

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Ujvárosi Kinga

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

Témavezetők:

Prof. Dr. Bánfalvi Gáspár

Prof. Dr. Hunyadi János



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2010

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés.....	5
2	Irodalmi áttekintés.....	9
2.1	A DNS magasabbrendű szerveződése.....	9
2.1.1	Az eukarióta kromoszóma kialakulása.....	9
2.2	Az ultraibolya sugárzás.....	12
2.2.1	Az ultraibolya sugárzás hatása a fehérje szerkezetre.....	13
2.2.2	Az ultraibolya sugárzás DNS károsító hatása.....	14
2.2.3	Az apoptózis morfológiája és annak biokémiai háttere.....	17
2.2.4	Az ultraibolya sugárzás által okozott hibák javítása.....	18
2.2.5	Nehézfémek okozta károsodások vizsgálata.....	20
2.3	A témához kapcsolódó közvetlen kutatási előzmények.....	20
2.3.1	A kromatin kondenzálódás morfológiai stádiumainak meghatározása.....	20
2.3.2	A kromatin kondenzálás általános sémája.....	23
3	Anyagok és módszerek.....	25
3.1	Felhasznált vegyszerek és oldatok.....	25
3.2	Sejtvonalak, sejtenyésztés.....	26
3.3	UVA, UVB kezelés.....	27
3.4	Gamma sugárzás.....	27
3.5	Nehézfémkezelés.....	28
3.6	Sejtek szinkronizálása elutriálással.....	28
3.7	A sejtciklus vizsgálata FACS analízissel.....	29
3.8	ATP dependens replikatív DNS szintézis a permeabilizált sejtekben.....	30
3.9	[³ H]timidin bejutása a sejtekbe.....	30
3.10	Kromatinszerkezetek izolálása.....	31
3.10.1	Reverzibilis permeabilizálás.....	31
3.10.2	Sejtmagizolálás.....	31
3.10.3	Kromatin preparálás.....	31
3.10.4	A kromatinszerkezet láthatóvá tétele.....	32
3.11	Adatok feldolgozása.....	32
3.12	Hosszútávú <i>in vitro</i> mikroszkópia (Time lapse microscopy).....	32
4	Eredmények.....	34
4.1	A reverzibilisen permeabilizált sejtek életképességének vizsgálata.....	34
4.2	UVB sugárzást követő flow citometriás analízis.....	36
4.3	A nukleozid inkorporáció helyreállása a sugárzást követően.....	36
4.4	Az ultraibolya B sugárzás hatása a replikatív és a repair DNS szintézisre a permeabilis sejtekben.....	37
4.5	A sejtciklus analízise ép és sugárkezelt sejtekben.....	38

4.6	Kezeletlen és UVB sugárzásnak kitett sejtek frakcióinak kromatin szerkezete	40
4.7	A kezeletlen sejtek interfázisos kromatin szerkezete.....	41
4.8	Kromatin-szerkezet változások UVB sugárzás után.....	43
4.9	A kromatin kondenzálásának végső stádiuma	45
4.10	Az UVB és UVA sugárzás okozta elváltozások összevetése	46
4.11	A γ - és az UVB sugárzás okozta elváltozások összehasonlítása	47
4.12	Kondenzációs ujjlenyomat (fingerprint)	48
4.13	Kadmium-klorid (CdCl_2)	49
4.13.1	Higany-acetát ($\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$)	51
4.13.2	Ólom-nitrát ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)	54
4.13.3	Nikkel-klorid (NiCl_2).....	55
4.14	Celluláris etológiai és életképesség vizsgálat LTS módszerrel (higany-acetát, ólom-nitrát, nikkel-klorid).....	56
5	Megbeszélés.....	59
6	Összefoglalás	66
7	Summary.....	67
8	Irodalomjegyzék	68
8.1	Hivatkozott közlemények jegyzéke	68
8.2	A disszertáció alapjául szolgáló közlemények jegyzéke	79
8.3	Poszter.....	80
8.4	Konferencia.....	80
8.5	Oktatási segédanyag	80
9	Tárgyszavak.....	81
10	Köszönetnyilvánítás	82

Rövidítések jegyzéke:

[³H]dThd: [³H]timidin

CHO: Chinese hamster ovary (kínai hörcsög fibroblaszt sejt kultúra)

DAPI: 2,6-diamidino-2-phenilindol

DTT: dithiotreitol

EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid

FAK: fokális adhézión kináz

FBS: Foetal bovine serum (magzati borjú szérum)

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid

IM: Indian muntjac (indiai szarvas) sejt kultúra

K562: humán eritroleukémia sejt vonal

LED: Light Emitting Diodes

LTS: Long Term Scanning (hosszú távú megfigyelés)

NER: Nucleotide Excision Repair (nukleotid excíziós repair rendszer)

preB-M8: egér pre-B M8 sejt kultúra

RPMI 1640: K562 sejttenyésztéséhez szükséges médium

T25 edény: 25 cm²-es tenyésztőedény

TCA: trichloroacetic acid (triklórecetsav)

UVA: ultraibolya A sugárzás (320–400 nm)

UVB: ultraibolya B sugárzás (280–320 nm)

UVC: ultraibolya C sugárzás (100–280 nm)

1 Bevezetés

Az értekezés különböző genotoxikus ágensek kromatotoxikus hatását vizsgálja, érintve az interfázisos kromatin szerveződéssel kapcsolatos kutatások előzményeit és problémakörét, a kondenzálás mechanizmusának jellegzetes struktúráit 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 (1817-1891) svájci botanikus figyelte meg 1842-ben, illetve *Ascaris megalocephala*-ban, Edouard Van Beneden (1846-1910) belga tudós. Bázikus anilin festék alkalmazásával, a német anatómus Walther Flemming (1843-1905) már 1882-ben leírta a mitózis folyamatát szalamandrában. A kromatin szerveződésének közvetlen megfigyelésére irányuló vizsgálatok csupán részleges információkkal szolgáltak (Comings és mtsai, 1980, Zorn és mtsai, 1979, Sperling és mtsai, 1981). A magmátrix szerepére a metafázisos kromoszómák kialakulásában kromatin eltávolítási kísérletek utalnak (Wan és mtsai, 1999). A kromoszóma kondenzálásról és a kromoszóma struktúráról alkotott modellek és hipotézisek többsége metafázisos kromoszómákon végzett vizsgálatok eredményein alapul (Paulson és mtsai, 1977; Cook és mtsai, 1976; Earnshaw és mtsai, 1983; Rattner és mtsai, 1985; Earnshaw, 1988). Ismert a kromatin kondenzálás génregulációs szerepe, melyben a gének kölcsönösen visszahatnak a kromatin struktúrára (Rein és mtsai, 1995). Számos magfehérjén azonosítottak 40-50 aminosavból álló kromodoméneket, melyek változatos interakciókat alakítanak ki hisztonokkal, DNS-el és RNS-el (Brehm és mtsai, 2004). A kromatin kondenzálása kapcsolatban áll a transzkripció aktivitással és korrelációt mutat a H3 hiszton foszforiláltságával (de Campos Vidal és mtsai, 1998, Jouan és mtsai, 1998). A kromatin nukleoszómákon végbemenő, ATP-függő újraszerveződési mechanizmus a DNS torziós dinamikájának szerepét mutatja a

kromatinállomány szerveződésében (Xue és mtsai, 1998, Anjanabha és mtsai, 2002). Az interfázisos kromatinállomány morfológiai vizsgálata azonban nehézségekbe ütközik, mivel paralell sorozat elektronmikroszkópos metszeteken csupán ragacsos hálózatként jelenik meg (Heslop-Harrison és mtsai, 1989). 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 (Belmont és mtsai, 2002). 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 (Gárdos és mtsai, 1957). A kromatin kondenzálással kapcsolatos kísérleti munkánk előzményei a reverzibilis permeabilizálást követő, interfázisos sejtek magjának kromatin kondenzálására vezethetők vissza (Bánfalvi, 1993). A permeabilis sejtek replikációs köztitermékeit C-5 pozícióban szubsztituált pirimidin analógok felhasználásával vizsgálták, mivel ebben a pozícióban úgy helyezhetők el nagy térkitöltésű szubsztituensek, mint például a Hg, hogy azok a DNS nagy árkába épülve, a DNS polimeráz funkcióját nem korlátozzák (Langer és mtsai, 1981, Basnakian és mtsai, 1989). A biotin beépítése a nukleotidok C-5 pozíciójába szintén nem zavarja meg a replikációt (Hiriyanna és mtsai, 1988, Blow és mtsai, 1987), ugyanakkor inkorporálódik a permeabilis sejtekbe (Hunting és mtsai, 1985, Nakayasu és mtsai, 1989). A biotinált nukleotidok segítségével immunfluoreszcens módszerrel láthatóvá tehetők az újonnan szintetizálódott DNS szakaszok (Bánfalvi, 1989). A permeabilizált sejtek regenerálásával a membrán funkció, a sejtek életképessége és a replikációs gépezetének intaktsága megőrizhető (Bánfalvi és mtsai, 1984). 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 köztitermékek (Heslop-Harrison és mtsai, 1989, Bánfalvi, 1984). 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 (Bánfalvi és mtsai, 2006).

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 dekonzenzált 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 (Bánfalvi és mtsai, 2005, Nagy és mtsai, 2004). A CHO sejtek kromatinállományának vizsgálatánál is alkalmazott - nagy felbontású elutriálással végrehajtott - sejtszinkronizálással sikerült követni a gamma sugárzás hatását egér preB-M8 sejtenyészen (Nagy és mtsai, 2004). 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, kromoszómális 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 dekonzenzált állapotba kerülési 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.

Feladatul kaptam az interfázisos kromatin kondenzálás biokémiai és morfológiai változásainak feltárását. UVB, illetve UVA sugárzás, valamint egyéb

genotoxikus ágensek, elsősorban nehézfémek hatását tanulmányoztam *in vitro* emlős és humán sejtvonalakon.

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 sejtfrakciók 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)

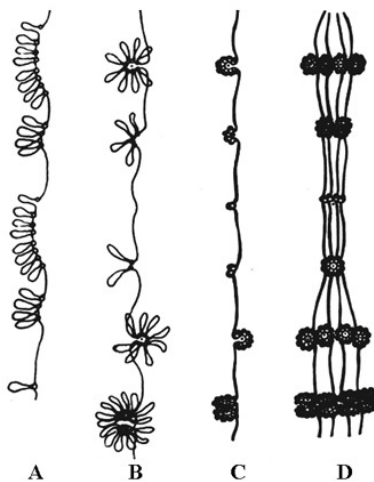
2 Irodalmi áttekintés

2.1 A DNS magasabbrendű szerveződése

Watson és Crick klasszikus közleménye írta le először a kettősszálú DNS szerkezetét és javaslatot tett a genetikai anyag másolásának valószínű mechanizmusára (Watson, Crick, 1953). Az elsődleges és másodlagos DNS szerkezet jól ismert, viszont az eukarióta DNS magasabbrendű kromoszomális szerveződésére, a harmadlagos szerkezetre vonatkozó hipotézisek nem nyertek bizonyítást.

2.1.1 Az eukarióta kromoszóma kialakulása

A 30 nm átmérőjű kromatinszál szerveződési szintje fölött nem egyértelműen tisztázott, hogy a DNS kromoszomális szerveződése milyen struktúrától kezdődik. Egyesek már a DNS harmadlagos szerkezetét is a kromoszomális szerveződési körbe sorolják, mások a nukleosómától kezdik a kromoszóma szerveződés tárgyalását. Munkacsoportunk szupranukleosómás szinttől kezdve beszél kromoszóma szerveződésről.

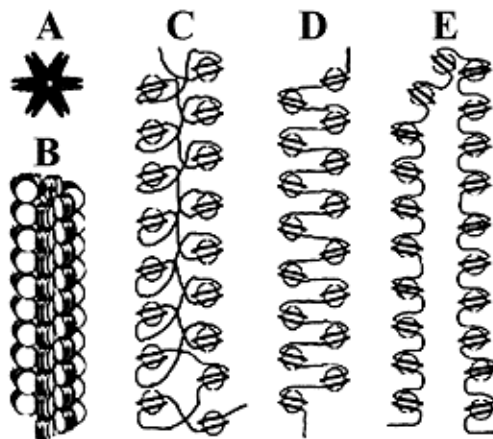


1. ábra A kromatin kondenzálás hurkos-rozetta-modellje

A. Egyedi elemek (cikloszómák-globoszómák) plusz egyedi hisztonoktól mentes DNS hurkok és azok kettőződése lineáris formában rendeződve. B. Csoportos hurkos szerkezet kialakulása egy központi mag körül az egyszerű hurkoktól a ciklomérekig, melyek a kromomérek különböző szerveződési szintjeit képviselik. C. Szupergyöngyök és szupranukleosómák kialakulása (Hozier és mtsai, 1977; Jorcano és mtsai, 1980; Scheer és mtsai, 1980). D. Politenizálási folyamat, számos kromatid laterális rendeződése (az ábrán csak 4 van feltüntetve) (Laird, 1981).

Egy alternatív kromoszómaszerveződési modell szerint a szolenoid szupertekercs plektonémásan önmagára tekeredve hurkokból álló rozettákat alkot és újabb szolenoid szerkezetet létrehozva kondenzálódik kromatida tekercssé (1. ábra).

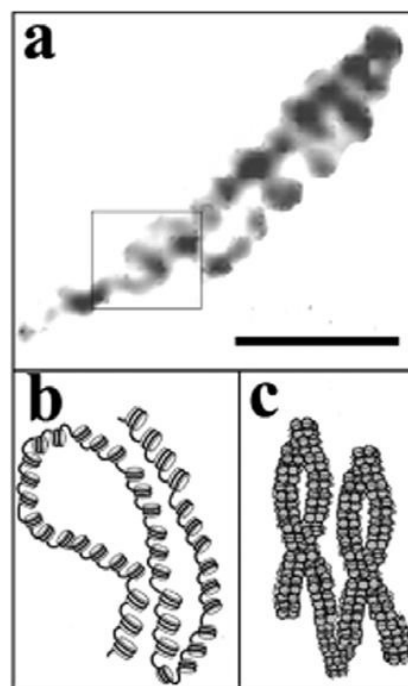
A korábban feltételezett szolenoid szerkezettel szemben jelenleg inkább a kromatin szálak cikk-cakk-os, illetve hurkos elrendeződését fogadják el (2. ábra). (Bánfalvi és mtsai, 2005).



