatát használtuk. A sejtmagokat körülbelül 30 cm-es távolságból cseppentettük ki tárgylemezre. Majd a minták egy éjszakán át szobahőmérsékleten száradtak. Másnap PBS-sel mostuk, majd felszálló alkoholsorozattal (70, 90, 95 and 100%) dehidratáltuk a mintákat.

Kromatin struktúrák fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata

Az izolált, majd dehidratált kromatinszerkezeteket tartalmazó tárgylemezre 35µl fakulás gátló (antifade) médiumot (propidium-jodid vagy DAPI tartalmú) pipettáztunk, majd lefedtük őket 24 x 50 mm-es fedőlemezzel. A festék által ilyen módon láthatóvá vált fluoreszkáló kromatinszerkezeteket Olympus AX70 típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk, XBO 150W/1 vagy HBO 150W/1 lámpa világítás mellett.

Adatok feldolgozása

A kísérleti adatok minimum három mérés átlag és szórás értékeit tartalmazzák. Az adatokat Student t-próbával értékeltük. A szignifikancia szintnek a $p=0.01$ vagy ennél kisebb értéket vettük. Az eredményeket középérték $\pm$ standard deviációban fejeztük ki.

Hosszútávú in vitro mikroszkópia (Time lapse microscopy)

A sejtek viselkedésének vizsgálatát, a celluláris etológiát, a tanszéken létrehozott nagy időbeli felbontású mikroszkópos rendszer tette lehetővé. Ez a technológia nem más, mint egy CO₂ inkubátorba telepített nagy érzékenységgű kétkamerás rendszer, melyek inverz fénymikroszkópokhoz csatlakoznak, így a kontroll és a kezelt minták egyidejű megfigyelésére nyílik lehetőség standard (a sejtenyésztésnek megfelelő) körülmények között. A megvilágítás hő- és fototoxicitása minimálisra

csökkentett. A kamerán található hideg fehér fényt kibocsátó LED szinkronizálva van a sejt kultúráról készült képek időperiódusaival. A sejt kultúrák T25 tenyésztőedényeik a mikroszkópok alatt maradnak a vizsgálat teljes ideje alatt. Megosztott képernyőn percenkénti frissítésben (a képek mentése mellett) nyomonkövethető a kontroll és a minta tenyészet egyedi sejtjeinek mozgása és lépésről lépésre követhető morfológiai változásaik. Az exponálási időpontokat valamennyi felvételen feltüntettük. A képsorozatokból 30 kép/mp sebességű videófilm készül. A szuszpenzióból kiválasztott egyedi sejtek segítségével a celluláris etológia szempontjából nyomon követhetjük a sejtek kórtörténetét, és „családfájukat”, a sejtosztódásuk gyakoriságát, a képződött leánysejtek viselkedését, illetve elemezhetjük, kategorizálhatjuk és kvantifikálhatjuk a genotoxikus ágensek által okozott sejthalálformákat. A rendszer további előnye, hogy a több napos folyamat internet segítségével távoli, akár otthoni elérést is lehetővé tesz.

3. EREDMÉNYEK

Korábban számos vizsgálathoz használtak nukleozidokat (pl. timidin, uridin), a kezeletlen sejtekben és sejtmagokban folyó aktív transzport folyamatok egymást követő lépéseinek megismerése érdekében. Eredetileg baktériumokban írták le, hogy a permeabilizált sejtekben történő DNS szintézis ATP jelenlétében hasonló a kezeletlen sejtek replikatív DNS szintéziséhez. Munkacsoportunk korábban leírta, hogy permeabilis timociták sejtmagvaiban a 4 deoxiribonukleozid trifoszfát (dNTPs) ATP dependens inkorporációja replikatív mechanizmus szerint történik. A DNS replikáció, annak inhibitorai révén gátolható, míg ATP hiányában a DNS építőköveinek összekapcsolódása repair szintézist tükröz. Ezek az előzmények segítséget nyújtottak abban, hogy a reverzibilisen permeabilizált K562 sejtekben is követni tudjuk a DNS szintézis 2 típusát.

A reverzibilisen permeabilizált sejtek életképességének vizsgálata

A kezeletlen sejtek életképességét tripán-kék festék kizárása alapján ellenőriztük. A kísérlet elején a kezeletlen sejtek kevesebb, mint 2%-a vette fel a tripán-kék festékmolekulákat. 10 órás növekedési idő elteltével a sejtek manipulációjának betudhatóan - ugyanabban a populációban - is csak körülbelül 5%-kal csökkent az élő sejtek száma. Viszont a humán eritroleukémia K562 sejteket 4.5% dextrán T-150 tartalmú hipotóniás pufferrel történt permeabilizálása után – a korábbi más sejteken történt vizsgálatoknak megfelelően - a sejtek 95%-a 5 percen belül felvette a tripán-kék festéket.

Ezzel egy időben mértük a permeabilizált sejtekben a radioaktív [^3H]timidin és [^3H]timidin-trifoszfát beépülését is. Az értékeket a kezeletlen sejtek százalékban fejeztük ki. A sejtek regenerálódásának ütemét követve azt tapasztaltuk, hogy a folyamat kezdetén a reverzibilis permeabilizálás sebessége gyors volt, majd 4 óra elteltével csökkent. A permeabilis sejtek, melyek eredetileg nem képesek felvenni a [^3H]timidint, az idő előrehaladtával fokozatosan kezdték felvenni a radioaktív nukleozidot a permeabilitás mértékének csökkenésével. Megközelítőleg 10 óra elteltével a sejtek visszanyerték integritásuk 80%-át. Ezzel a folyamattal egy időben egy ellenkező tendencia volt megfigyelhető a [^3H]timidin-trifoszfát felvételének regisztrálásakor. A permeabilizált sejtek fokozatosan veszítették el a 4 deoxiribonukleotidot (dNTPs), beleértve a [^3H]dTTP felvételének képességét, melyek csak permeabilis sejtbe képesek inkorporálódni.

UVB sugárzást követő flow citometriás analízis

Az exponenciálisan növekvő K562 sejtpopulációt növekvő dózisú ($6-24 \text{ J/m}^2$) UVB sugárzásnak tettük ki. A sejteket ezután 3 órás regenerációs időre visszahelyeztük az 5% CO_2 -tartalmú 95% relatív nedvességtartalmú, 37°C -os inkubátorba. A kisméretű apoptotikus sejtek hiánya, azt mutatja, hogy a sugárzást követően ez alatt a kis idő alatt nem következik be apoptózis. Tartósabb inkubálást (24 h) követően viszont már jelentősen megnövekszik az apoptotikus sejtek száma.

A nukleozid inkorporáció helyreállása a sugárzást követően

A K562 sejteket növekvő dózisú UVB sugárzásnak tettük ki ($2-25 \text{ J/m}^2$). Megmértük a [^3H]timidin inkorporációját ép és kezeletlen sejtekben és sugárzás után is. Ez alapján, az alacsony dózissal (2 és 5 J/m^2) kezelt sejtek DNS szintézisének mértéke fokozatos regenerációt mutatott 3 órával a kezelést követően. A magasabb dózisú UVB sugárzás (15 J/m^2) után részleges (80%) regenerálódás történt. Míg azok a sejtek, amelyek a legmagasabb dózisú sugárzásnak lettek kitéve (25 J/m^2), nem voltak képesek helyreállítani a DNS szintetizáló képességüket.