2. ábra Nukleosómák lehetséges térbeli elrendeződése

A. és B. szolenoid, C. nyújtott cikk-cakk modell, D. nyújtott leveles rozetta, E. nyújtott hurok. (Bánfalvi G., 2007).

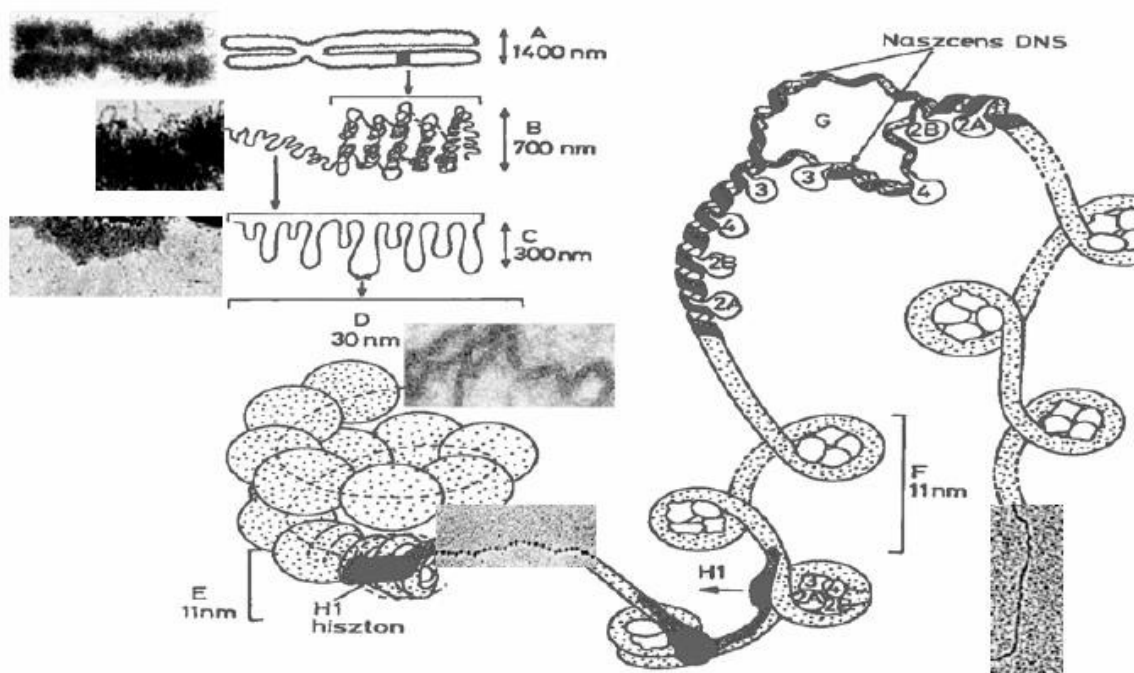
Ezek közül a munkacsoport, amelyben dolgozom, *Drosophila sp.* sejtekben a hurkos szerkezetet írta le (2. ábra, E) (Bánfalvi és mtsai, 2007), mely alapján a kondenzálódás folyamata is másként alakul. Az eukarióta sejtek kromatinjának fehérjetartalma messze meghaladja a prokarióta genomhoz asszociált fehérjék mennyiségét. A gyöngysorszerűen megjelenő nukleosóma füzér képezi a kromoszómális szerveződés alapját. Ez a 11 nm átmérőjű struktúra önmagában a DNS kompaktságát hatszorosára növeli.



3. ábra *Drosophila sp.* sejt kromatinjának szupranukleosómális hurkos szerkezete

(a.) kép analízissel (a bekeretezett rész a nukleosómák szerveződését mutatja), (b.) illetve a hurkos szerkezet sematikus ábrázolása, (c.) valamint a szolenoid struktúra látható (Bánfalvi és mtsai, 2007).

A DNS kompaktabbá válásában a következő szint a DNS eredeti hosszához képest negyvenszeres rövidülést biztosító hipotetikus 30 nm átmérőjű szolenoid szerkezet, mely a nukleoszóma fonal spirális felcsavarodásával létrejövő kromatin fonallra jellemző. A rozetta modellel szemben a továbbiakban a kromatin fonal rendszertelen felcsavarodásával egy 300 nm átmérőjű bolyhos szerkezet, ún. bolyhos fonal (folded fibre) jön létre, 400-800 szoros rövidülést biztosítva ezzel. Az interfázisos kromatin valószínűleg ilyen, magmátrixhoz kötött bolyhos fonalak által alkotott szabálytalan hurkos szerkezet. A bolyhos fonal egy körülbelül 100 nm átmérőjű nukleáris mátrixra tekeredve és nem-hiszton fehérjékkel asszociálva hozza létre a kromatidákat (700 nm), illetve a kromoszómákat (1400 nm) (3. ábra) (Bánfalvi és mtsai, 2007, Bánfalvi MTA doktori értekezése, 1987, Bánfalvi, 1986).



4. ábra Az eukarióta DNS kromoszomális szerveződése és replikációja

(A) metafázisos kromoszóma, (B) kondenzált kromoszóma részlet, (C) kromoszóma hurkok, (D) szolenoid szerkezet, (E) inaktív nukleoszóma füzér, (F) aktív nukleoszóma füzér, (G) replikációs villa (Bánfalvi G. MTA doktori értekezése nyomán, 1987).

Emésztési kísérletek alapján a kromoszómák váza nem-hiszton fehérjékből áll, amelyhez - az emlős replikon méretének megfelelő - 35-100 kilobázis nagyságú hurkokban kapcsolódik a DNS. A DNS-t eredeti hosszának tízezred részére hajtogatva

az 1400 nm átmérőjű metafázisos kromoszómák tartalmazzák. Az interfázisos kromoszómák különböző régióiban eltérő a DNS kompaktsága. A sejtmagon belül a heterokromatin kondenzáltabb, mint az eukromatin. A génátírás az eukromatin régióban történik, melynek fontos szerepe van a génexpresszió szabályozásában. A kondenzáltsági fok növekedése (heterokromatin) a teljes kromoszóma inaktiválását is eredményezheti. Így például az egyik női X kromoszóma inaktív Barr-testté alakul. A kromatin állomány szélsőséges kondenzálása valósul meg a spermiumban is, ahol a hiszton fehérjék helyett a kisebb molekulatömegű spermin és spermidin lép kölcsönhatásba a DNS-el.

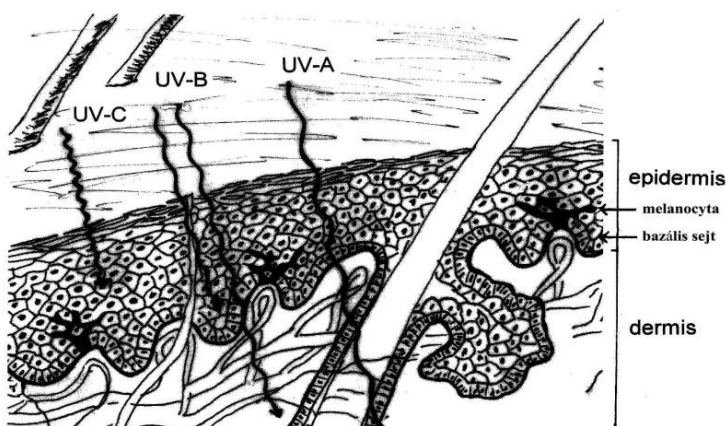
2.2 Az ultraibolya sugárzás

Feladatom az UVB sugárzás kromatin szerkezetre gyakorolt hatásának vizsgálata, ezért elengedhetetlen az ultraibolya sugárzás rövid jellemzése. A Földünket körülvevő légkört öt rétegre lehet osztani. Az UV sugárzás szempontjából a sztratoszféra a legjelentősebb, amely 10-50 km magasságban található. Ebben a szférában helyezkedik el az ózonréteg, mely kiszűri az élőlényekre ártalmas UV sugárzást. Az ultraibolya sugárzás olyan elektromágneses sugárzás, melynek hullámhossztartománya (100–400 nm) a látható (400–700 nm) és a röntgensugárzás (0,01–100 nm) közé esik. A Nap sugárzási energiájának mintegy 10%-a az UV tartományban van, aminek egy része a Föld felszínét is eléri. Az UV tartományt szokás három részre bontani: UVA (320–400 nm), UVB (280–320 nm) és UVC (100–280 nm). A Föld felszínét a sztratoszférában az oxigén és az UV hatására képződő ózonréteg (O_3) védi a Nap UV sugárzásától. A magaslégköri (sztratoszférikus) ózonréteg védelméről az ipari nagyhatalmak 1985 márciusában Montreálban egy nemzetközi egyezményt írtak alá, amely Montreáli Jegyzőkönyv néven vált ismertté. Magyarország 1989-ben írta alá a Montreáli Jegyzőkönyvet, egyben vállalva a többi aláíró országgal egyetemben, hogy az ózonréteget károsító anyagok kibocsátását csökkenti. A csökkentést anyagcsoporttól függően 10-15 év alatt - a kibocsátás teljes megszüntetéséig - megadott ütemezés szerint végzik el. A környezeti levegő ózontartalma időjárástól, magasságtól, vulkánkitöréstől és földrajzi szélességtől függő ingadozást mutat, koncentrációját a napsugárzás erősen befolyásolja. Az emberi

tevékenység következtében a légkörbe jutó (főleg halogén tartalmú) szennyezések az ózonréteg vékonyodásához vezetnek. Az ózonréteg védelme alatt a földfelszínt csak a 300-400 nm-es tartomány (UVA, UVB) érte eddig el, az ózonpajzs az UVC sugárzást kiszűrte, az élő szervezetek így ehhez a hullámhossztartományhoz alkalmazkodtak, a rövidebb hullámhosszúságú tartományhoz viszont nem. Az ózonréteg sérülésével viszont már számolni kell ennek hatásával is. Kevésbé tisztázott az, hogy milyen károsodásokat okoznak a rövid hullámhosszúságú, vagyis nagy energiájú UV fotonok az élő szervezetben (Ozone Secretariat U. N. E.P., 2006, Ronto és mtsai, 2004).

2.2.1 Az ultraibolya sugárzás hatása a fehérje szerkezetre

A rövidebb hullámhosszú UV sugarak a nukleinsavakon kívül jelentős változást okozhatnak a fehérjék térszerkezetében: felbonthatnak bizonyos kötéseket, mint pl. hidrogénkötéseket, kénhidakat. Ezek a károsodások jelentősen veszélyeztetik a fehérjék működőképességét. Megváltozik a fehérjék szerkezete, így már nem képesek enzim funkciójuk betöltésére, a sejtek pusztulását eredményezheti. A nap ibolyántúli sugarai közül az UVB sugarak a légkör felső rétegeiben részben elnyelődnek, bejutnak a bőrbe, a bazális sejtrétegig. Erősen roncsoló hatásúak, leégést okoznak, csak részben felelősek a bőrrák kialakulásáért.



5. ábra A különböző hullámhosszú fotonok behatolása a bőrbe

(Fekete Andrea, Elektromágneses sugárzások biofizikája, egyetemi jegyzet)

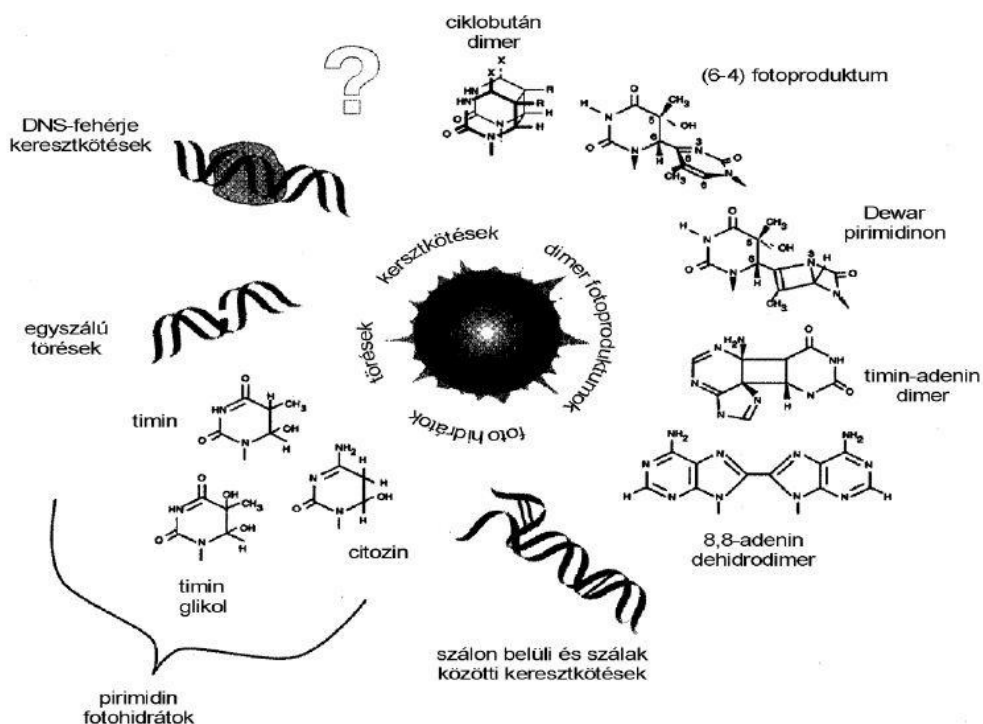
A bőr napfényre való érzékenységet a testfelület pigmentációja alapvetően meghatározza. Az egyedfejlődés során a mélyebb rétegekbe bevándorolt

neuroektodermális eredetű melanocyták nem mutatnak jelentős osztódási aktivitást. Részben éppen ezért, részben pedig magas anti-apoptotikus bcl-2 tartalmuk miatt az UV által kiváltott sejtelhalásban sem vesznek részt. Az általuk termelt pigmenteket a környező keratinocytáknak adják át. A barna eumelanin fényelnyelése révén védi a bőr mélyebb rétegeit a sugárzástól. Nemcsak a bejutó dózist csökkenti, hanem jellegzetes abszorpciójának köszönhetően a spektrumot is megváltoztatja. A narancssárga pheomelanin viszont UVB hatására oxigén gyököket hoz létre, sőt feltételezik közreműködését a melanomák kialakulásában is (Fekete, egyetemi jegyzet).

A kisebb energiájú, ám a bőrben mélyebbre hatoló UVA sugarak, melyek sokáig csak jótékony tulajdonságaikról voltak ismertek, ma már tudjuk, hogy rejtett veszélyt jelentenek: jelentős mértékben, de csak hosszabb távon károsítják észlelhetően a bőrünket. Hatásait részben reaktív oxigén gyökök (ROS) közvetítik. Elsősorban a krónikus UVA sugárzás a bőr sejtjeinek idő előtti öregedését, ráncosságát okozza, de ezek a sugarak felelősek a napallergia fellépéséért is. Manapság már az is ismert tény, hogy UVA sugarak felerősítik az UVB sugarak hatását, és maguk is szerepet játszanak a bőrrák kifejlődésében (Jiang és mtsai, 2009) (5. ábra).

2.2.2 Az ultraibolya sugárzás DNS károsító hatása

Azok az UV sugárzások által okozott kémiai változások okozzák a legsúlyosabb károsodást, amelyek a sejtek örökítőanyagát, a DNS-t érintik. A nagyenergiájú fotonok nemcsak kovalens kötéseket képesek megszüntetni, hanem előidézhetik újak (pl. pirimidin dimerek) kialakulását is. A DNS-ben UV fény hatására különböző fotoproduktumok keletkeznek, úgy, mint DNS fehérje keresztkötések, szálon belüli és szálak közötti keresztkötések. A hatás maximuma 260 és 265 nm, amely egybeesik a nukleinsavak, pontosabban a pirimidin bázisok fényelnyelési maximumával. UV sugárzás hatására a DNS kettős spirál azonos szálán lévő szomszédos pirimidin bázisok közötti kovalens kötések kialakulásával láncon belül és a láncok közötti dimerek jönnek létre (citozin-citozin, citozin-timin, timin-timin, pirimidin fotohidrátokat, 8,8-adenin dehidrodimer, Dewar pirimidinon, (6-4) fotoproduktum), amelyek normál körülmények között nem fordulnak elő a DNS-ben (6. ábra).



6. ábra A DNS-ben UV fény hatására keletkező főbb fotoproduktumok

(Fekete Andrea, Elektromágneses sugárzások biofizikája, egyetemi jegyzet)

Leggyakoribbak a timin dimerek (Lin és mtsai, 2009). Keletkezésük során a timin és a szemben lévő adenin közti H-híd kötések gyengülnek. Ezt követően a C-C atomjai közötti kettős kötés felszakad, és a szomszédos timin bázis azonos pozíciójú (5-6) szénatomjaival kovalens kötődéssel dimer, ciklobután gyűrű jön létre. A dimerek a nukleinsavak normális szintézisének, replikálódásának menetét zavarják, amelynek következtében a következő generációban hibás bázispárosodás (mutáció) lép fel. Ez azért is veszélyes, mivel nem csak az eredeti sejt nem tudja az adott DNS szakasz által kódolt fehérjét többé előállítani, de az utódsejtek sem. A mutánsok létrejötte lehet letális, közömbös, és előnyös (nagyon ritka). Az esszenciális gének mutációja a sejtek pusztulását eredményezi, ha a károsodást nem követi enzimatikus javítás. Ez ad lehetőséget az UV sugárzás károsító hatásának vizsgálatára, amelynek célja az egészségi kockázat becslése és annak előrejelzése.