Az UVB sugárzás hatása a replikatív és a repair DNS szintézisre a permeabilis sejtekben

Korábbi tanulmányban leírtak alapján, körülbelül a fibroblaszt sejtek 60%-ában gátlódott a DNS-szintézis mértéke, 5.2 J/m^2 dózisú, 254 nm hullámhosszú UV sugárzást követően. A kezelési dózis függvényében meghatározható a K562 sejtek sugárérzékenysége, amely magasabb dózisú sugárzás alkalmazása esetén kisebb volt, más sejtekhez viszonyítva, vagyis a K562 sejteknek az átlagosnál kisebb az UV sugárérzékenységük. Jelen tanulmányban, exponenciálisan növekvő K562 sejteket (10^6), melyek kezdeti denzitása $10^5/\text{ml}$ volt, 15 J/m^2 dózisú, 280 nm hullámhosszúságú ultraviola sugárzásnak tettük ki.

A sejteket a kezelést megelőzően permeabilizáltuk. A komplett inkubációs keverék tartalmazta a DNS szintézishez szükséges négy dezoxiribonukleozidot és ATP-t. A nukletidok közül a dTTP radioaktív jelölést tartalmazott. A $-d\text{ATP}$, $-d\text{GTP}$, $-d\text{CTP}$ jelölés arra utal, hogy a DNS szintézis e három szubsztrátját nem adtuk az inkubációs elegyhez.

1mM novobiocin hozzáadása mellett az ATP dependens DNS szintézis maximális gátoltsága kezeletlen sejtek esetében $2.0 \pm 0.2\%$ -ra, kezelt sejteknél $1.7 \pm 0.2\%$ -ra csökkent, vagyis a repair szintézis is bénult. A novobiocin az ATP szintézis mechanizmusát szakítja félbe, az ATP deplécióját okozza azzal, hogy tönkreteszi a mitokondriális szerkezetet. Ezt a mértékű gátoltságot sem a dNTP-k

megvonása (8.6 ± 1.1), sem az UVB sugárzás hatása (9.2 ± 1.2) nem múlta felül. Permeábilis sejtekben a replikációs DNS szintézis biztosítása érdekében ATP-re is szükség van. Ennek hiányában replikatív DNS szintézis nem folyik a sejtekben csak hibajavító, repair szintézis.

A kezelést 3 órás inkubálás követte, majd a sejteket permeabilizáltuk, és az ATP dependens replikatív DNS szintézis 65%-os gátlását mértük. A repair szintézis mérése permeábilis sejtekben ehhez hasonlóan történt azzal a különbséggel, hogy az inkubációs keverék ATP-t nem tartalmazott. A permeábilis sejtekben, melyek nem lettek sugárkezelésnek alávetve, teljes DNS és repair DNS szintézis aránya ($5:1 = 100\%:19.7 \pm 2.6\%$). Az UVB sugárzást követően az ATP independens repair szintézis és a teljes DNS szintézis közel azonos mértékű volt ($35.2 \pm 3.6\% \approx 31.6 \pm 3.4\%$). Ez az összefüggés világosan jelzi, hogy az UVB sugárzás a replikációt csaknem teljesen blokkolja, és a sejtek összes ATP készlete repair DNS szintézisre fordítódik.

A sejtciklus analízise ép és sugárkezelt sejtekben

A kezeletlen sejtek összes frakciójánál az átlagos DNS tartalom számításához a flow citométeres profil szolgált alapul. Az exponenciálisan növekvő kezeletlen sejtek szinkronizált frakcióiban a DNS tartalom 2.07-ről 3.88 C-értékre nőtt. A besugárzott sejtek (24 J/m^2) flow citométeres ábráit is kiértékeltek, ám a C értékeik nem voltak meghatározhatók, a sejtek DNS-e által felvett fluoreszcens festék eltérő megoszlásának köszönhetően. Az UVB kezelt sejtek frakcióinak becsült C értékei 2.2 és 2.4 C-értékek közé estek.

Kezeletlen és UVB sugárzásnak kitett sejtek frakcióinak kromatin szerkezete

Amíg a kontroll populációk C értéke folyamatosan növekedik, az S fázis végére megduplázódik, valamint a DNS az S fázis végére jelentős kompaktságot ér el, addig az UVB sugárzás a kondenzálódást az S fázis korai szakaszában blokkolja. Ez az UVB sugárzásnak a DNS-re gyakorolt hatásával, timin dimerek kialakulásával és lánctörésekkel magyarázható. A DNS-ben bekövetkező lánctörések meggátolják a kondenzálódás további folyamatát, illetve a sejtciklus későbbi szakaszában lévő (középső és kései S fázis) kondenzáltabb formák körül is fátyolszerű képletet alkotó burok veszi körbe a struktúrákat.

A kezeletlen sejtek interfázisos kromatin szerkezete

A reverzibilis permeabilizálásnak köszönhetően, a sejtmagból kiszabadult kromatin szerkezetek könnyen vizsgálhatók.

A kontroll sejtek vizsgálata: (a) permeabilizálatlan, (b) permeabilizálás után, regenerálás nélküli sejtekből izolált kromatin szerkezetek, c) permeabilizált és regenerált sejtek nukleuszából izolált kromatin struktúrák.

a) Permeabilizálatlan sejtekből két alapvető nukleáris struktúra izolálható: interfázisos sejtmag és metafázisos kromoszóma. Mindkettő ismert. Külön nem vizsgáltuk.

b) Permeabilizálás után, ha a regenerálási lépés elmarad, ragadós alaktalan kromatin massa alakul ki, melyet szintén nem vizsgáltunk.

c) Reverzibilis permeabilizálás után a kromatin szerkezetek láthatóvá váltak. A továbbiakban csak ezekkel foglalkozunk.

Kontroll sejtek reverzibilis permeabilizálását követően a szinkronizált frakciókból (2.0-tól 3.88 C értékig) a kromatin szerkezetek formájának fokozatos változását láttuk fluoreszcens mikroszkóp alatt. Az 1. és 2. frakcióban nagyrészt dekonzenzált kromatin állományt, mikroszkóposan felhő- vagy fátyolszerű képet láthatunk. A 3. és 4. frakcióra jellemző, hogy a sejtek kissé polarizáltak, megnyúlt vagy ovális formát öltenek. A továbbiakban a megnyúlt kromatin fokozatosan szupertekercselődik, szalagszerű csavart formát alkotva, melyet az 5. és 6. frakcióban láthatunk. A 7. és 8. frakcióban a fibrilláris szerkezet fibrózus formát ölt, illetve megfigyelhető egy lineáris folytonosság a korai dekonzenzálatlan kromoszómák között a 9. és 10. frakcióban. A szupertekercselt formájú kromatin testekre, mint a később kialakuló kromoszómák előhírnökeire tekinthetünk. Ezeket a gyűrűs, kondenzálódó kromatin szerkezeteket a 11-12. frakcióban láthatjuk legelőször, a sejtciklus S fázisának közepétől. A maganyag folytonossága megmarad a hajlott kromoszómális formákban is, amelyet megfigyelhetünk a 13. és 14. frakcióban. A hajtott formát a lineáris kromoszóma szerkezet kialakulása követi, mely még nem éri el a metafázisos kromoszómák tömörségét (15-16. frakció).

Kromatin-szerkezet változások UVB sugárzás után

A kromatin változások alacsonyabb UVB dózis (2, 6, 12 J/m²) esetében csak esetenként alakulnak ki, és ritka előfordulásuk miatt, nem lehet őket megjeleníteni. Magas UVB dózis esetén (24 J/m²) főleg úgy jelenik meg, mint egy fibrózus felhőszerű képződmény a kondenzálódó kromatin struktúra körül. Az S fázis korai szakaszában megjelenő fibrilláris szerkezetek jóval

dekondenzáltabbak, mint a kezeletlen sejtek esetében, illetve a kromatin polarizálódása hamarabb elkezdődik, ugyanazt a frakciót nézve (1-2. frakció). Az elongált kromatin formák korábban megjelennek (3-4. frakció), ám a további elongáció gátoltnak tűnik (5-6. frakció). Az 5. frakcióban látható kromatin szerkezetet egy finom fibrilláris háló borítja. Kisméretű apoptotikus testek ritkán fordultak elő (9-10. frakció), de a gamma sugárzással ellentétben, ezek nem az UVB sugárzás hatásának tipikus struktúrái. Az UVB sugárzást követően sem a kromatin testek, sem egyéb tipikus kromatin szerkezetek nem voltak megfigyelhetők. Láthattuk a kondenzálási folyamat primitív, korai fázisait, amelyben előforduló formák halvány fibrilláris szerkezettel rendelkeztek. A kromatin szerkezet viszont sehol sem érte el a látható kromoszómák stádiumát (11-16. frakciók).

A kromatin kondenzálásának végső stádiuma

Összehasonlítottuk a kezelt és kezeletlen sejtekből származó, az utolsó elutriálási frakció (18. frakció) kromatin szerkezeteinek propidium-jodiddal megfestett fluoreszcens képeit. A kezeletlen sejteknél a 18. frakcióban a kromatin kondenzálása elérte a végső stádiumot, olykor a metafázist is. UVB sugárzást követően viszont (24 J/m^2), csak a kromoszómák részleges szegregációját lehetett megfigyelni, valamint teljesen kondenzált kromoszómák nem voltak láthatók.

A halvány fibrilláris hálószerű szerkezet, mely körülveszi a tökéletlenül összezsomagolódott primitív kromoszómakezdeményt, feltételezhető, hogy megakadályozza a kondenzálódás folyamatát.

Az UVB és UVA sugárzás okozta elváltozások összevetése

Az UVB sugárzással végzett kísérlet eredményeihez hasonlóan azt tapasztaltuk, hogy az UVA sugárzás gátló hatásának mértéke a besugárzott időtartamtól függ. 25 J/m^2 alatti dózis esetén (3, 6, $12,5 \text{ J/m}^2$), kezdetben a sugárzás a DNS szintézis sebességét csökkenti, ezáltal a sejtciklusra kifejtett részleges gátló hatása érvényesült, amiből a sejtek többsége képes volt regenerálódni.

A DNS repair mechanizmusa, ha csak részlegesen is, de képes a DNS károsodást helyreállítani. A kromatinszerkezetek elemzése során apoptotikus testek előfordulása nem volt jellemző. Ezzel szemben a magas dózisu (25 J/m^2) sugárzást követően a K562 sejtek már nem képesek regenerálódni, és vélhetően apoptózist szenvednek. Ebből arra következtethetünk, hogy a rövid időtartamú expozíciók, illetve az alacsony koncentrációjú genotoxikus ágensek késleltetett apoptotikus halált okoznak. Feltételezésünk szerint alacsony genotoxikus ártalom az apoptózis kialakulásának időtartamát megnyújtja. A fentiek alapján elmondható, hogy az UVB és az UVA

hullámhossztartományok által kifejtett különböző dózisok hatása hasonló eredményhez vezet. Érdekes módon a nagyobb hullámhossztartományba eső, de gyengébb UVA sugárzás már alacsonyabb dózisban is érzékelhető morfológiai elváltozásokat eredményezett, szemben az UVB sugárzással. Ennek hátterében az a repair rendszer állhat, mely első sorban az UVB károsodások javításáért felelős.

A munkacsoport távlati célja az UVA és az UVB sugarak által gyakorolt szinergista hatásnak a bőr rák kifejlődésében és a kromoszóma kondenzációban játszott szerepének tisztázása.

A γ - és az UVB sugárzás okozta elváltozások összehasonlítása

A γ -sugárzást követően a K562 sejtekben a következő preapoptotikus változásokat tapasztaltuk: (a) A sejtmag és a sejt mérete növekedett. (b) Az összes frakcióban alacsonyabb volt a sejtek DNS tartalma, amely abból következik, hogy (c) a sejtciklus folyamata a korai S fázisban megrekedt. (d) A kondenzáció folyamata a fibrilláris kromatin kialakulásának fázisa és a prekondenzált megnyúlt kromoszomális forma fázisa között gátlódott. (e) Az apoptotikus sejtek száma és mérete fordított arányosságot mutat a sejtciklus előrehaladtával. A korai S fázisra jellemző sok apró apoptotikus test, valamint kevesebb, ám nagyobb méretű apoptotikus testek találhatók a kései S fázisban, mely megfigyelés összefüggésbe hozható azzal a ténnyel, amely szerint a kromoszóma szerkezet a metafázisos kromoszómák esetében a legsűrűbb állományú, ezáltal az ionizáló sugárzás a DNS-ben kevesebb lánc töréshez vezet. Egér pre-B sejtekkel végzett korábbi kutatási eredményeket megerősítve, hasonló eredményeket kaptunk a gamma sugárzást követően, CHO sejtekkel végzett kísérlet során is.

Kondenzációs ujjlenyomat (fingerprint)

Korábbi kísérletek eredményeire alapozva tovább bővítettük a hatásvizsgálatok palettáját mind sejt típus, mind genotoxikus ágenstípus szempontjából, melyeket a teljesség igénye nélkül mutatok be a következőkben. Ezek alapján szerkezeti elváltozások voltak megfigyelhetők interfázisos CHO, K562, egér pre-B sejtekben, különböző genotoxikus hatások, mint a gamma sugárzás, UVA sugárzás, nehézfémek (kadmium-nitrát, ólom-nitrát, nikkel-klorid, higany-acetát), illetve különböző kemikáliák, mint koffein, nikotinsav-klorid, ethidium-bromid, aktinomicin hatására (melyeket jelen disszertációban nem taglalok), mely változások apoptózishoz vezettek. Minden esetben azonos 1×10^6 /ml sejt denzitással, logaritmikus fázisban lévő sejtpopulációkkal dolgoztunk, illetve azonos körülmények között végeztük a kísérleteket, amelyet az Anyagok és módszerek c. fejezet részletesen leír.