A DNS károsító hatások endogén és exogén eredetűek lehetnek. Klasztrogén vagy mutagén hatások a gamma besugárzás, az ultraibolya sugárzás, kémiai behatások,

az oxidatív stressz és a metabolit megvonás. A p53 központi szerepet játszik a genom integritásának megőrzésében, mind a G0 – G1 átmenet során, mind pedig a G2 – M átmenethez kötött DNS-repair aktivitásának szabályozásában (Sooki-Tóth és mtsai, 1986, Offer és mtsai, 2001).

Az emberi bőrön végzett epidemológiai vizsgálatokkal természetesen csak korlátozott mennyiségű információ nyerhető. Sejtenyészetekben azonban a hullámhossz, a kromofórok, a károsodás és annak mechanizmusa összefüggéseikben is jól követhetők. A mérési technikák és a tudományos gondolkodás fejlődése a múlt század közepén vezetett el a fény által okozott biológiai változások hullámhosszfüggésének kvantitatív elemzéséhez. A legegyszerűbb bizonyítékot az szolgáltatja, ha egy-egy biológiai végpontot (pl.: erythema, carcinogenesis, sejthalál) sikerül egyetlen molekuláris fotoproduktumra visszavezetni. Ebben az esetben a következmény hatásspektruma és a keresett, sérülő vagy szenzibilizátor kromofór (pl.: DNS, vagy szenzibilizáló molekula) elnyelési színeképe megegyezik. Hatásspektrumon az objektum által a vizsgált hatás szempontjából egyetlen beeső foton felé mutatott felület (hatáskeresztmetszet), vagy az átalakult molekulák és az elnyelt fotonok arányának (kvantumhatásfok) a hullámhossz függvényében való ábrázolását értjük. Lehetővé vált a különböző hullámhosszakon az azonos biológiai hatás kiváltásához szükséges beeső energiasűrűség (J/cm^2) vagy beeső fotonszám (foton/cm^2) meghatározása. Az így kapott érték reciproka az ún. hatáskeresztmetszet (cm^2/J , cm^2/foton). Egy adott fajta molekula gerjesztése esetén a felvett energia leadása többféle módon lehetséges, az egyes folyamatok lejátszódásának valószínűségét fejezi ki a kvantumhatásfok. Tekintsünk például egy folyamatot, amelyben az elnyelő molekulák gerjesztése minden tizedik esetben eredményez kémiai átalakulást. Ennek a fotokémiai reakciónak a kvantumhatásfoka 0.1, vagyis az elnyelt kvantumok 1/10 része hasznosul ezen a módon (Fekete, egyetemi jegyzet).

Az ultraibolya B sugárzás az egyik, a programozott sejthalál kialakulásáért felelős ágens. Általános az a felfogás, hogy az UVB sugárzás indukálta apoptózis a nukleáris DNS károsodás (pirimidin dimerek) következménye, amely a p53 tumor szupresszor fehérje aktivációján keresztül következik be. Az UVB sugárzás aktiválja mind az extrinsic halál receptorokat, mind pedig az intrinsic mitokondriális

apoptotikus jelátviteli utakat. A rövid idejű UVB sugárzásnak kitett humán leukémia HL-60, mielomonocita U937, T-limfoblasztoid Molt-4 és Molt-3 sejtvonalak igen gyorsan apoptózist szenvedtek, míg a hosszabb UVB sugárzásnak kitett sejtek egy sokkal gyorsabb lefolyású, nekrozishoz hasonló folyamatban haltak el. (Martin és mtsai, 1991).

A pre-eritroid K562 és B-limfoblasztoid Daudi sejtvonalak a többivel összehasonlítva sokkal ellenállóbbnak bizonyultak az UVB sugárzás halált indukáló hatásával szemben. Az endogén nukleáz aktivitásának mintázatát mutató DNS fragmentáció nem volt észlelhető közvetlenül az UVB sugárzást követően. A kettős szálú DNS törések mérése alapján a limfoid sejtek enyhe károsodást szenvednek, míg a normál granulociták és mieloid leukémia sejtek esetében a kettős törések száma óriási mértékben növekedett (Bogdanov és mtsai, 1997). Az ultraibolya B sugárzás hatalmas méretű DNS fragmentumok kialakulását idézte elő, melyet patkány glióma sejtek magjában figyeltek meg (Higuchi és mtsai, 2003). Hibridóma sejtekben már az UVB sugárzást követő 2 órán belül oligonukleotid szinten zajló károsodást észleltek (Winter és mtsai, 1998).

2.2.3 Az apoptózis morfológiája és annak biokémiai háttere

Az apoptózis mind morfológiájában, mind biokémiájában a legjobban jellemzett formája a sejtelhalásnak. Az apoptózis során elpusztuló sejtek fokozatosan elválnak a környező sejtektől, kapcsolatuk az extracelluláris mátrixszal megszűnik. A fokális adhézió létrejöttéért felelős kinázokat (FAK) kaspázok hasítják, melynek következménye az extracelluláris mátrixtól való elszakadás. A plazmamembránon kitüremkedések (bleb) jelennek meg. A sejtmaganyag kondenzálódása (kariopicnózis) figyelhető meg, mely az apoptózis leglátványosabb jellemzője. A kondenzált sejtmag ezután darabokra esik szét (kariorexis). Az elhaló sejtek sejtmagjában enzimek aktiválódnak, melyek a nukleoszómák között hasítják a DNS-t és ennek eredményeként 200 bázispárnnyi nukleoszómális DNS fragmentek keletkeznek. A jelenleg ismert leggyakoribb ilyen kromoszómális DNS-t hasító enzim a CAD (kaspáz aktivált DNáz), mely akkor válik aktívvá, ha az apoptózis során aktiválódó kaspáz-3 az ICAD inhibítort elhasítja (Sakahira, 1998). A kromatin kondenzáció

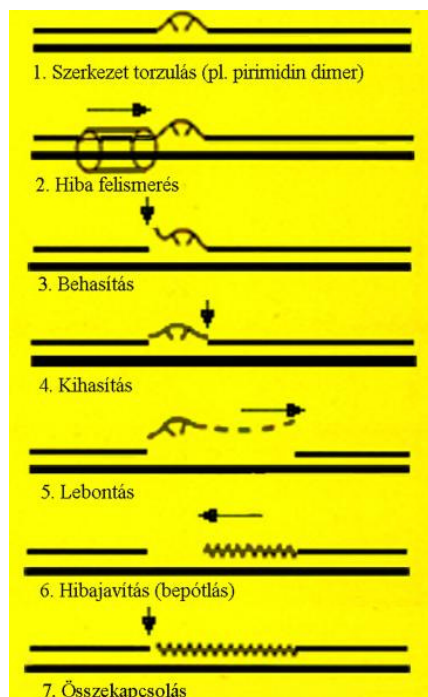
ugyancsak kaspáz aktivált, ún. acinus fehérje közreműködésével zajlik (Ferri, 2000). Az endoplazmatikus retikulum szerkezete fellazul, riboszómák szakadnak le róla és aggregálódnak. A mitokondriumokból az apoptózis során fehérje kiáramlás történik (citokróm-c, smac/DIABLO, AIF, Omi, Endonukleáz G) (Twiddy és mtsai, 2004). A citoplazmában vakuólumok jelennek meg. A sejt végül különböző sejtorganelleket és a fragmentálódott DNS-t magába foglaló, ún. apoptotikus testekre darabolódik. Fiziológiás körülmények között az apoptotikus testeket a környező sejtek fagocitálják, majd lizoszómálisan megemésztik, így az elpusztult sejt anyagai nem áramlanak ki az extracelluláris térbe, és nem okoznak gyulladást (Fadok és mtsai, 1992). Az apoptotikus program lejátszódása során egyes, a plazmamembrán belső oldalán elhelyezkedő anyagok a külső oldalra kerülnek. Ilyen anyagok az anionos foszfolipidek, mint például a foszfatidil-szerin, bizonyos fehérjék, vagy lipidekhez kapcsolódó cukorkomponensek (Johnson és mtsai, 1998). A fagocitózis folyamatához elengedhetetlenek az elhalt sejt membránjának e molekulái, valamint az ezeket felismerő, fagocita sejtek felületén található receptorok. Amennyiben a fagocitózis elmarad, az apoptotikus testek integritása egy idő után megszűnik, és a sejttartalom szekunder nekrozis útján kerül a környezetbe. Az apoptotikus sejtek rendkívül gyors eltávolítása (clearance) az oka annak, hogy *in vivo* aránylag kevés apoptotikus sejtet lehet megfigyelni, ami sokáig a biológiai jelenség jelentőségének alábecsléséhez vezetett. A folyamat általában az első morfológiai jelek megjelenése után néhány óra alatt lezajlik, emellett a fagocitózis következtében az elhalt sejt eltűnik, nem okoz gyulladást, sem hegeképződést.

2.2.4 Az ultraibolya sugárzás által okozott hibák javítása

A membránban felszíni receptorok által mediált apoptotikus útvonal aktiválódásáról több ismerettel rendelkezünk, mint a DNS-károsodások apoptózis kiváltásában játszott szerepéről, vagy a kromatin szerkezetben megnyilvánuló változásokról. Ismert, hogy az UV sugárzás károsító hatást fejt ki a magmembrán-receptorokra és a DNS-re. A szomszédos pirimidin bázisok között kovalens kötással kialakuló pirimidin dimereket közvetlenül fotoreaktivációval, vagy nukleotid excíziós repair rendszer (NER) segítségével lehet kijavítani. A repair mechanizmus során

excíziós egy endonukleáz a hiba előtt és után behasítja a hibás szálát és kihalítja a dimert tartalmazó rövid DNS szakaszt, majd az így keletkezett rést a DNS-polimeráz bepótolja, végül a DNS-ligáz összeköti a végeket (7. ábra).

Az UV-sugárzás károsító hatása függ:



1. Fajtól, mert az egyes fajok más-más sugárérzékenységgel rendelkeznek.

2. A besugárzott tenyészet korától (a sejtciklus stádiumaiban töltött idő arányától, a tenyészet korához viszonyítva). A log fázisban lévő tenyészeteknek nagyobb az UV sugárzás iránti érzékenysége, mivel ebben a fázisban a legintenzívebb a sejtek szaporodása. Ekkor éri el a DNS szálelválasztás mértéke a legmagasabb szintet, amely során a legtöbb sejt S fázisban van, ezáltal a kromatin lazább szerkezetű, sérülékenyebb. A kondenzált DNS védettebb az UV sugárzással szemben.

7. ábra UV sugárzás által indukált nukleotid excíziós repair

1. UV által indukált pirimidin dimer kialakulása lokálisan a hélikális szerkezet torzulását okozza. 2. NER proteinek felismerik a károsodott részt. A DNS szál limitált kinyílása ebben a szakaszban történik. 3. Az excíziós nukleáz behasít. 4. Az excíziós nukleáz enzim kihalítja a sérülést tartalmazó oligonukleotid szakaszt. 5. Hibás DNS szakasz lebontása. 6. Repair DNS szintézis. 7. DNS szál összekapcsolása DNS ligázzal (Hanawalt, 1995).

NER-deficiens sejtek esetében a sejtciklus S fázisban a repair által ki nem javított timin dimerek kettős szálú DNS töréseket eredményeznek, gátolják a DNS replikációt, RNS transzkripciót. Kromoszómatörés, rekombináció, mutáció, apoptózis kiváltó tényzői. Az UV kezelés utáni első mitózis során megfigyelhetők a rekombinációk által okozott kromoszóma-aberrációk.

A NER deficiens kórképek közül az egyik a *xeroderma pigmentosum*, amely egy fényérzékenységgel és keratózissal járó familiáris szindróma. Kialakulásával

fokozott bőrrákveszély lép fel (carcinoma, melanoma). Legalább 6 gén mutációja okozhatja, melyek termékei a DNS javításban vesznek részt (XPA: DNS és fehérje kötő funkciójú fehérje, XPC: károsodást érzékelő fehérje, XPF: endonukleáz, XPG: endonukleáz), (Friedberg és mtsai, 1995, Wood és mtsai, 1997).

2.2.5 Nehézfémek okozta károsodások vizsgálata

Az értekezés az UV sugárzás mellett, kiegészül a kadmium vizsgálatának leírásával, valamint további nehézfémek okozta kondenzálási eltéréseket is taglal. A nehézfémek közül a legfontosabbak a kadmium mellett az ólom, a higany, illetve ide sorolható a nikkel, melyek a szennyezett ivóvízzel, táplálékkal és levegőből a szervezetbe jutva, potenciális veszélyforrások. A teljes szervezetet szennyezni, károsítani képes nehézfémek a mikroorganizmusok számára lebonthatatlanok, valamint a szervezetben akkumulálódva toxikus hatást fejtenek ki. A nehézfémek generálta oxidatív stressz során, a Fenton- és a Haber-Weiss-reakción keresztül a fehérjék, a DNS, és a celluláris lipidek módosulnak (Kasprzak, 1995). A molekuláris O_2 tökéletlen, többlépcsős redukciója gyököket generál, melyek a DNS struktúra, a kromatin károsodását okozzák.

2.3 A témához kapcsolódó közvetlen kutatási előzmények

2.3.1 A kromatin kondenzálódás morfológiai stádiumainak meghatározása

Az eukarióta sejtmag DNS állományának nagy része tömör szerkezetű heterokromatin formát ölt. Ahhoz, hogy a gének kifejeződhessenek éppen az ellenkező folyamat a kromatin állomány dekonzenzációja játszódik le, a transzkripció faktorok és az RNS polimerázok segítségével (Felsenfeld és mtsai, 1996, Workman és mtsai, 1998). A génexpresszió tanulmányozására a humán eritroid leukémia K562 sejtvonal igen alkalmas, mint az egyik transzkripcionálisan aktív rendszer bemutatására szolgáló modell (Fordis és mtsai, 1984). Az emlős sejtek kromatin kondenzálásának és a kromatin magasabb szintű szerveződésének megértése az 1970-es években megállapítottakhoz képest jelentős mértékben nem változott (Kornberg és mtsai, 1977, Klug & Butler, 1983). A létező kromoszómakondenzációs modellek (Kireeva és mtsai, 2004, Németh és mtsai, 2004) ellentmondásosak, és hipotetikusak. Eddig nem álltak