Kadmium-klorid (CdCl_2)

A 1 μM kadmium-kloridos kezelést követően szinkronizált CHO, illetve egér pre-B sejtek esetében is a jellemző morfológiai elváltozás a nagyméretű lyukak kialakulása a sejtmembránon. Részletesen a CHO sejtek módosult kondenzációs sémáját taglalom.

Már az S fázis korai szakaszában megfigyelhetők az apoptotikus testek, amelyek prekondenzált kromoszómákhoz hasonló morfológiát mutatnak (2-3. frakció). A kezeletlen sejtektől eltérően jól látható a polarizálatlan maganyag kilökődése a sejtmagból. Az S fázis korai középső szakaszára jellemző, hogy a fátyolos szerkezetű kromatin, illetve a kilökődött polarizált kromatin, valamint a szupertekercselt szálak kialakulásának hiánya megakadályozza a sejtciklusnak ebben a szakaszában jellemző kondenzált kromatin testek kialakulását (4. frakció). Az 5. frakcióban a kromatin szálak és kromatin testek kialakulása látható az S fázis középső szakaszában, amely megfelel a normális intermediereknek ebben a fázisban. Ezzel szemben a fibrilláris kromatin a korábbi stádium jellemző intermediere.

Az S fázis kései szakaszában az elutriálás 6., 7. és 8. frakciójában növekvő méretű és számú lyukak figyelhetők meg a kromatinban. A 6. frakcióban a kromatinállomány szétesése, a nukleuszon kisméretű lyukak és azon keresztül a maganyag kilökődése, valamint elongált kromoszómakezdemények láthatóak. A 7. frakcióban kilökődött kromatin testek, nagyméretű extranukleáris perikromatikus granulumok, megnyúlt sejmagok figyelhetők meg. A 8. frakcióban jellemző a széttöredezett magmembrán nagyméretű lyukakkal, megnyúlt kromoszómaformák ragadós elongált kromoszómák. Ezeket az eredményeket figyelembe véve további toxikus ágensek által okozott morfológiai változások vizsgálatát végeztük el.

A kadmium-klorid kromatin szintű hatására bekövetkező elváltozások különböző sejttypuson is azonosak voltak. Ebből arra következtettünk, hogy egyéb toxikus anyagoknak is lehetnek specifikus kromatotoxikus bélyegei. A további vizsgálatok fényt derítettek, arra, hogy a genotoxikus ágenseknek vannak hasonló károsodásokat indukáló hatása, mint a denzitás növekedése, vagy éppen az ellenkezője, a dezintegrálódás, depolarizálódás, a magállomány kilökődése, valamint a nukleusz membránjának felszakadása. Ám megfigyelhetők különbségek is, amelyek az adott ágensre jellemző mintázatot adnak.

Higany-acetát ($\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$)

A humán K562 sejteket 1.2×10^6 denzitás mellett, 25 ml térfogtú tenyésztőedényben, 37 °C-on, 5%-os CO_2 inkubátorban vizsgáltuk 24 órás kezelés alatt, a kontroll tenyészet egyidejű megfigyelése

mellett, ahol a Long Term Scanning rendszer segítségével folytattuk a sejtek etológiai vizsgálatát 10, 50, 100, 150, 200 és 1000 μM -os koncentrációjú Hg(II) -acetát jelenlétében. Az ágens koncentrációjával arányosan, a sejtek 52, 56, 63, 78, 85, valamint több mint 99 %-a pusztult el. Szubtoxikusnak az 1 μM és az alatti koncentráció tekinthető, ahol nem észelhető csökkenés a sejtek életképességében. Egyedi sejteket vizsgálva, a 10 μM -os kezelést követően, osztódás közben kialakuló apoptotikus haláltánc jelensége figyelhető meg, mely HaCaT sejtek ólom kezelésére emlékeztetett. Jelentős eltérést a többi nehézfém kezeléshez képest az jelentette, hogy Hg(II) -acetát hatására már a 45. perc után leállt a sejtek mozgása. Az apoptotikus folyamat 10 μM higany-acetát hatására már 15 percen belül bekövetkezik, míg a nekrosis jelenségét 100 μM -os kezelésnél tapasztaltuk, ahol a sejtek a nekrosisnak megfelelően hatalmas méreteket öltenek. Ennél a koncentrációnál a sejtmozgás hiánya szembeszökő.

A továbbiakban, a Hg(II) -acetát kezelést követően, megvizsgáltuk a kromatin kondenzálás struktúrális szerveződésének a kontrolltól való sajátos eltéréseit. A hosszú távú megfigyelés alapján a szubtoxikus 1 μM -os kezelés kromatin szinten befolyásolja a denzitás mértékét, amely a képeken erősen polarizált fluoreszcens kromatin mintázatok formájában tűnik fel, és a DNS állomány polarizáltságára utal. A mikroszkópos felvételeken fibrilláris háló vonja be a kromatin szerkezeteket. A kromatin elváltozások érzékenységét mutatja, hogy míg más módszerekkel az 1 μM -os Hg(II) -acetát koncentráció még szubtoxikusnak mutatkozott, kromatin szinten már megjelent a toxikus hatás. Az alacsony koncentrációjú (10-50 μM) kezelések 3 fokozatosan súlyosbodó apoptotikus elváltozásokat okoznak, a; a kromatin polarizálódása és lyukak megjelenése a nukleusz membránján, b; a kromatin felbomlása és c; apoptotikus testek kialakulása. Az apoptotikus testek összefüggésben állnak a sejtciklus státuszával. Az S fázis korai szakaszában sok kisméretű dekonzenzált, míg a kései szakaszában kevesebb nagyobb méretű, ám kondenzáltabb forma figyelhető meg. 100 μM felett a nekrotikus hatás jellemző. Megfigyelhető nagyméretű lyukak képződése a sejtmagon belül. Hg(II) -acetát hatására - a kadmium kezeléssel szemben - a nukleusz nem esik szét darabokra. A magmembrán szétnyílása nyilvánvalóvá teszi, hogy a kromatin folyamatos struktúrát képez, és két véggel rendelkezik, a korábbi megfigyeléseknek megfelelően. Esetenként sok apró, azonos méretű részecskére esik szét a sejtmag. Az azonos apró méret nem jellemző az apoptotikus testekre, inkább a kromoszóma-szerveződés kisebb egységeire utal. A dezintegráció ellenére, valószínűleg a ragadós kromatinnak köszönhetően a megnagyobbodott sejtmag kerek formája felismerhető.

A kadmium-klorid és a Hg(II) -acetát kezelést követő elváltozások közötti hasonlóság a nagyméretű repedések képződése a nukleusz membránján. A hasonlóság ellenére a kadmium-klorid

által okozott merev szakadások könnyen megkülönböztethetőek a Hg(II)-acetát okozta, lekerekített szabályos lyukaktól.