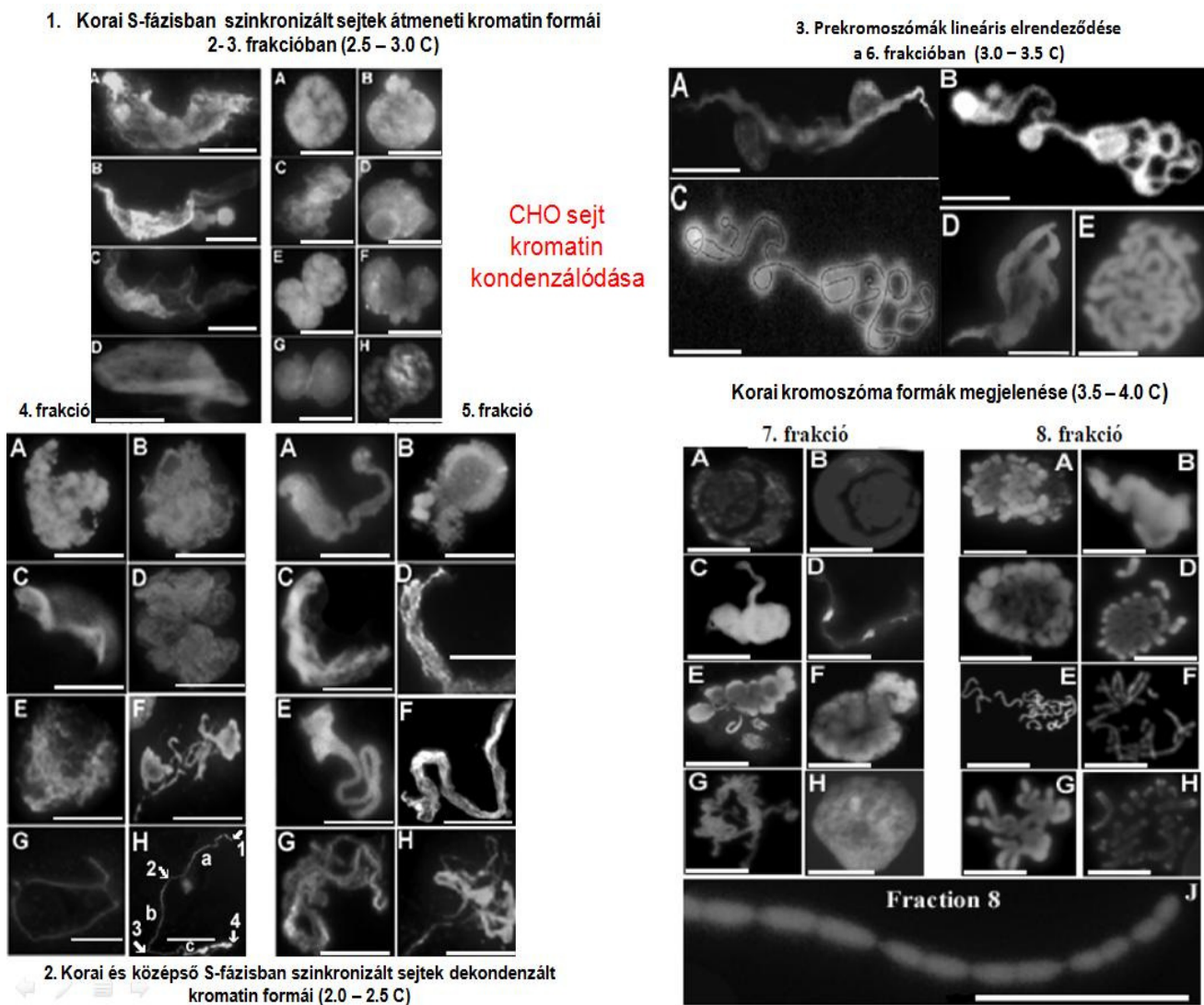
rendelkezésre olyan módszerek, melyek lehetővé tették a ragadós, nagy denzitású kromatin anyag szerkezetének vizsgálatát. A már említett technológiai korlátoknak köszönhetően, nem létezik olyan metodika, mely segítségével a kromatin változások követhetőek lennének.

A kutató csoport, melynek munkájába bekapcsolódtam, úgy oldotta meg a problémát, hogy a reverzibilis permeabilizálással fenntartja a sejtek életképességét, melyet radioaktív nukleotid és nukleozid inkorporáció mérésével követtek (Bánfalvi és mtsai, 1984). A replikációt vizsgálták a permeabilizált sejtekben, illetve az interfázis alatt végbemenő kromatin kondenzáció során a sejtmembrán permeabilitásának helyreállítása után (Bánfalvi, 1993). Permeabilizálás nélkül, mikroszkóposan csupán kétféle kromatin szerkezet látható: interfázisos sejtmag és metafázisos kromoszóma. Az interfázis során a sejtmagban zajló kondenzálási események eddig nem voltak megfigyelhetők. A reverzibilis permeabilizálás lehetőséget kínál az interfázisban lévő sejtmag felnyitására, láthatóvá téve a kromatinállomány kondenzáltságának különböző állapotait, szinkronizált sejtekben pedig követhetővé teszi a kondenzáció folyamatának egymást követő lépéseit. Mivel a sejt viabilitása fenntartható, a reverzibilis permeabilizálási módszer lehetővé teszi, hogy a sejtmagot a sejtciklus bármelyik szakaszában feltárjuk.

A munkacsoportnak sikerült az interfázisos kromatin kondenzációját végigkísérni, illetve különböző morfológiai stádiumokat elkülöníteni, melyeket CHO sejteken mutatok be. A sejtek szinkronizálásával nyert frakciók az S fázis korai szakaszától az M fázisig mutatják be a kondenzálás lépéseit.

A folyamat lépései: A centrifugális elutriálással nyert 2-3. frakció sejtszejtjei a korai S-fázisban (2.21 C-érték), erősen dekondenzált kromatin állománnyal rendelkeznek (8. ábra bal panel). Kromatinszerkezetükre a bolyhos, fátyolszerű formák jellemzőek. A elutriálás 3. frakciójában (2.55 C) a kromatin polarizációja figyelhető meg (8. ábra jobb panel A-D). Ebben a frakcióban már megfigyelhető bizonyos fokú szupertekercselődés is (8. ábra jobb panel E-H). A 4. frakció korai-közép S fázisban (2.76 C) lévő sejtszejtjeinek magjában megfigyelhető, amint a fátyolszerű kromatin fokozatosan szupertekercselt hurkokat alkot (8. ábra bal panel A-E). Körülbelül 300 nm vastag, eukromatinhoz hasonló, fonalak jelennek meg (8. ábra bal panel G-H). Az

5. frakcióban (2.98 C) a fibrózus szerkezetek tovább kondenzálódnak szalagos struktúrákká (8. ábra jobb panel A-F). A kondenzálás jól megfigyelhető a 8. ábra jobb panel G felvételén.



8. ábra A CHO sejt kultúrában megfigyelt kromatin kondenzáció morfológiai stádiumai (jelzés: $5\mu\text{M}$) (Bánfalvi és mtsai, 2006)

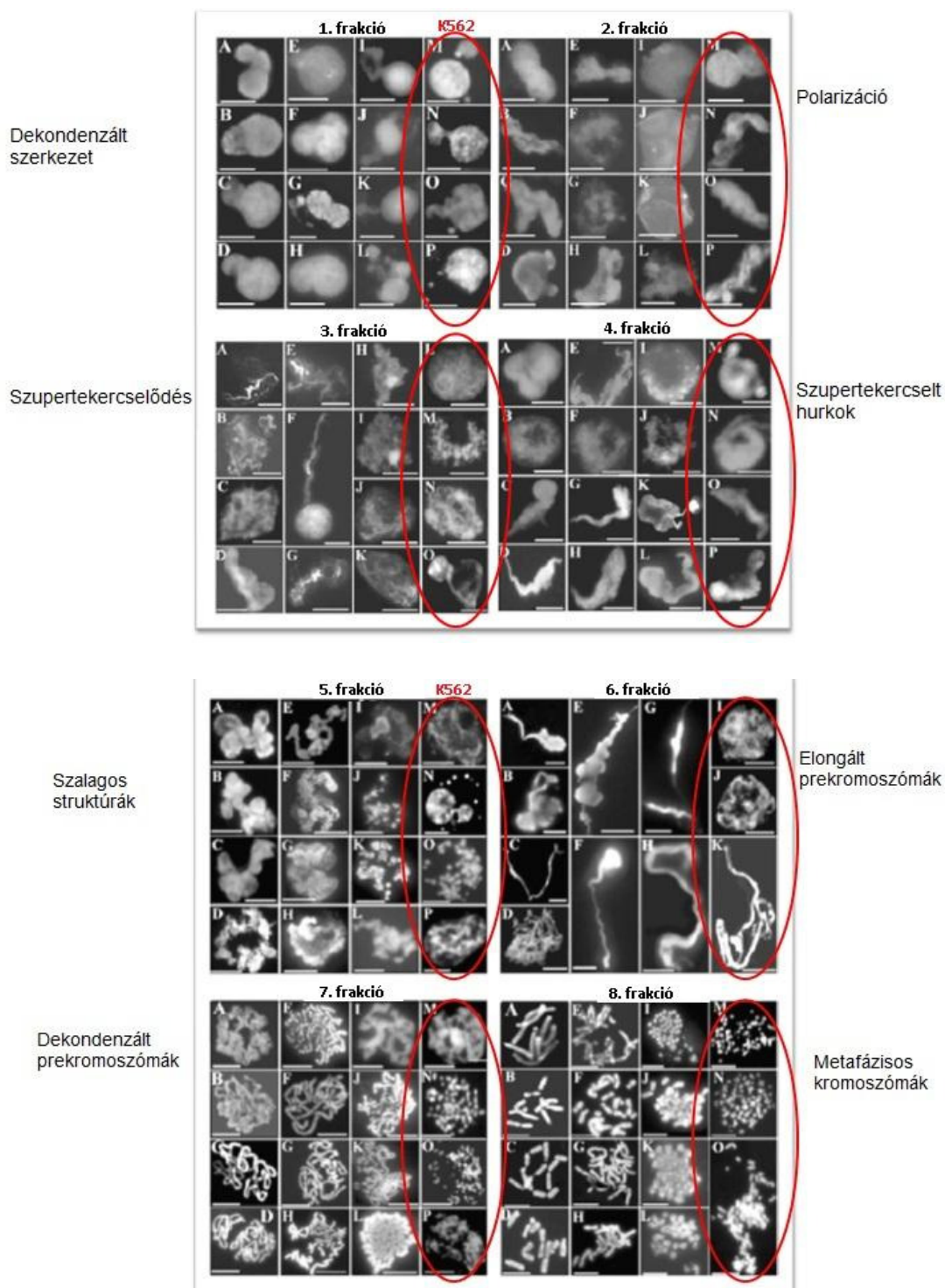
A 6. frakcióban lineáris elrendeződésű kromatin struktúrákat találunk. Gyakran a lineáris kromatinszálhoz, mint gerinchez asszociálódott dekonenzált kromoszómák

figyelhetők meg (6. frakció, A, D). Az előző frakcióban észlelt kondenzációs dinamika itt is megjelenik a kromatinszál végein (6. frakció, A). A 6. frakció B felvételén megfigyelhető hosszú kromatinszál gerincét vonallal jelöltük, míg végeit az elemzés során körrel jeleztük. A hurkok mellett nem találunk elkülöníthető kromoszómákat, ami egybevág azon megfigyelésünkkel, miszerint a kromatinszál kontinuitása egészen az elongált prekromoszómális stádiumig fennmarad (6. frakció, E). A késői S fázisban (7. frakció) láthatóvá válnak a kromoszómák ívesen, körkörös elrendeződött csoportjai. Ekkor már különálló kromoszómák is megfigyelhetők (7. frakció, E, G, H). Az utolsó szinkronizált populáció (8. frakció), mely az S-fázis végét, G2 fázist és a metafázist is reprezentálja kompakt, de még nem teljesen kondenzált kromoszómák mellett, metafázisos kromoszómák (8. frakció, H) is megjelennek (8. frakció, E-G). A lineáris elrendeződés még a metafázisos kromoszómáknál is megfigyelhető (8. frakció, J), (Bánfalvi és mtsai, 2006).

2.3.2 A kromatin kondenzálás általános sémája

Ezt az eljárást követve a különböző típusú és kromoszómaszámú sejtvonalakkal (kínai hörcsög ovárium (CHO, Chinese Hamster Ovary), indián szarvas (IM, Indian Muntjac), egér pre-B, humán eritroleukémia (K562) sejtek) végzett kísérletekben a kromoszóma kondenzációjának egy eddig ismeretlen általános biológiai folyamata volt megfigyelhető, mely során a kromoszóma szerkezet számos szerkezeti formája tárult fel. További vizsgálatokkal sikerült megkülönböztetni a különböző sejtvonalakon az interfázisos kromatin kondenzációjában egymást követő morfológiai stádiumokat, és megállapítható volt, hogy a kondenzálódás nem fajra specifikusan, hanem általános sémát követve zajlik le (9. ábra).

A DNS normál szupranukleoszómális szerveződésének feltárásán kívül a genotoxikus kezeléseket követően a kromatinban szerkezeti rendellenességeket sikerült feltárni (Bánfalvi és mtsai, 2006). Ezért a dolgozat egyik megválaszolandó kérdése az, hogy vajon a különböző genotoxikus ágensek speciális kromatin elváltozásokat okoznak-e a kezelést követően.



9. ábra A kromatin kondenzáció jellegzetes intermedierei oszloponként négy emlős fajban (A-D) indián szarvas sejt kultúra, (E-H) kínai hörcsög ovárium sejt kultúra, (I-L) egér pre-B sejt kultúra, (M-P) K562 humán eritroleukémia sejt kultúra (Vonal= 5 μ m) (Bánfalvi és mtsai, 2006).

3 Anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált vegyszerek és oldatok

1. Reverzibilis permeabilizáló szer:

9 mM Hepes, pH 7,4
5,8 mM DTT
4,5 mM MgCl₂
1 mM EGTA
4.5 % (w/w) dextrán T-150 (MS 75000)
48 ml H₂O (50 ml össztérfogatnál)

2. Duzzasztó (Swelling) puffer:

50 mM KCl,
10 mM MgSO₄,
3 mM dithiotreitol (DTT),
5 mM NaPO₄ puffer, pH 8,0

3. PBS puffer összetétele (pH 7.4):

137 mM NaCl,
2,7 mM KCl,
10 mM Na₂HPO₄,
1,8 mM KH₂PO₄

4. Rögzítő (fixáló) oldat

A kromatinszerkezet izolálásánál mindig frissen készített fixatív oldatot használunk, amellyel az izolált sejtmag átmosását végezzük (2x) (metanol-jégecet = **3:1** arányú keveréke)

5. Metafázisos blokk

kolcemid: 0.1 µg/ml, 10 µl/10⁶ sejt/ml (Boehringer termék)

6. Fluoreszcens festés

1. A 2,6-diamino-2-phenylindol (DAPI) a Braunschweig Chemie terméke. A fakulást gátló (antifade) médium komponensei: 1,4-diazobiciklo-(2,2,2)-oktán (90% w/w), 20 mM Tris-Cl, pH 8.0, 0.02% nátrium-azid és 25 ng/ml DAPI a kék fluoreszcens festéshez.

2. Propidium-jodid (PI): 50 µg/ml propidium-jodid (Sigma)

7. Replikatív DNS szintézis vizsgálata

A [^3H]-thymidine 5'-triphosphate (3.03 TBq mmol 134^{-1}) és a [^3H]-thymidine (2.86 TBq mmol 134^{-1}) izotópok beszerzési helye az ICN Isotope és Nuclear Division (Irvine, CA, USA).

3.2 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 (Luzzio és mtsai, 1983, Luzzio & Luzzio, 1975). 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, $2 \times 10^{-5}\text{M}$ β-merkaptotetanollal (Offer és mtsai, 2001), 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 sejt kultúrához T sejtenyesztő edényeket használtunk. Az egér pre-B 70Z/3-M8 és a CHO-K1 sejteket a kísérletek elvégzése előtt 24 órával frissen passzáltuk.

3.3 UVA, UVB kezelés

Philips UVB TL 20W/01 RS cső (2 db) keskeny frekvenciasávú

- Hullámhossz: 280-320 nm
- Sugárzás intenzitása: 710-770 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$
- Besugárzási időtartam:
 - elutriálásnál: 288 sec
 - további kísérletek: 72, 144, 216 sec
- Leadott dózis:
 - elutriálásnál: 24 J/m^2
 - további kísérletek: 2-25 J/m^2

- Sejtdenzitás: 10^7 sejt/ml PBS-ben felvéve

Philips UVA TLK 40W 10R

- Hullámhossz: 365 nm
- Besugárzási időtartam: 72, 144, 216 sec
- Leadott dózis: 2-25 J/m^2
- Sejtdenzitás: 10^7 sejt/ml PBS-ben felvéve

Az UVB kezelést megelőzően a sejteket, 15 órás logaritmus növekedési fázis után, majd PBS-sel való átmosást követően, 2-25 J/m^2 közötti UVB (280-320 nm), UVA (365 nm) sugárzásnak tettük ki, 10^7 sejt/ml sejtsűrűség mellett PBS-ben felvéve. A továbbiakban a kezelt sejteket 3 óráig RPMI-1640 tápfolyadékban, 10% FBS tartalom mellett regeneráltattuk.