Ólom-nitrát ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)

A 2-40 μM koncentrációjú ólom-nitráttal kezelt K562 sejtekre jellemző, hogy 2 és 5 μM -os kezelést követően, az S fázis korai szakaszában tömör, köríves, szalagos kromatin formák jelennek meg. Az S fázis középső szakaszában fibrózus kromatin, vékony és vastag kromatin szálak figyelhetők meg. A kései S fázis és M fázisában a sejtmagméret megnagyobbodása jellemző, amely rendellenes sejtosztódáshoz és kromatin kondenzáláshoz vezet. Látható továbbá felszakadt magmembrán, a maganyag kiszabadulása, nagyméretű extracelluláris perikromatikus granulumok, illetve elongált prekromoszómák jelenléte (2 μM , 5 μM). A 10, 20 és 40 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ kezelést követően, megfigyelhetünk az S fázis korai szakaszában apoptotikus testeket, az S fázis középső szakaszában kilökődött kromatin szálakat, prekondenzált kromoszómákat (20 μM), valamint ragadós jellegüknél fogva összetapadt sejtmagokat (40 μM).

A kromatin kerek, polarizált, sűrű, erősen fluoreszcens marginális foltjai megkülönböztető jegyek az ólom-nitrát okozta elváltozásokban. Ezek a polarizált formák a kromatin prekromoszómális egységei lehetnek. 10 μM feletti koncentrációknál a magállomány kilökődése gyakori jelenség.

Nikkel-klorid (NiCl_2)

1-50 μM nikkel-kloriddal kezelt K562 sejtekre jellemző, hogy már 1 μM esetében zavart okoz a szupertekercselésben (b, d), a szalagszerű kromatin szerkezetet is torzítja és apoptózist indukál. 5 μM -nál az interfázisos kromatin kilökődése már megfigyelhető. A korai fátyolos szerkezetek jelenléte, a kondenzálás folyamatának nikkel-klorid okozta gátlásával magyarázható. Már ennél a kis koncentrációnál is megfigyelhető a preapoptotikus forma. 10 μM -nál a maganyag kilökődése, illetve apoptotikus testek jelenléte általánosan jellemző jelenség. Nagy polarizáltságú tömör állomány, illetve a felhőszerű dekonkondenzálatlan formák egyidejűleg jelennek meg. 50 μM esetében a meghatározó forma a nekrotikus megnagyobbodott sejtmag.

További kísérleteket végeztünk egyéb vegyületekkel (nikotinsav-klorid, koffein, aktinomicin, ethidium-bromid), melyek eredményei nem képezik jelen disszertáció tárgyát.

Celluláris etológiai és életképesség vizsgálat LTS módszerrel (higany-acetát, ólom-nitrát, nikkel-klorid)

1×10^6 sejtdenzitás mellett növekvő koncentrációjú nehézfém kezeléseket végeztünk, kontroll tenyésztettel párhuzamosan. A vizsgálat 24 órás megfigyelése alatt percenként készültek felvételek a tenyészetekről. A képekből 30 kép/mp sebességű videófilm készült, majd a szuszpenzióból kiválasztott egyedi sejtek segítségével a celluláris etológia szempontjából nyomon követhettük a sejtek viselkedését. Minden esetben a nehézfém koncentráció emelkedésével a sejtnövekedés gátlása figyelhető meg, a sejtmembránok degenerálódnak, és különböző morfológiai formában jelentkező apoptózis figyelhető meg a kultúrákban.

Egyéb eltérések:

1. Ólom-nitrát: Az eltérő eredmények egyike az, hogy kezdeti kisebb koncentrációjánál átmeneti sejtosztódás növekedést indukált, majd később gátlás és a letális hatás is jól mérhető.

2. Higany-acetát: A nikkel és az ólom esetében apoptózissal létrejött sejttörmelékek és bomlástermékek eliminálódtak, illetve azokat a környező sejtek felvették, addig a higannyal kezelt sejteknél az elhalt sejtek is láthatóak maradtak, ami a higany hatékony, bénító, fixáló hatásával magyarázható.

3. Nikkel-klorid: A kezelést követően a tenyészetekben aktívabb sejtmozgást tapasztaltunk, a kontroll és a másik két nehézfémrel kezelt tenyészetek mozgásához képest. Ennek a jelenségnek a molekuláris hátterét nem ismerjük.

A sejtek életképesség-vizsgálatának statisztikai elemzése során szintén eltérő eredményeket kaptunk. Kontroll sejtek esetében a kiindulási sejtszámhoz képest 24 óra elteltével megduplázódott az élő sejtek száma. Az általunk vizsgált legkisebb higany koncentrációban 75%-os volt a keletkezett élő sejtek aránya, viszont már ennél az alacsony koncentrációnál a pusztulás mértéke viszonylag magas, 37%. Az általunk vizsgált legnagyobb koncentrációban élő sejtet már nem tudtunk megszámolni, itt a letalitás mértéke 100%. Nikkel-klorid esetében is hasonló a jelenséget tapasztaltunk a legkisebb toxikus koncentrációt illetően, mint az $1 \mu\text{M}$ -os Hg(II) -acetátnál. Itt is 75%-kal nőtt az élő sejtek száma a kiinduláshoz képest, a sejtpusztulás mértéke itt 27%. Ólom-nitrát esetében látható hogy az $1 \mu\text{M}$ -os koncentrációban a kiindulási sejtszámhoz képest 24 óra elteltével körülbelül 2.5x-re nőtt az élő sejtek száma. A sejtpusztulás mértéke pedig hasonló tendenciát mutatott, mint a kontroll sejtek esetében. A legnagyobb koncentrációban viszont a letalitás mértéke nagyobb (41%), mint a keletkezett élő sejtek számának aránya (18%).

4. MEGBESZÉLÉS

1. A biokémiai kísérletek célja az volt, hogy bebizonyítsuk:

(a) **A reverzibilis permeabilizálás jelentősen nem befolyásolja a sejtek viabilitását és a permeabilis K562 sejtekben folyó DNS szintézis egy ATP dependens replikatív folyamat.** A humán eritroleukémia K562 sejteket 4.5% dextrán T-150 tartalmú hipotóniás pufferrel permeabilizáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a folyamat kezdetén a membrán regenerálódásának sebessége gyors volt, majd 4 óra elteltével csökkent, a sejtek viabilitása fokozatosan megközelítette a kontroll sejtek értékét. A permeabilis sejtek, melyek eredetileg nem képesek felvenni a [³H]timidint, a regenerálódás előrehaladtával fokozatosan kezdték felvenni a radioaktív nukleozidot. Megközelítőleg 10 óra elteltével a sejtek 80%-a visszanyerte integritását. Ezzel a folyamattal egy időben egy ellenkező tendencia volt megfigyelhető a [³H]timidin-trifoszfát nukleotid felvételének regisztrálásakor. A permeabilizált sejtek fokozatosan veszítették el a 4 deoxyribonukleotid (dNTPs), beleértve a [³H]dTTP felvételének képességét, melyeket csak permeabilis sejtek képesek felvenni és beépíteni a szintetizálódó DNS-be. A vizsgálattal a reverzibilis permeabilizálás hatékonyságát ellenőriztük a DNS szintézis mérésével, és ebből a sejt életképességére vonatkozó következtetéseket vontunk le. Korábban, permeabilizált egér limfocita sejtmembrán integritásának helyreállása scanning elektronmikroszkópos felvételekkel is megerősítést nyert. Mivel a kísérlet többszöri megismétlése után is a sejtek visszanyerték integritásukat, így ez a módszer alkalmasnak bizonyult nem csak a DNS szintézis, hanem a kromatin szerkezetek vizsgálatára is, mivel ezeknek a sejteknek a sejtmagja a sejtciklus bármelyik fázisában felnyitható volt, és a kromatin szerkezetek láthatóvá váltak.