3.4 Gamma sugárzás

A K562 szuszpenziós sejtkultúrát ^{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 logaritmus 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

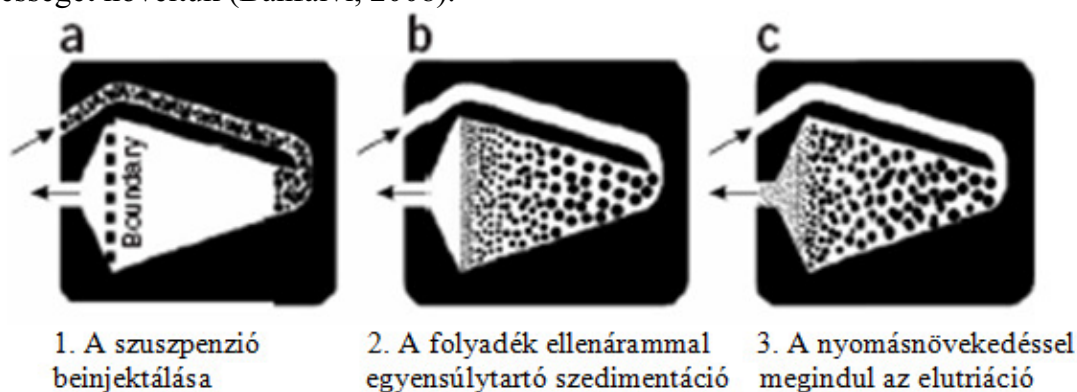
alkalmaztunk. Besugárzás után a sejteket 2 óráig inkubáltuk a szinkronizálás megkezdéséig. Minden esetben párhuzamos kísérlet folyt kontroll (kezeletlen) sejtekkel.

3.5 Nehézfémkezelés

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 $0.22\ \mu\text{m}$ -es steril filteren átszűrve sterilizáltuk, és készítettük el a hígítási sorokat. Minden esetben párhuzamos kísérlet folyt kontroll sejtekkel. A 24 órás kezeléseket logaritmikus fázisban lévő sejteken végeztük.

3.6 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 (10. ábra). Mi állandó centrifugális erő mellett az átáramoltatott folyadék sebességét növeltük (Bánfalvi, 2008).



9. ábra Az elutriáló kamra működési elve. A centrifugális erő balról jobbra, a folyadék áramlása jobbról balra hat az elutriáló kamrában lévő sejtekre. Ha a két ellentétes erő egyensúlyban van, a sejtek lebegnek a kamrában (Bánfalvi, 2008).

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) (10. ábra). 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.

3.7 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 (G_0/G_1 fázis) 4 C értékre (G_2/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 (Basnakian és mtsai, 1989).

3.8 ATP dependens replikatív DNS szintézis a permeabilizált sejtekben

A sejteket ($10^6/\text{ml}$) reverzibilisen permeabilizáltuk, majd *in vitro* DNS szintézist hajtottunk végre a replikáció szubsztrátjainak (dNTP) hozzáadásával (Bánfalvi és mtsai, 1997). Ez a vizsgálat a K562 sejtek radioszenzitivitásának meghatározását szolgálta UVB besugárzást követően. Mivel a K562 sejtek radioszenzitivitása alapvetően alacsonyabb a sejtvonallal szembenálló tulajdonságából fakadóan, így magasabb UVB dózissal kezeltünk ($15, 25 \text{ J/m}^2$) is alkalmaztunk. Az inkubációs keverék ($100 \mu\text{l}$) 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, $[^3\text{H}]dTTP$ -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 1 ml 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. A TCA-ban nem oldódó újonnan szintetizált DNS mennyiségét a permeabilis sejtekbe beépült radioaktív nukleotid alapján határoztuk meg.

3.9 $[^3\text{H}]$ timidin bejutása a sejtekbe

Az ép permeabilizálatlan K562 sejteket ($10^6/\text{ml}$) 0.5 ml RPMI 1640 médiumban szuszpendáltuk, majd 37 kBq $[^3\text{H}]$ 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.

3.10 Kromatinszerkezetek izolálása

3.10.1 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 /ml) 10% FBS tartalmú tápfolyadékban regeneráltuk 3 óráig a sejtenyésztesnek megfelelő körülményei között.

3.10.2 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 µg/ml kolcemides kezelés 2 óráig 5% CO₂-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.

3.10.3 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.

3.10.4 A kromatinszerkezet láthatóvá tétele

Az izolált, majd dehidratált kromatinszerkezeteket tartalmazó tárgylemezekre 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.

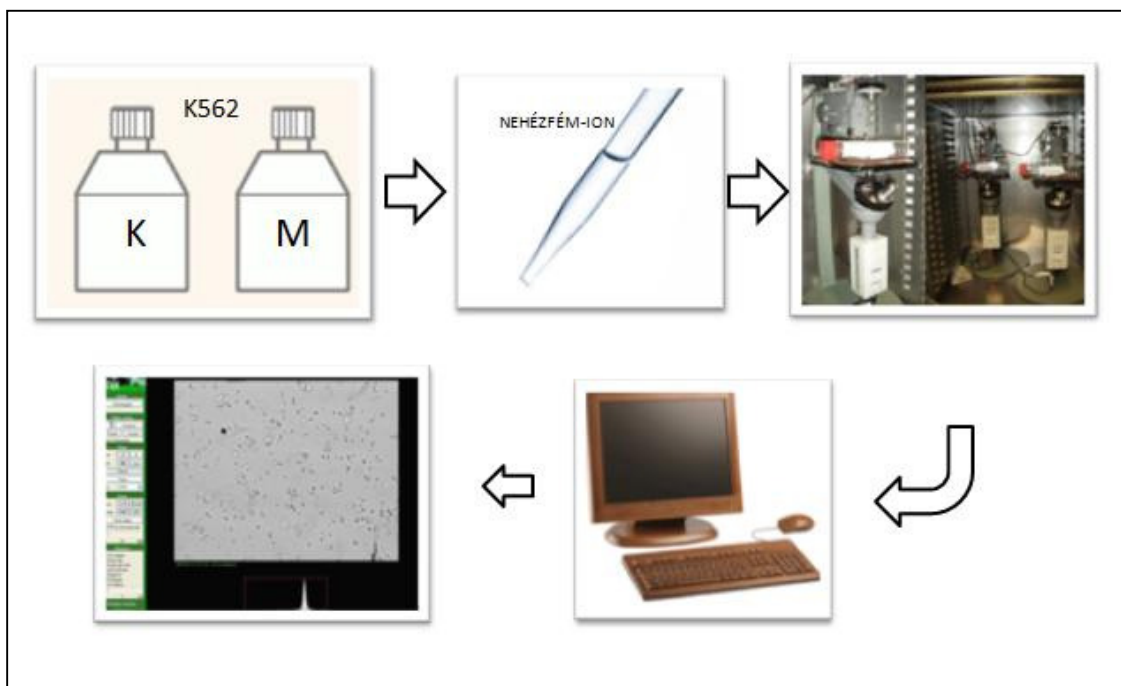
3.11 Adatok feldolgozása

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.

3.12 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, inverz fénymikroszkópokhoz csatlakoztatott kétkamerás rendszer, melyben a kontroll és a kezelt minták egyidejű megfigyelésére nyílik lehetőség standard (a sejtenyésztésnek megfelelő) körülmények között (11. ábra). 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 követhetők 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 sejthalál-formákat. A rendszer további előnye, hogy a több napos folyamat internet segítségével távoli, akár otthoni elérést is lehetővé tesz (Nagy és mtsai, in press).



11. ábra Long Term Scanning rendszer (LTS)

4 Eredmények

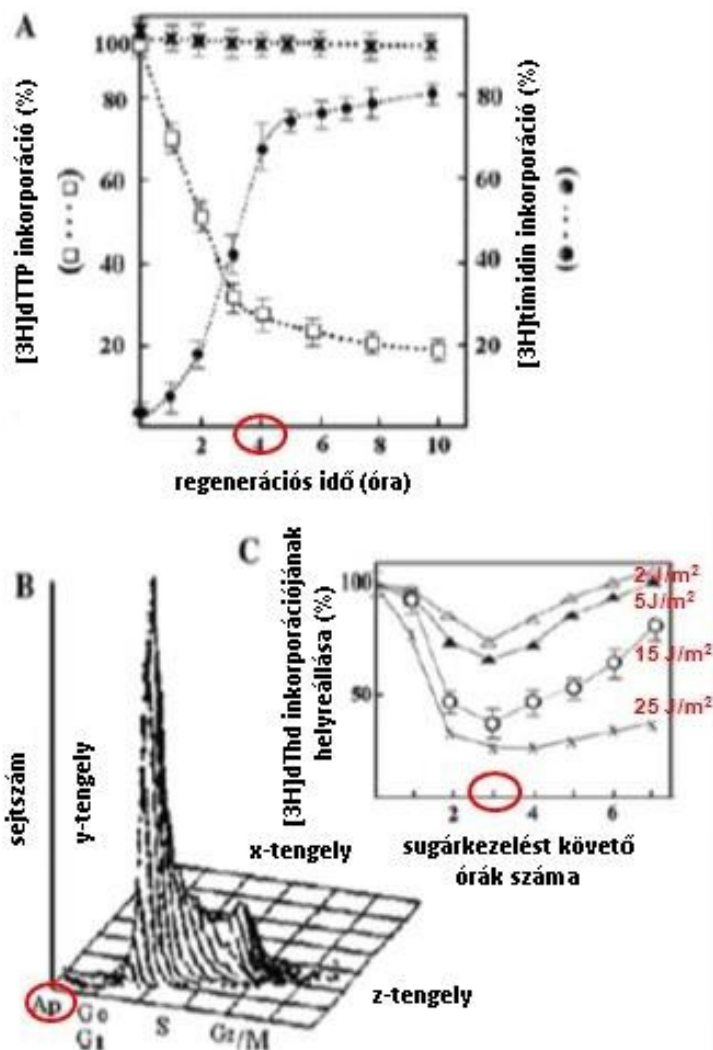
Korábban számos vizsgálathoz használtak nukleozidokat (pl. timidin, uridin), a kezeletlen sejtekben és sejtmagokban folyó aktív transzport folyamatok egymást követő lépéseinek megismerése érdekében (Castellot és mtsai, 1978). Eredetileg baktériumokban írták le, hogy a permeabilizált sejtekben történő DNS szintézis ATP jelenlétében hasonló a kezeletlen sejtek replikatív DNS szintéziséhez (Moses és mtsai, 1970). Munkacsoportunk korábban leírta, hogy permeábilis timociták sejtmagvaiban a 4 deoxiribonukleozid trifoszfát (dNTPs) ATP dependens inkorporációja replikatív mechanizmus szerint történik (Bánfalvi és mtsai, 1984). A DNS replikáció, annak inhibitorai révén gátolható, míg ATP hiányában a DNS építőköveinek összekapcsolódása repair szintézist tükröz (Bánfalvi és mtsai, 1997). Ezek az előzmények segítséget nyújtottak abban, hogy a reverzibilisen permeabilizált K562 sejtekben is követni tudjuk a DNS szintézis 2 típusát.

4.1 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 (12./A. ábra). 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. (12./A. ábra). A sejtek regenerálódásának ütemét követve azt tapasztaltuk, hogy a folyamat kezdetén a reverzibilis permeabilizálás sebessége gyors volt, majd 4 óra elteltével csökkent. A permeábilis 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 $[^3\text{H}]$ timidin-trifoszfát felvételének regisztrálásakor. A permeabilizált sejtek fokozatosan veszítették el a 4 deoxiribonukleotidot (dNTPs), beleértve a $[^3\text{H}]$ dTTP felvételének képességét, melyek csak permeabilis sejtbe képesek inkorporálódni (12./A. ábra).



12. ábra Reverzibilis permeabilizálás és a DNS-replikáció gátlása UVB sugárzást követően

(A) A kezeletlen K562 sejtek viabilitását tripán kék kizárásos teszt segítségével végeztük, és a teljes sejtszámot százalékban adtuk meg (x-x). A sejtek regenerálódása érdekében, a permeabilizált sejteket 10% FBS tartalmú RPMI 1640 médiumban vettük fel. Mértük a

$[^3\text{H}]$ timidin (●-●) és $[^3\text{H}]$ dTTP inkorporációjának (□-□) mértékét. A $[^3\text{H}]$ timidin inkorporációját a kezeletlen sejtek radioaktív nukleozid inkorporációjának százalékban fejeztük ki. A $[^3\text{H}]$ dTTP inkorporációt - mint a frissen permeabilizált sejtekbe a felvett $[^3\text{H}]$ dTTP-ot - százalékban adtuk meg. **(B)** A permeabilizált sejteket 3 órás regeneráció után flow citometriás vizsgálatnak vetettük alá, mellyel az apoptózis kialakulását teszteltük. **(C)** A 2-25 J/m² UV-sugárzást követően, a DNS szintézis helyreállásának mértéke látható, a kontroll sejtekhez képest. Megfigyeltük a $[^3\text{H}]$ timidin ($[^3\text{H}]$ dThd) inkorporációját a következő UVB dózisok után: 2 J/m² (Δ-Δ), 5 J/m² (▲-▲), 15 J/m² (○-○), 25 J/m² (x-x)

4.2 UVB sugárzást követő flow citometriás analízis

Az exponenciálisan növekvő K562 sejtpopulációt növekvő dózisu (6-24 J/m²) UVB sugárzásnak tettük ki, melyből a 12./B. ábra csak a 24 J/m² dózisu UVB sugárzásnak kitett populációt mutatja. A sejteket ezután 3 órás regenerációs időre visszahelyeztük az 5% CO₂-tartalmú 95% relatív nedvességtartalmú, 37 °C-os inkubátorba. A kisméretű apoptotikus sejtek hiánya, melyet az 12./B. ábrán is láthatunk, 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 (ábrán nincs feltüntetve).

4.3 A nukleozid inkorporáció helyreállása a sugárzást követően

A K562 sejteket növekvő dózisu UVB sugárzásnak tettük ki (2-25 J/m²). Megmértük a $[^3\text{H}]$ timidin inkorporációját ép és kezeletlen sejtekben és sugárzás után is (12/C. ábra). Ez alapján, az alacsony dózissal (2 és 5 J/m²) kezelt sejtek DNS szintézisének mértéke fokozatos regenerációt mutatott 3 órával a kezelést követően. A magasabb dózisu UVB sugárzás (15 J/m²) után részleges (80%) regenerálódás történt. Míg azok a sejtek, amelyek a legmagasabb dózisu sugárzásnak lettek kitéve (25 J/m²), nem voltak képesek helyreállítani a DNS szintetizáló képességüket.

4.4 Az ultraibolya B 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 dózissal, 254 nm hullámhosszú UV sugárzást követően (Cleaver, 1982, Klein és mtsai, 1976). A kezelési dózis függvényében meghatározható a K562 sejtek sugárérzékenysége, amely magasabb dózissal 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 dózissal, 280 nm hullámhosszúságú ultraibolya 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.

Inkubációs keverék	DNS szintézis aktivitás a sejtekben	
	Kezeletlen sejtek (%)	UVB sugarazott sejtek (%)
Összes	100	$35,2 \pm 3,6$
dNTP-k nélkül ($-d\text{ATP}$, $-d\text{GTP}$, $-d\text{CTP}$)	$8,6 \pm 1,1$	$9,2 \pm 1,2$
Plusz novobiocin 1 mM	$2,0 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$
ATP nélkül	$19,7 \pm 2,6$	$31,6 \pm 3,4$

I. táblázat. *ATP dependens replikatív DNS szintézis és ATP independens repair DNS szintézis vizsgálata, kontroll és besugárzott, permeabilis K562 sejtekben*

Az anyagok és módszerek című fejezetben leírt protokoll szerint mértük a $[^3\text{H}]d\text{TTP}$ inkorporációt. A DNS szintézis végbement mind a kezeletlen kontroll, mind az UVB sugárzással kezelt sejtekben. A DNS szintézis aktivitásának mértékeként (100%) az UVB sugárzásnak ki nem tett, frissen permeabilizált sejtek szolgáltak, melyek DNS szintézise

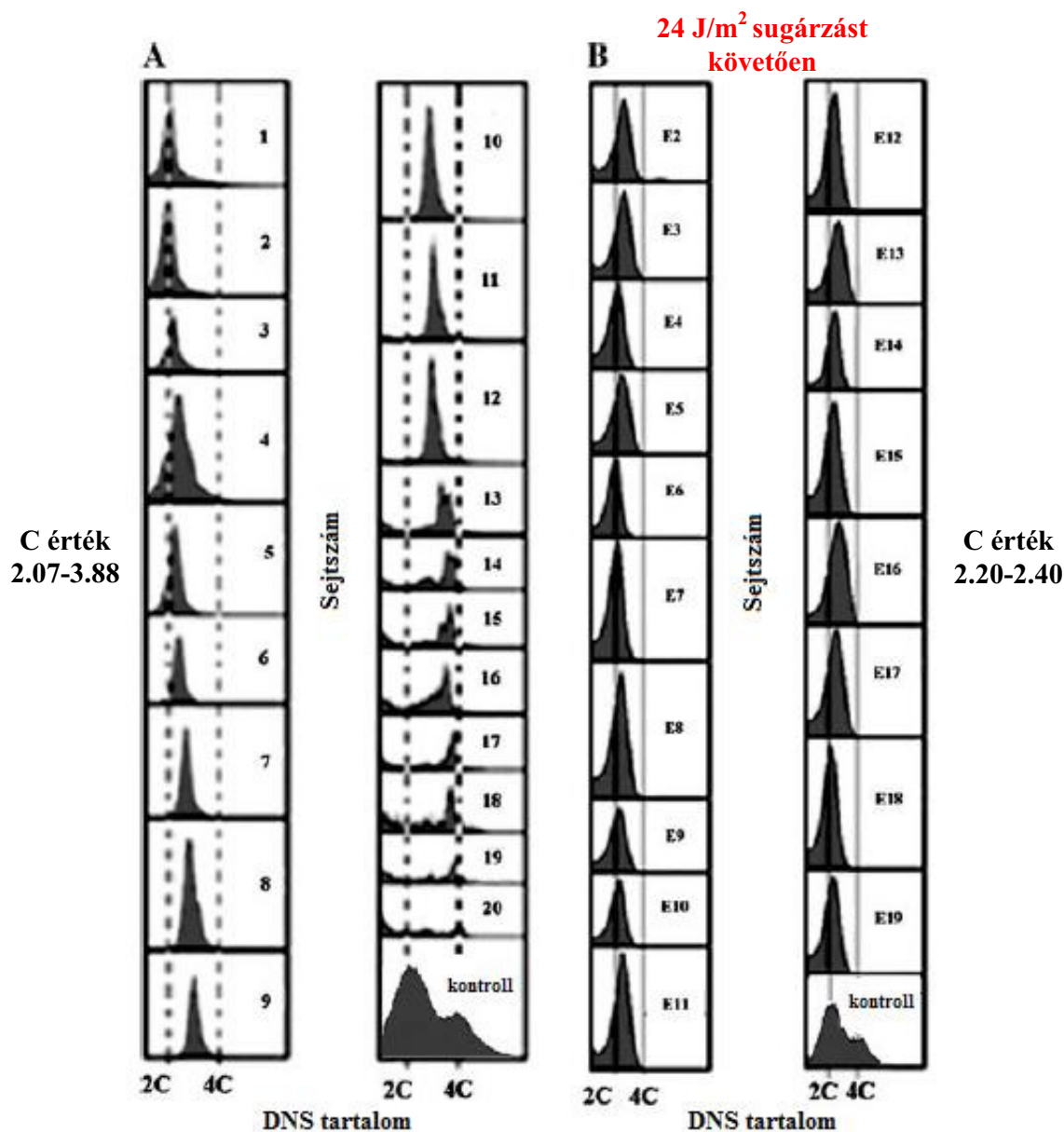
komplett inkubációs elegyben (dNTP, és ATP jelenlétében) történt. Az értékek három mérés átlagai.

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 (Dresler és mtsi., 1983) azzal, hogy tönkreteszi a mitokondriális szerkezetet (Downes és mtsi., 1985). 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. Az I. táblázat világosan szemlélteti a kezeletlen sejtekben zajló replikatív DNS szintézis ATP szükségletét. A permeábilis sejtekben, melyek nem lettek sugárkezelésnek alávetve, a 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.

4.5 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 (13./A. ábra). A besugárzott sejtek (24 J/m^2) flow citométeres ábráit is kiértékeltek, ám a C értékek 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 (13./B. ábra).



13. ábra Centrifugálós elutriálással szinkronizált sejtpopulációk flow citometriás analízise UVB sugárzás előtt és után.

A K562 sejteket 24 J/m² UVB sugárzás után elutriáltuk. PI-os festést követő FACS elemzés után, a különböző elutriálással nyert frakciók sejtciklus-mintázatát láthatjuk, (A) kezeletlen és (B) kezelt K562 sejtekben.

4.6 Kezeletlen és UVB sugárzásnak kitett sejtek frakcióinak kromatin szerkezete

A II. táblázatban is jól látható, hogy 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.

Frakció	Áramlási sebesség	Kezeletlen sejtek		UVB sugárzással kezelt sejtek	
		C érték	Kromatin szerkezetek	C érték	Kromatin szerkezetek
2	21,5	2,07	n.s.	n.d.	dekondenzált fibrózus kromatin
4	23,5	2,2	dekondenzált kromatin	n.d.	polarizált fibrózus kromatin
6	25,5	2.49	szupertekercselt kromatin	n.d.	fibrózus szerkezet
8	27,6	2.74	fibrózus kromatin	n.d.	csavart fibrózus szerkezet
10	29,7	2,97	kromatin szálak	n.d.	csavart fibrózus szerkezet
12	31,9	3,24	kromatin testek	n.d.	csavart fibrózus szerkezet
14	34	3,5	megnyúlt prekromoszómák	n.d.	csavart fibrózus szerkezet
16	36,1	3,72	prekondenzált kromoszómák	n.d.	csavart fibrózus szerkezet
18	38,3	3,88	kondenzált kromoszómák	n.d.	csavart fibrózus szerkezet

II. táblázat. Szinkronizált K562 sejtek elutriálása

A sejteket 1.5×10^5 /ml sejtsűrűségtől kezdtük el növeszteni 1200 ml médiumban, majd 12 óra múlva 2.4×10^5 /ml denzitást értünk el. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük (500g, 5 perc, 4°C). A sejteket (1.8×10^8) 20 ml 1% FBS-t tartalmazó RPMI 1640 médiumban vettük fel, majd bevezettük a sejteket az elutriátor kamrájába 13 ml/perc kezdeti áramlási sebességgel. A sejtek (1.8×10^8) elutriálását elvégeztük egy előzetesen 24 J/m^2 erősségű UVB sugárzásnak kitett populációval is. Az elutriálást egy Beckman J21 típusú centrifugával 20°C -on, 1850 rpm fordulatszámon végeztük.

Elutriált sejtmenyiség: 1.8×10^8 sejt

n.d= not determined (nem meghatározott)

n.s= not specified (nem speciális)

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.

4.7 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.

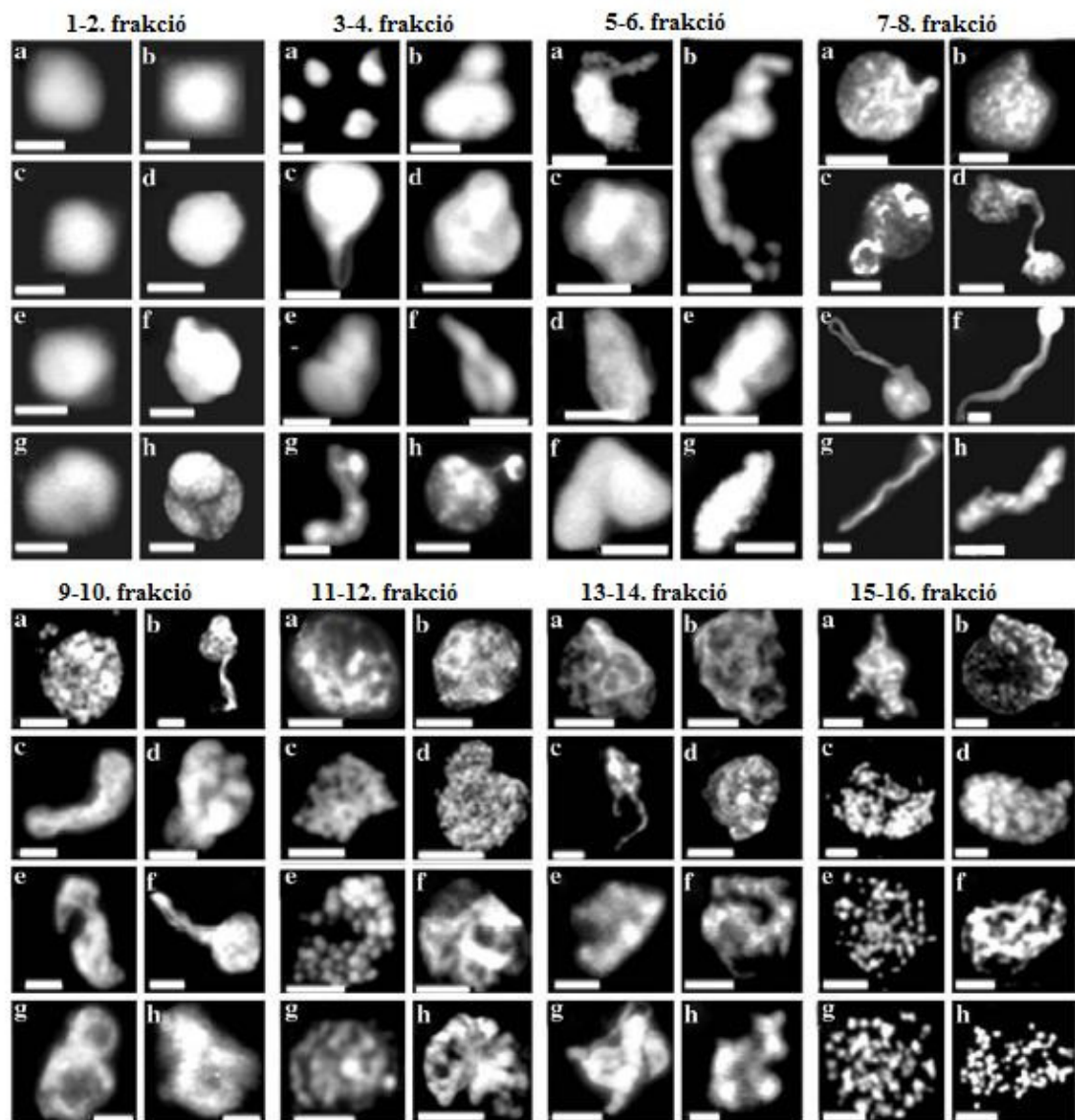
b) Permeabilizálás után, ha a regenerálási lépés elmarad, ragadós alaktalan kromatin massa alakul ki, melyet szintén nem vizsgáltunk.

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. Ezeket a szerkezeteket a 14. ábra összegzi (elutriált frakciók, 1-16).

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 polarizált, 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.



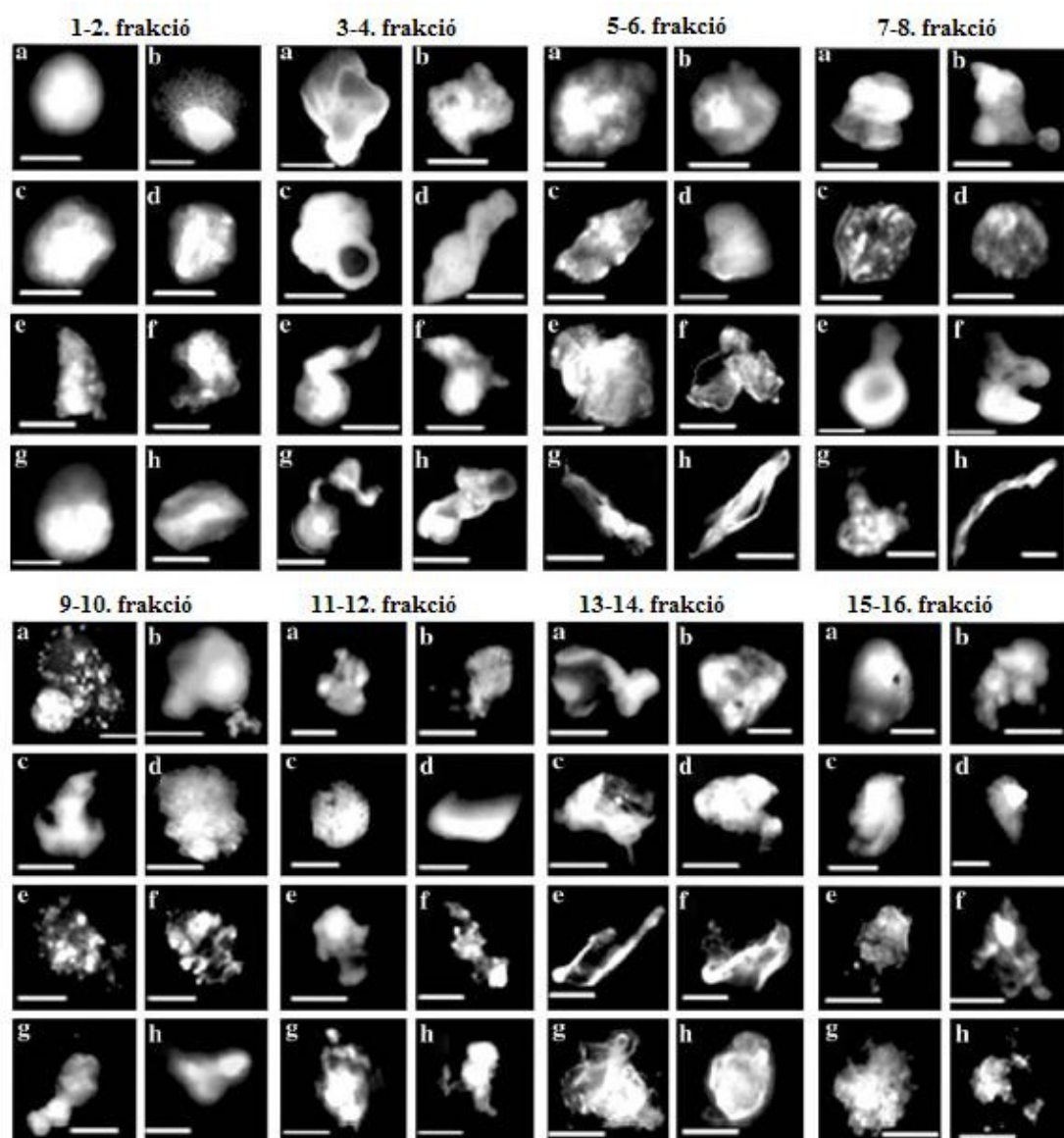
14. ábra A kromatin kondenzálás intermedierjei kontroll K562 sejtekben

Az elutriálás után a sejtek szubpopulációinak permeabilizálását a sejtek regenerálása követte, mellyel a sejtmembrán integritása megőrizhető. Ezek után a kolcemides kezelés, majd a sejtmag izolálása következett. Az egyes frakciókra jellemző struktúrák: **1-2. frakció**; fátýolszerű kromatin, **3-4. fr.**; polarizált kromatin fátýol, **5-6. fr.**; kromatin hurok, **7-8. fr.**; kromatin szalag, **9-10. fr.**; szupertekercselt kromatin szalag, **11-12. fr.**; kromatin testek, **13-14. fr.**; korai elongált kromoszomális formák, **15-16. fr.**; prekondenzált korai kromoszómák. A magképletek láthatóvá tételéhez PI-os festést alkalmaztunk. Minden jelzés 5 μm -nek felel meg.