(b) **Az UVB sugárzás gátolja a replikatív DNS szintézist, míg a DNS repairt aktiválja.** Rövid időtartamú expozíciók, illetve az alacsony koncentrációjú genotoxikus ágensek késleltetett apoptotikus halált okoznak. Az UVB sugárzást követően a teljes DNS szintézis és az ATP independens repair szintézis közel azonos mértékű volt ($35.2 \pm 3.6\% \approx 31.6 \pm 3.4\%$), ami arra enged következtetni, hogy az UVB kezelés DNS repairt indukált. Az ATP dependens replikatív szintézis és az ATP independens repair szintézis közötti összefüggés világosan jelzi, hogy az UV sugárzás a replikációt blokkolja és a mért nukleotid inkorporáció kizárólag a repair szintézisnek tulajdonítható.

(c) **Az UVB sugárzást követő flow citometriás analízis kisméretű apoptotikus sejtek hiányát mutatja,** vagyis a sugárzást követően ez alatt a kis idő alatt nem következik be apoptózis. Tartósabb inkubálást (24 h) követően viszont már jelentősen megnövekszik az apoptotikus sejtek száma.

(d) A sejtciklus analízise során exponenciálisan növekvő szinkronizált kontroll sejteknél, az átlagos DNS tartalom 2.07-ről 3.88 C-értékre nőtt. Korábbi tanulmányban leírták, hogy a G1 és G2 stádiumban lévő sejtek sejtciklusát az UVB sugárzás blokkolja a humán eritroleukémia és neuroblasztóma sejtekben. **A mi vizsgálataink szerint a kromatin kondenzáció az S fázis korai szakaszában gátlódik 2.2 és 2.4 C érték között a K562 sejtekben.** Az a tény, hogy kezdetben mégis mérhető kis fokú DNS szintézis, arra utal, hogy a replikáció elkezdődik, így a C érték is várhatóan magasabb, mint a nyugalmi 2.0 C érték. A G2 fázis blokk azt jelzi, hogy a kromoszómák képtelenek belépni a metafázisba, így nem alakulnak ki tökéletesen kondenzált kromoszómaformák az UVB kezelést követően. Valóban nem láttunk metafázisos kromoszómákat az UVB sugárkezelés után. A csökevényes interfázisos kromatin szerkezetek megjelenésére pedig az S fázis blokk szolgálhat magyarázatul, amely végig fennmarad az S fázis alatt és a G2 fázisban is. Az eredményeink összhangban vannak azzal a megfigyeléssel, mi szerint az UVB sugárzás generálja azokat az óriási DNS fragmentumokat, melyek fibrilláris kromatin szerkezeteknek tűntek. Osztjuk Higuchi és munkatársai által leírt nézeteket, mely szerint az apoptotikus sejtek hiánya nagy molekulaméretű DNS kialakulására utal, amely megelőzi az internukleoszomális DNS fragmentációjának létraszerű formálódását, kapcsolatban állva - a kaszpáz aktiváción keresztül - az apoptózissal. A sejtciklus megrekedését alátámasztják a kromatin kondenzálást monitorozó morfológiai vizsgálataink.

(e) **Az UVB sugárzás és a reverzibilis permeabilizálás nem indukálja a sejtek apoptotikus zsugorodását.** A korábbi tanulmányok alapján, a HeLa sejteken végzett UV besugárzás után, azt lehetett tapasztalni, hogy a sugárzás következtében kialakuló gátló hatás kiterjedésének mértéke a besugárzott időtartamtól függ. 10 J/m^2 alatti dózist alkalmazva, kezdetben a sugárzás gátló hatása érvényesült, amiből a sejt képes volt regenerálódni. Viszont magasabb dózis esetén, egy állandó és alacsony intenzitású DNS szintézis volt tapasztalható legalább 6 órán keresztül. Ezen megfigyeléseket erősítették az általunk vizsgált K562 sejtvonalon végzett kísérletek is. A K562 sejteknél az alacsonyabb dózis esetén ($2, 5, \text{ és } 15 \text{ J/m}^2$) a sejtek még képesek fokozatosan regenerálódni 3 órával a kezelést követően. A DNS repair mechanizmusa, ha csak részlegesen is (80%), de képes a DNS károsodást helyreállítani 15 J/m^2 dózisú kezelés után. Ezzel szemben a magas dózisú (25 J/m^2) sugárzást követően a K562 sejtek már nem képesek regenerálódni, és elveszítik DNS szintetizáló képességüket. Apoptózisra utaló jeleket ennél a dózisonál, ilyen időintervallumban nem figyeltünk meg, amit a flow citometriás analízis is alátámaszt, ezért beszélünk az UVB kezelés esetén preapoptotikus hatásról.

2. A morfológiai vizsgálatok során az alábbi eredményeket kaptuk:

(a) **Az UVB sugárzás okozta kromatin változások alacsonyabb UVB dózis (2, 5, 15 J/m²) esetében csak szórványosan jelennek meg,** és ritka előfordulásuk miatt nem ezeket alkalmaztuk. Magas UVB dózis esetén (25 J/m²) főleg úgy jelenik meg, mint egy fibrózus felhőszerű képződmény a kondenzálódó kromatin struktúra körül. Besugárzás után, az S fázis korai szakaszában megjelenő fibrilláris szerkezetek, kevésbé kondenzáltak, mint a kezeletlen sejtek hasonló struktúrái, a kromatin polarizálódása hamarabb kezdődik, ugyanazt a frakciót nézve. Az elongált kromatin formák korábban megjelennek, ám a további elongáció folyamata a továbbiakban gátoltnak tűnik. A kromatin szerkezetet egy finom fibrilláris háló borítja. A kisméretű apoptotikus testek az UVB sugárzásra nem jellemző struktúrák. A kezelést követően sem kromatin testek, sem egyéb tipikus kromatin szerkezetek nem voltak megfigyelhetők. Láthattuk a kondenzálási folyamat primitív, korai fázisait, melyben előforduló formák halvány fibrilláris szerkezettel rendelkeztek. A kromatin kondenzálás viszont sehol sem érte el a látható kromoszómák fázisát, alátámasztva ezzel a sejtciklus analízisének eredményeit.

(b) **A magasabb hullámhossztartományba eső, de gyengébb UVA sugárzás már alacsonyabb dózisban is érzékelhető morfológiai elváltozásokat eredményezett,** szemben az UVB sugárzással. Ennek magyarázata lehet az a repair rendszer, mely első sorban az UVB károsodások javításáért felelős.