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).

4.8 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 (15. ábra). Az S fázis korai szakaszában megjelenő fibrilláris szerkezetek jóval dekonzenzáltabbak, mint a kezeletlen sejtek esetében, illetve a kromatin polarizálódása hamarabb elkezdődik, ugyanazt a frakciót nézve (15. ábra, 1-2. frakció). Az elongált kromatin formák korábban megjelennek (3-4. frakció), ám a további elongáció folyamata 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).

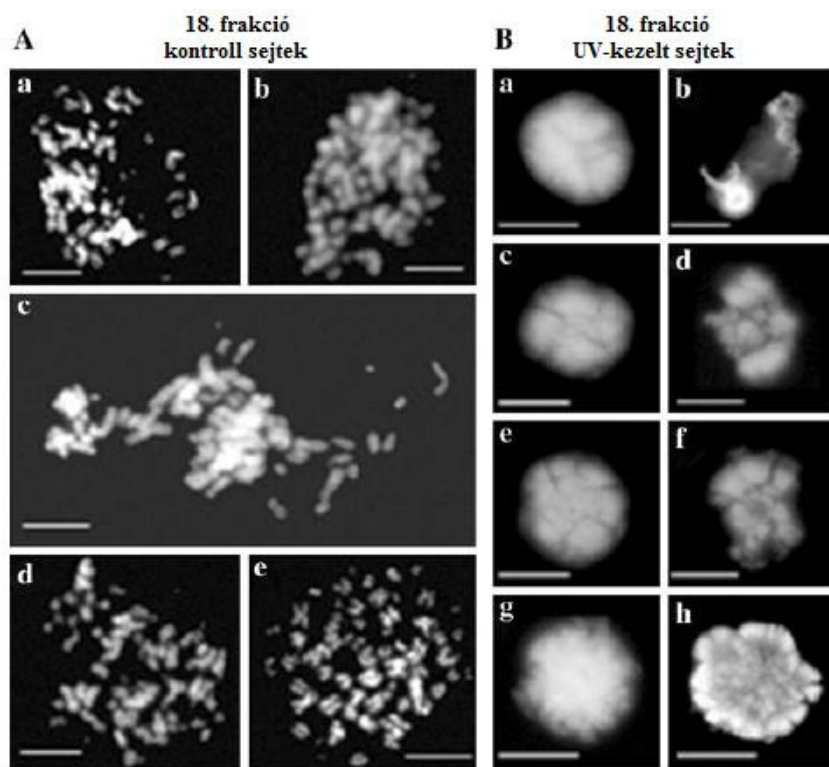


15. ábra A kromatin struktúra változásai UVB sugárzást követően

A K562 sejteket 24 J/m^2 UVB sugárzás után 1 órát inkubáltuk, majd elutriáltuk, és reverzibilis permeabilizálás után inkubáltuk, miközben kolcemides kezelést alkalmaztunk. Ezek után izoláltuk a kromatin struktúrákat. Egy fibrilláris kromatin háló veszi körül az 1-16. frakciók kromatin szerkezeit. Tökéletlen átmenet jellemzi a fibrilláris szerkezetről fibrózus szerkezetre való váltást. Kromoszómális formák kialakulása nem jellemző. A magképletek láthatóvá tételéhez PI-os festést alkalmaztunk. Minden jelzés $5 \mu\text{m}$ -nek felel meg.

4.9 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 (16. ábra). 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.



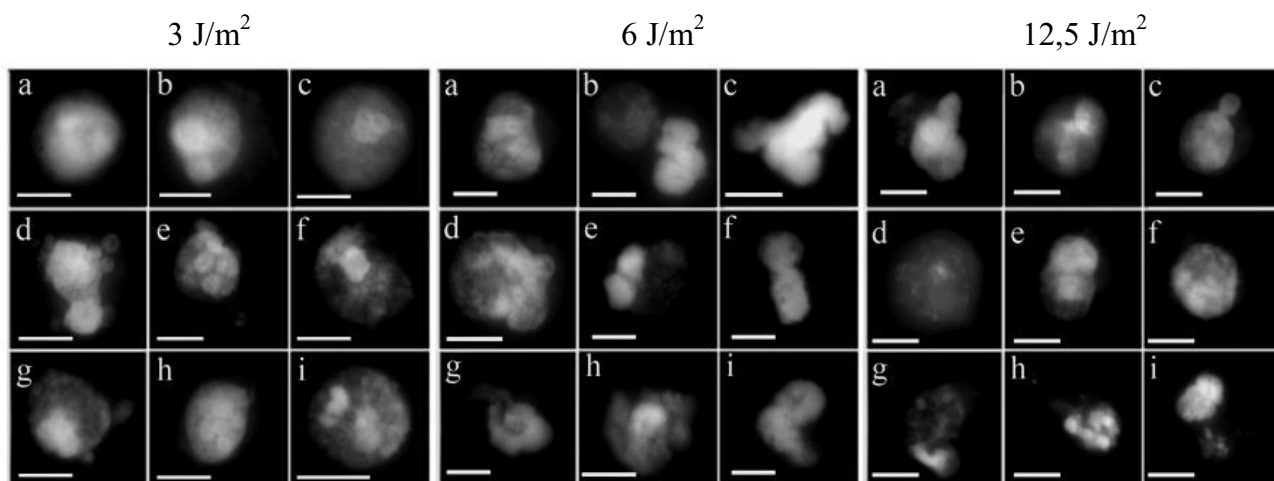
16. ábra A kromatin kondenzáció folyamatának összehasonlítása kezeletlen és UVB kezelt (24 J/m^2) sejtek között a kései S fázisban

A kezelt és kezeletlen sejtek utolsó frakciói (mindkettő esetben a 18. fr.) az anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint permeabilizálódtak, regenerálódtak, kolcemides kezelésnek vetettük alá a sejteket, végül a kromatin struktúrákat izoláltuk, és mikroszkóposan vizsgáltuk. **(A)** Tökéletes kromoszómaformák a kezeletlen sejtmagokban. **(B)** A kromatin állomány szegregációja kromoszómaformák kialakulása nélkül a kezelt sejtmagokban. A magképletek láthatóvá tételéhez PI-os festést alkalmaztunk. Minden jelzés $5 \mu\text{m}$ -nek felel meg.

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

4.10 Az UVB és UVA sugárzás okozta elváltozások összevetése

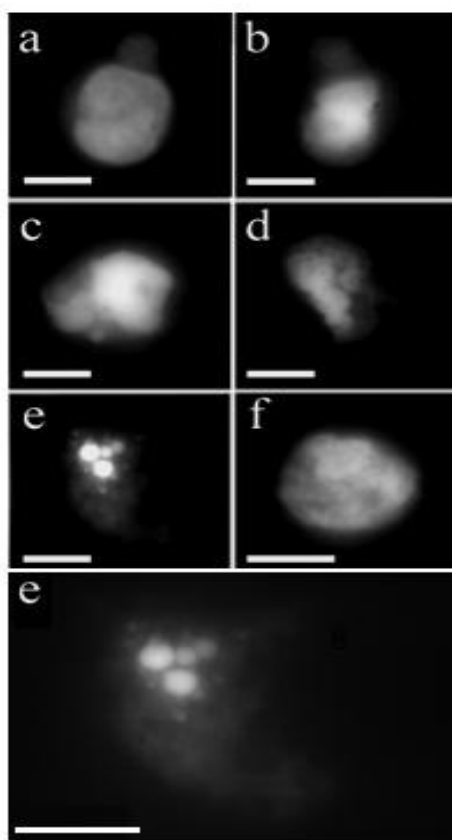
Az UVB sugárzással végzett kísérlet eredményeihez hasonlóan azt tapasztaltuk, hogy az UVA sugárzás gátló hatásának mértéke a besugárzott időtartamtól függ. 25 J/m² alatti dózis esetén (3, 6, 12,5 J/m²), kezdetben a sugárzás a DNS szintézis sebességét csökkenti, ezáltal a sejtciklusra kifejtett részleges gátló hatása érvényesült, amiből a sejtek többsége képes volt regenerálódni.



17. ábra A 3 J/m², 6 J/m², 12,5 J/m² dózisú UVA sugárkezelt sejtek kromatin szerkezete

A magképletek láthatóvá tételéhez PI-os festést alkalmaztunk. Minden jelzés 5 µm-nek felel meg.

A DNS repair mechanizmusa, ha csak részlegesen is, de képes a DNS károsodást helyreállítani. A kromatinszerkezetek elemzése során apoptotikus testek előfordulása nem volt jellemző (17. ábra). Ezzel szemben a magas dózisú (25 J/m²) sugárzást követően a K562 sejtek már nem képesek regenerálódni, és vélhetően apoptózist szenvednek (18. ábra, e). 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 (18. ábra). 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 kondenzálásában játszott szerepének tisztázása.

18. ábra 25 J/m² dózisú UVA sugárkezelt kromatinszerkezetek

A magképletek láthatóvá tételéhez PI-os festést alkalmaztunk. Minden jelzés 5 μm-nek felel meg.

4.11 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 kromoszómális 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 (Bánfalvi és mtsai, 2007). Egér pre-B sejtekkel végzett korábbi kutatási eredményeket megerősítve (Nagy és mtsai, 2004), hasonló eredményeket kaptunk a gamma sugárzást követően, CHO sejtekkel végzett kísérlet során is (Bánfalvi és mtsai, publikálatlan eredmények) A γ -sugárzás és az UVB sugárzás hatása közötti különbségeket a III. táblázat foglalja össze.

biokémiai és morfológiai változások összehasonlítása a kezeltlen sejtekkel	gamma sugárzás (CHO, K562, egér pre-B sejtek)	UVB sugárzás (K562 sejtek)
replikatív DNS szintézis	gátolt	gátolt
repair DNS szintézis mértéke	emelkedett	emelkedett
sejtméret	növekedett	növekedett
sejtmagméret	növekedett	növekedett
apoptotikus sejt (zsugorodás)	sok	nincs
C érték az S fázis során	alacsonyabb	egyfomán alacsony
a C érték növekedésének megkezdése az S fázis során	2.4 C	2.2-2.4 C
a kromatin jellemző kondenzáltsági foka	fibrózus	fibrilláris
apoptotikus testek kialakulása	sok	néhány
metafázisos kromoszómák jelenléte	látható	nem látható

III. táblázat A gamma és az UVB sugárzás hatása a sejtekre

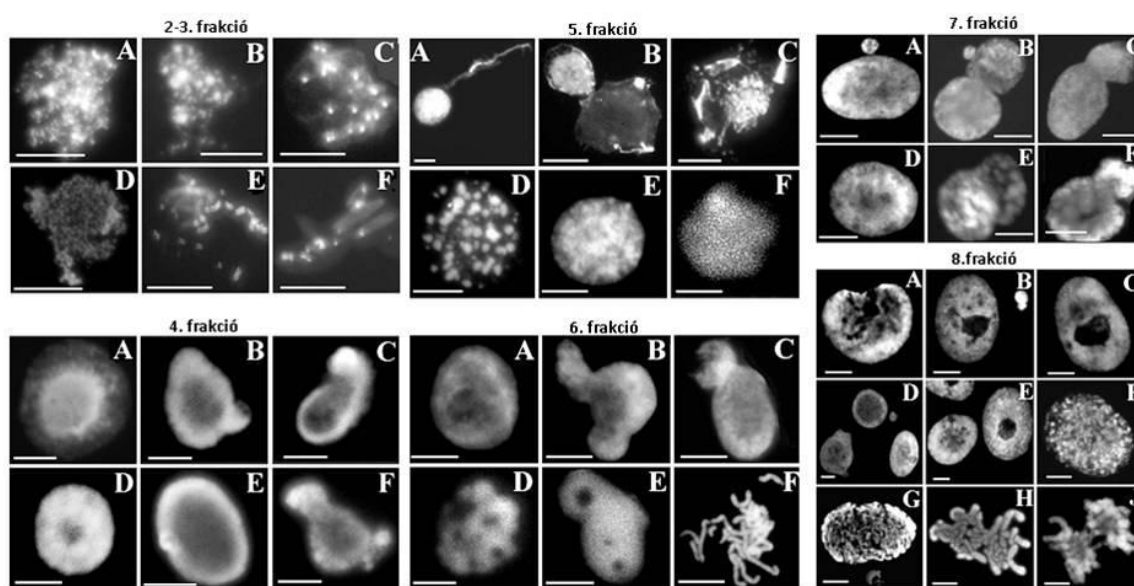
4.12 Kondenzációs ujjlenyomat (fingerprint)

Korábbi kísérletek eredményeire alapozva tovább bővítettük a hatásvizsgálatok palettáját mind sejtípus, 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 $1 \times 10^6/\text{ml}$ sejt denzitással, logaritmusos fázisban lévő sejtpopulációkkal dolgoztunk, illetve azonos körülmények között végeztük a kísérleteket, amelyet az Anyagok és módszerek c. fejezet részletesen leír.

4.13 Kadmium-klorid (CdCl_2)

A $1 \mu\text{M}$ kadmium-kloridos kezelést követően szinkronizált CHO, illetve egér pre-B sejtek esetében is (19. ábra) a jellemző morfológiai elváltozás a nagyméretű lyukak kialakulása a sejtmembránon. Részletesen a CHO sejtek módosult kondenzációs sémáját taglalom.



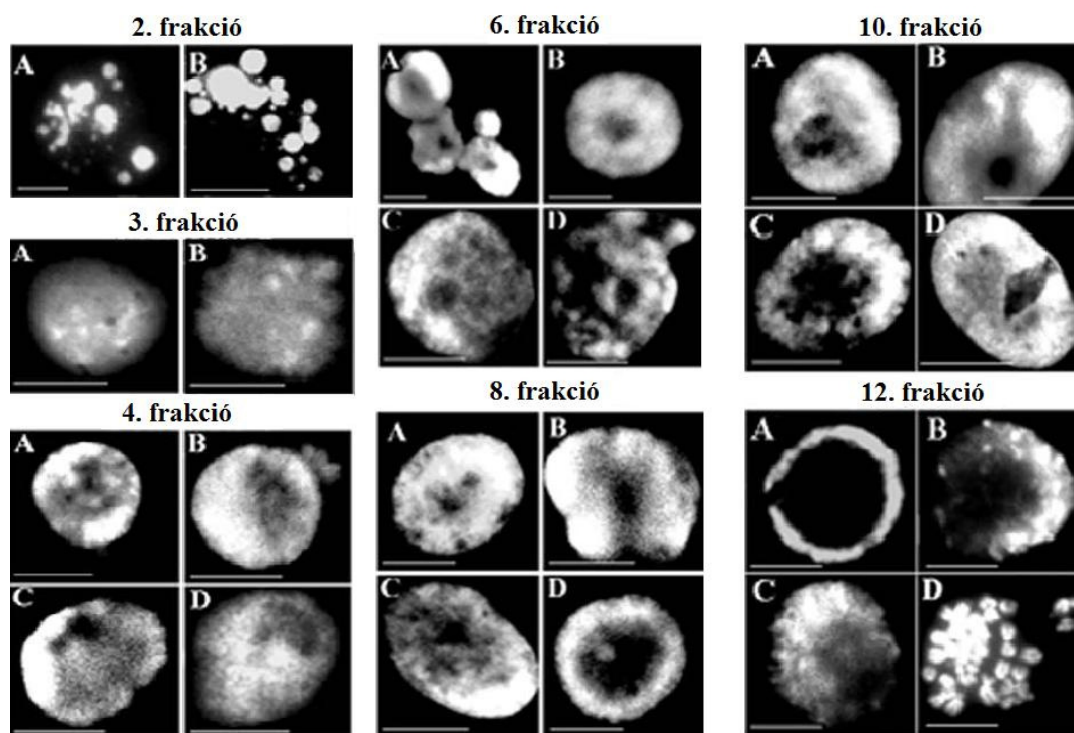
19. ábra $1 \mu\text{M}$ kadmium-klorid okozta kromatin változások CHO sejtekben az S fázis korai szakaszától az M fázisig (festék: DAPI, jelzés: $5 \mu\text{M}$ -nek megfelelő minden képen) (Bánfalvi és mtsai, 2005)

Már az S fázis korai szakaszában megfigyelhetők az apoptotikus testek, amelyek prekondenzált kromoszómákhoz hasonló morfológiát mutatnak (19. ábra, 2-3. frakció, A-F). 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 kilöködött 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 (A-C) és kromatin testek (D, E) kialakulása látható az S fázis középső szakaszában, amely megfelel a normális intermediereknek ebben a

fázisban. Ezzel szemben a fibrilláris kromatin a korábbi stádium jellemző intermedierje (F).