(c) **Alapvető különbség a logaritmikus fázisban lévő, gamma- és UVB-kezelt sejtek között az,** hogy az UVB-kezelt K562 sejtekben csak nagyon kevés apoptotikus test alakul ki, a kondenzáltsági fok már a fibrilláris stádiumban nagyrészt megreked, így metafázisos kromoszómák kialakulása nem jellemző. Gamma sugárzás hatására a korai S fázisban sok apró, a késő S fázisban kevés és nagyobb apoptotikus test jelenik meg. Ezt a K562 sejttypuson történő vizsgálat mellett, az egér pre-B, illetve a CHO sejteken végzett kísérletek is megerősítették. Mivel különböző sejteken a gamma sugárzás azonos apoptotikus mintázatot mutatott, ez felvetette a sejttypustól független kromatin kondenzálódási termékek keletkezésének és a károsodások genotoxikus ágensek alapján történő osztályozásának lehetőségét.

(d) **A genotoxikus kezeléseket követő morfológiai vizsgálatok arra utaltak, hogy a különböző kromatin károsodási típusok osztályozhatók.** Tágabb értelemben véve, a célunk az volt, hogy karakterizáljuk a genotoxikus ágensek által kialakult (külső körülményekből fakadó) apoptotikus változásokat, és osztályozzuk őket a kromoszómák szerkezeti változásainak megfelelően. Feltételezésünk szerint diagnosztikai jelentőségű lehet a különböző kromatotoxikus hatások közötti különbség, melyet a kadmium és gamma kezelés hatásai már alátámasztottak. A vizsgálatok fényt

derítették arra, hogy a genotoxikus ágensek hatásai egyrészt hasonló károsodásokat indukálnak, mint pl. a kromatin denzitásának növekedése, vagy éppen az ellenkezője, dezintegrálódás, depolarizálódás, valamint a magállomány kilökődése, a nukleusz membránjának felszakadása. Ám megfigyelhetőek különbségek is, amelyek az adott ágensre jellemző kromatin mintázatot adnak.

A különböző genotoxikus kezelések, sokféle hatást fejthetnek ki a különböző sejtvonalakra. A kísérletekhez munkacsoportunk számos sejtvonalat tart fenn. A kadmium-kloridos kezelés két sejtvonalon is megtörtént (kínai hörcsög ovárium és eger pre-B sejt). Mind a két sejtvonalnál ugyanaz a nagyméretű feldarabolódás, a membránon keletkező lyukak, és a nyúlós tökéletlenül kondenzálódott kromoszómák megjelenése volt jellemző.

További vizsgálatokat végeztünk egyéb nehézfémekkel (higany-acetát, ólom-nitrát, nikkel-klorid) és vegyületekkel (EtBr, aktinomicin, koffein, nikotin), ahol ugyancsak az adott ágensre jellemző eltéréseket figyelhettünk meg.

A kadmium és a Hg(II)-acetát kezelést követő elváltozások közötti hasonlóság a nagyméretű repedések képződése a nukleusz membránján. Ugyanakkor a kadmium által okozott szakadások könnyen megkülönböztethetőek a Hg(II)-acetát okozta szabályos lyukaktól. A kromatin kerek, polarizált, sűrű, erősen fluoreszcens marginális foltjai megkülönböztető jegyek az ólom-nitrát okozta elváltozásokban. Ezek a polarizált formák máskülönben a kromatin prekromoszomális egységei lehetnek. 10 μ M feletti koncentrációknál a magállomány kilökődése gyakori jelenség. 10 μ M nikkel-klorid hatására a nagy polarizáltságú tömör állomány, illetve a felhőszerű dekondenzálatlan formák egyidejű megjelenése tipikus forma, ami az apoptózisra jellemző zsugorodás, és becsomagolódás jellemzője, míg a sértetlen dekondenzálatlan magból kiszakadó maganyag nekrozisra utaló jelenség. 50 μ M esetében a meghatározó forma a nekrotikus megnagyobbodott sejtmag.

(e) **A celluláris etológiai és életképesség vizsgálat LTS módszerrel** higany-acetát, ólom-nitrát, nikkel-klorid kezelt K562 sejtekben történt. Minden esetben a nehézfém koncentráció növekedésével a sejtciklus gátlódik, a sejtmembrán degenerálódik, és a normálistól eltérő, az apoptotózis jegyeit hordozó kromatin elváltozások figyelhetők meg a kultúrákban. Az eltérő jelenségek egyike az, hogy az ólom-nitrát, a kezdeti kisebb koncentrációknál erőteljes sejtosztódás-növekedést indukál, majd később a letális hatás jól érzékelhető. Amíg a nikkel-klorid és az ólom-nitrát esetében apoptózissal létrejött sejttörmelékek és bomlástermékek eliminálódtak, illetve a környező sejtek ezeket felvették, addig a higannyal kezelt sejteknél az elhalt sejtek is láthatóak voltak, ami a higany hatékony, bénító, fixáló hatásával magyarázható. A nikkel-kloriddal történő kezelést követően

a tenyészetekben aktívabb sejtmozgást tapasztaltunk, a kontroll és a másik két nehézfémrel kezelt tenyészetek mozgásához képest.

Konklúzió: Azon a feltevésen alapulva, hogy a toxikus ágensek a metabolikus funkciókat és az intracelluláris jelátviteli mechanizmusokat különböző pontokon érintik, mely reguláló útvonalak jelentős része még ismeretlen, jó az esélye annak, hogy a sejthalál számos tipikus esete kategorizálhatóvá válik. A citotoxicitás korai detektálását illetően a lehetséges megoldások közül, a választ a primer információt szolgáltató DNS szintjén keressük. A hierarchia csúcsán lévő DNS-DNS információ átviteli folyamatok (rekombináció, replikáció, repair) felelősek a sejt genetikai állományának integritásáért. A genetikai információ megváltozásának strukturális következményei vannak, melyek a kromatin elváltozások szintjén követhetők.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink célja az UVB sugárzás hatására az interfázisos kromatin kondenzálás szintjén történő változások bemutatása volt, humán eritroleukémia K562 sejtvonal segítségével, valamint az egyéb genotoxikus ágensek hatására kialakuló, a normálistól és egymástól eltérő struktúrák, apoptotikus jelenségek összevetése és rendszerezése.

A felvetett kérdést két irányból közelítettük meg: biokémiai és morfológiai szempontból.

Kimutattuk, hogy az interfázisos kromatin szerkezetek láthatóságát biztosító reverzibilis permeabilizálás nem csökkenti a sejtek életképességét, és a permeabilis K562 sejtekben folyó DNS szintézis egy ATP dependens replikatív folyamat. Az UVB sugárzás gátolja a replikatív DNS szintézist, míg a DNS repair aktiválja. Flow citometriás méréseink alapján, az UVB sugárzást követő néhány órán belül kisméretű apoptotikus sejtek nem jelentek meg, vagyis a sugárzást követően ez alatt a kis idő alatt nem következik be apoptózis. Az UVB sugárzás és a reverzibilis permeabilizálás nem indukálja a sejtek apoptotikus zsugorodását. A mi vizsgálataink szerint UVB sugárzás hatására a kromatin kondenzálás az S fázis korai szakaszában gátlódik 2.2 és 2.4 C érték között a K562 sejtekben.

További kísérleteinkben az UVB sugárzás okozta kromatin változások alacsonyabb UVB dózis (2, 5, 15 J/m²) esetében csak esetenként alakulnak ki, a magasabb hullámhossz tartományba eső, de gyengébb UVA sugárzás viszont már alacsonyabb dózisban is érzékelhető morfológiai elváltozásokat eredményezett. Alapvető különbség a logaritmikus fázisban lévő, gamma- és UVB-kezelt sejtek kromatin szerkezete között az, hogy az UVB-kezelt K562 sejtekben csak nagyon kevés apoptotikus test alakul ki, a kondenzáltsági fok már a fibrilláris stádiumban nagyrészt megrekedt, így metafázisos kromoszómák kialakulására már nem kerülhetett sor. A vizsgálatok fényt derítettek arra, hogy a genotoxikus ágensek hatásai egyrészt hasonló károsodásokat indukálnak, úgy, mint a lokális kromatin denzitás növekedése, vagy éppen az ellenkezője, dezintegrálódás, depolarizálódás, valamint a magállomány kilökődése, a nukleusz membránjának felszakadása. Ám megfigyelhetők különbségek is, amelyek az adott ágensre jellemző kromatin mintázatot adnak. A genotoxikus kezeléseket követő morfológiai vizsgálatok arra utaltak, hogy a különböző kromatin károsodási típusok osztályozhatók. A celluláris etológiai és életképesség vizsgálat LTS módszerrel - higany-acetát, ólom-nitrát, nikkel-klorid által kezelt K562 sejtekben - megerősítette az általunk kapott morfológiai analízis eredményeit, a folyamat nyomon követhetősége mellett.

Úgy gondoljuk, hogy eredményeink hozzájárulhatnak a genotoxikus ágensek kromatin szintű hatásmechanizmusának megértéséhez, amely így az eukarióta kromatin kondenzálódás jobb megismeréséhez vezet normál, valamint patológias körülmények között.

6. ÚJ EREDMÉNYEK

Kísérletes eredményeink alapján a célkitűzéseinkben megfogalmazottaknak eleget tettünk, melyeket pontokba szedve foglalok össze:

I. biokémiai megközelítésben:

1. A reverzibilis permeabilizálás jelentős mértékben nem csökkenti a sejtek viabilitását, és a permeabilis K562 sejtekben folyó DNS szintézis egy ATP dependens replikatív folyamat.

2. Az UVB sugárzás gátolja a replikatív DNS szintézist, míg a DNS repairt aktiválja.

3. Az UVB sugárzást követő flow citometriás analízis nem utal kisméretű apoptotikus sejtek jelenlétére, vagyis a sugárzást követően ez alatt a rövid idő alatt (néhány óra) nem következik be apoptózis.

4. Az UVB kezelt sejtek frakcióinak becsült C értékei 2.2 és 2.4 C értékek közé estek, ami azt jelenti, hogy a sugárzás a sejtciklust az S fázis korai szakaszában blokkolja, a gamma sugárzást követően pedig valamivel később, 2.4 C értéknél történik meg a sejtciklus gátlása.

II. morfológiai megközelítésben:

1. Az UVB sugárzás okozta kromatin változások alacsonyabb UVB dózis (2, 5, 15 J/m²) esetében csak esetenként alakulnak ki, és ritka előfordulásuk miatt, nem lehet őket megjeleníteni. A magas UVB dózis (25 J/m²) hatása főleg egy fibrózus felhőszerű képződményként manifesztálódik a kondenzálódó kromatinstruktúra körül.

2. Az UVB sugárzás nem változtatja jelentős mértékben a sejtek és a sejtmagok méretét.

3. A metafázisos kromoszómák jelenlétének hiánya arra utal, hogy az UVB által károsodott fibrilláris kromatinszerkezetet a kondenzációs folyamat bármely stádiumában fellazítja, meggátolva a kromatin csomagolódásának folyamatát.

4. A nagyobb hullámhossztartományba eső, gyengébb UVA sugárzás már alacsonyabb dózisban is érzékelhető morfológiai elváltozásokat eredményezett. A fibrózus felhőszerű képződmény kialakulása itt is jellemző a kondenzálódó kromatinstruktúra körül.

5. Alapvető különbség a gamma és az UVB kezelt sejtek között: a gamma sugárzás hatására a korai S fázisban sok apró, a kései S fázisban kevés és nagyobb apoptotikus test jelenik meg. Ezzel szemben az UVB kezelt sejtek kromatinszerkezetében nem jellemző forma.

6. A további nehézfém kezeléseket követő morfológiai vizsgálatok tovább erősítették azt a feltevést, hogy a különböző genotoxikus ágensek hatásai a kromatin kondenzálási szintjén is megkülönböztethetők, melyeket az adott sejttípus etológiai vizsgálati is alátámasztottak.

7. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. Banfalvi, G, Klaisz, M, **Ujvarosi, K**, Trencsenyi, G, Rozsa, D and Nagy, G. Gamma irradiation induced apoptotic changes in the chromatin structure of human erythroleukemia K562 cells. Apoptosis 12:2271-2283 (2007). IF:3,04
2. **Ujvarosi, K**, Hunyadi, J, Nagy, G, Pocsi, I, Banfalvi, G. Preapoptotic chromatin changes induced by ultraviolet B irradiation in human erythroleukemia K562 cells. Apoptosis 12(11):2089-99 (2007). IF:3,04
3. Trencsenyi, G., **Ujvarosi, K.**, Nagy, G., Banfalvi, G.: Transition from chromatin bodies to linear chromosomes nuclei of murine preB cells synchronized in S phase. DNA Cell Biol. 26(8):549-556 (2007). Címlap fotó. IF:1,86
4. Banfalvi, G., **Ujvarosi, K.**, Trencsenyi, G., Somogyi, C., Nagy, G., Basnakian, A.G.: Cell culture dependent toxicity and chromatin changes upon cadmium treatment in murine pre-B cells. Apoptosis 12:1219-1228 (2007). IF: 3,04
5. Banfalvi, G., Trencsenyi, G., **Ujvarosi, K.**, Nagy, G., Ombodi, T., Bedei, M., Somogyi, C., Basnakian, A.G.: Supranucleosomal organization of chromatin fibers in nuclei of Drosophila S2 cells. DNA Cell Res. 26, 55-62 (2007). Címlap fotó. IF: 1,86
6. Farkas E, **Ujvarosi K**, Nagy G, Posta J, Banfalvi G. Apoptogenic and necrogenic effects of mercuric acetate on the chromatin structure of K562 human erythroleukemia cells. Toxicol In Vitro. 2010 Feb;24(1):267-75. IF: 2,473

Σ_{IF} :15,313