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 (B-E), valamint elongált kromoszómakezdemények (F) láthatóak. A 7. frakcióban kilökődött kromatin testek (A, B), nagyméretű extranukleáris perikromatikus granulumok (E, F), megnyúlt sejmagok figyelhetők meg. (B, C). A 8. frakcióban jellemző a széttöredezett magmembrán nagyméretű lyukakkal (A-E), megnyúlt kromoszómaformák (F, G) ragadós elongált kromoszómák (H, J) (Bánfalvi és mtsai, 2005).

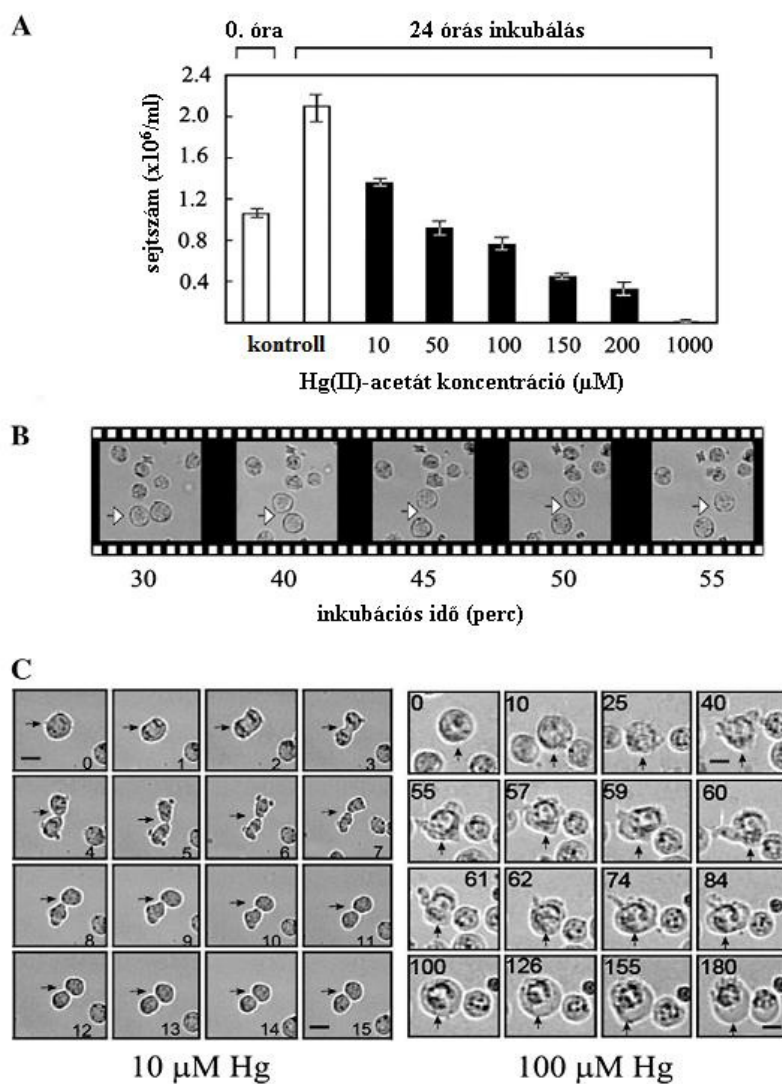
Ezeket az eredményeket figyelembe véve további toxikus ágensek által okozott morfológiai változások vizsgálatát végeztük el.



20. ábra $1 \mu\text{M}$ kadmium-klorid okozta kromatin változások egér pre-B sejtekben az S fázis korai szakaszától az M fázisig
2-4. fr.: korai S fázis, 6-8. fr.: középső S fázis, 10-12. fr.: kései S fázis (festék: DAPI, jelzés: $5 \mu\text{M}$ -nek megfelelő minden képen) (Bánfalvi és mtsai, 2007)

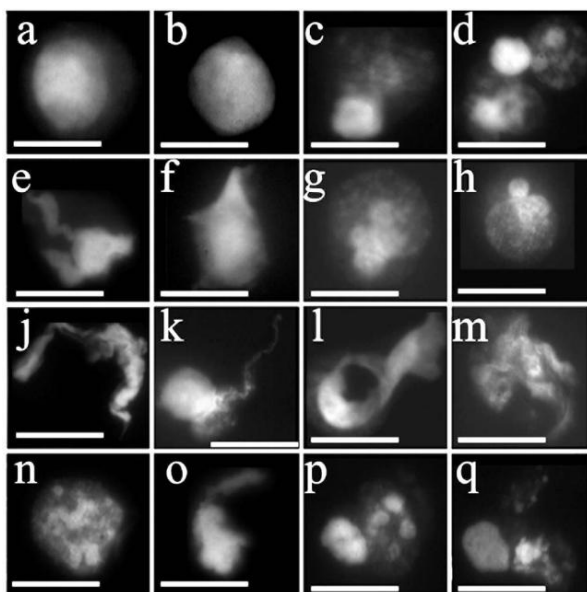
A kadmium-klorid kromatin szintű hatására bekövetkező elváltozások különböző sejttípuson is azonosak voltak. Ebből arra következtettünk, hogy egyéb toxikus anyagoknak is lehetnek specifikus kromatotoxikus bélyegei. A további vizsgálatok fényt derítettek, arra, hogy a genotoxikus ágenseknek vannak hasonló 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.

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



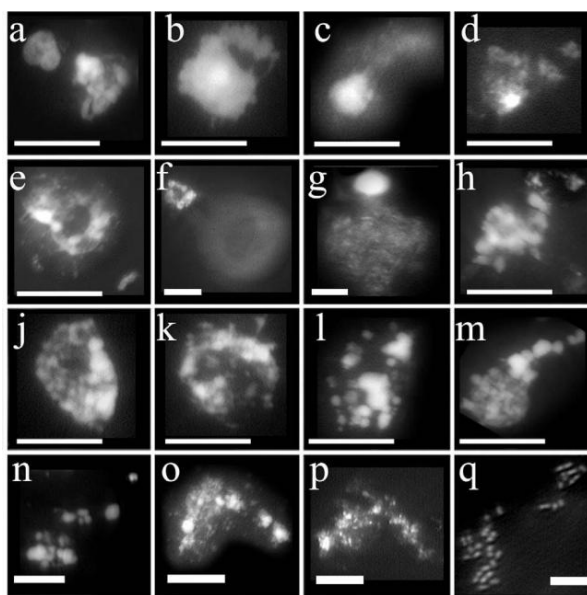
(A) $10^6/\text{ml}$ kezdeti denzitású sejtkultúrák 24 órás inkubálása után meghatározott sejtszámok kontroll tenyészetben, illetve 10, 50, 100, 150, 200, 1000 μM $\text{Hg}(\text{II})$ -acetát jelenlétében. (B) Sejtmozgás vizsgálata 10 μM $\text{Hg}(\text{II})$ -acetát kezelés után (fehér nyíllal jelölve). A sejtek pozíciója a 45. percet követően változatlan, a sejtek elpusztultak. (C) 10 μM $\text{Hg}(\text{II})$ -acetát kezelést követően apoptotózisból kifolyó sejtméretcsökkenés (bal panel), 100 μM $\text{Hg}(\text{II})$ -acetát kezelés után a nekrozis hatására sejtméretnövekedés jellemző (jobb panel).

21. ábra *In vitro* $\text{Hg}(\text{II})$ -acetát kezelés sejtciklust gátló hatása a K562 sejtekre



22. ábra $1\mu\text{M}$ -os subtoxikus Hg(II) -acetát kezelés (festék: DAPI, jelzés: $5\mu\text{m}$)

(21./A ábra). Szubtoxikusnak az $1\mu\text{M}$ és az alatti koncentráció tekinthető, ahol nem



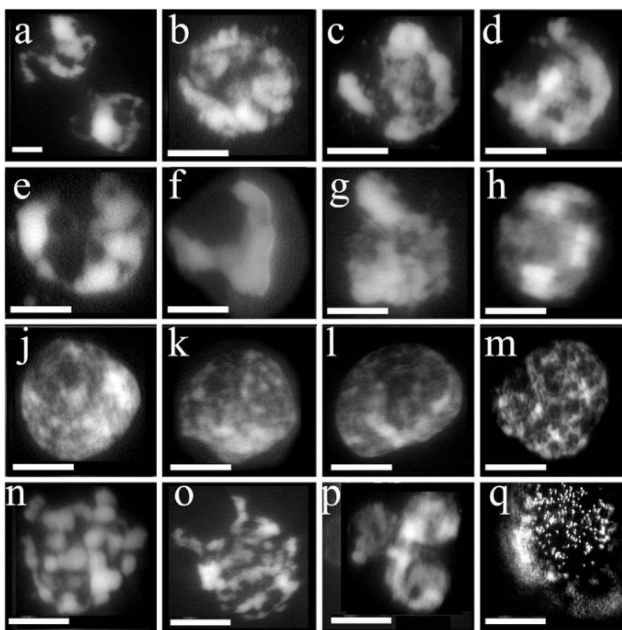
23. ábra $10\mu\text{M}$ -os Hg(II) -acetát kezelés apoptotikus hatása (festék: DAPI, jelzés: $5\mu\text{m}$)

perc kezelés után a sejtek egymáshoz viszonyított helyzete nem változik, a sejtek mozdulatlanokká válnak (21./B ábra). A sejthalál két típusát a 21./C ábra mutatja. Az apoptotikus folyamat az ábra bal oldali panelén látható, amely $10\mu\text{M}$ higany-acetát hatására már 15 percen belül bekövetkezik, míg a nekrosis jelenségét a jobb panel

A humán K562 sejteket 1.2×10^6 denzitás mellett, 25 ml térfogtu tenyésztőedényben, 37°C -on, 5%-os CO_2 inkubátorban vizsgáltuk 24 óras 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 $1000\mu\text{M}$ -os koncentrációjú Hg(II) -acetát jelenlétében. Az ágens koncentrációjával arányosan, a sejtek 52, 56, 63, 78, 85, valamint több mint 99 %-a pusztult el

észelhető csökkenés a sejtek életképességében. Egyedi sejteket vizsgálva, a $10\mu\text{M}$ -os kezelést követően, osztódás közben kialakuló apoptotikus haláltánc jelensége figyelhető meg, mely HaCaT sejtek ólom kezelésére emlékeztetett (Nagy és mtsai, közlésre elfogadva). Jelentős eltérést a többi nehézfém kezeléshez képest az jelentette, hogy Hg(II) -acetát hatására már a 45. perc után leállt a sejtek mozgása. A mikroszkópos felvételen a fehér nyíl mutatja, hogy 45

prezentálja, 100 μM -os kezelésnél, ahol a sejtek a nekrozisnak megfelelően hatalmas méreteket öltenek. Ennél a koncentrációnál a sejtmozgás hiánya szembeszökő.



24. ábra 100 μM -os Hg(II)-acetát kezelés nekrotikus hatása
(festék: DAPI, jelzés: 5 μm)

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 (22. ábra a-q). A felvételeken fibrilláris háló vonja be a kromatin szerkezeteket.

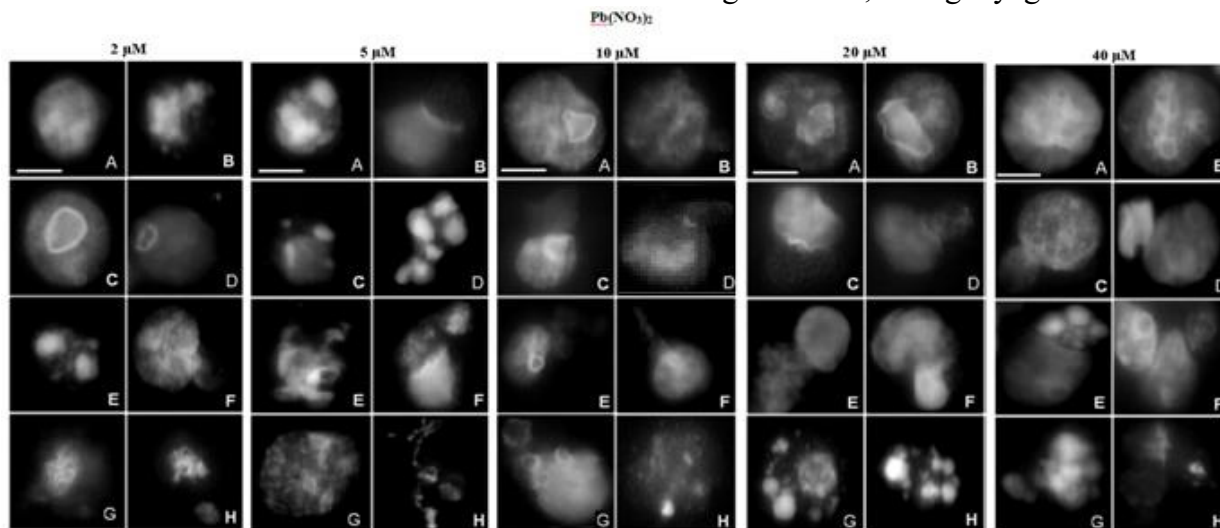
A kromatin elváltozások érzékenységét mutatja, hogy míg más módszerekkel az 1 μM -os Hg(II)-acetát koncentráció még szubtoxikusnak mutatkozott, kromatin szinten már megjelent a toxikus hatás. Az alacsony koncentrációjú (23. ábra, 10 μM) kezelések 3 fokozatosan súlyosbodó apoptotikus elváltozásokat okoznak, a; a kromatin polarizálódása (a-e) és lyukak megjelenése a nukleusz membránján (e, f, h, j, k), b; a kromatin felbomlása (a-e) és c; apoptotikus testek kialakulása (h-q). 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 (21./C jobb panel, 24. ábra). 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 (Bánfalvi és mtsai, 2006). 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 (24. ábra, q).

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 (Farkas és mtsai, 2009).

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

A 2-40 μM koncentrációjú ólom-nitráttal kezelt K562 sejtekre jellemző (25. ábra), hogy 2 és 5 μM -os kezelést követően, az S fázis korai szakaszában tömör, köríves, szalagos kromatin formák (2 μM , D, E, F) jelennek meg. Az S fázis középső szakaszában fibrózus kromatin (2 μM , C), vékony és vastag kromatin szálak (2 μM , G, H; 5 μM , B, E, F, H) 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



25. ábra A ólom-nitrát hatása K562 humán sejtek kromatin kondenzálására (2-40 μM)

Jellegzetes alak pl.: 2 μM : C, 10 μM : A, 20 μM , 40 μM : B

(festék: DAPI, vonalméret: 5 μM)

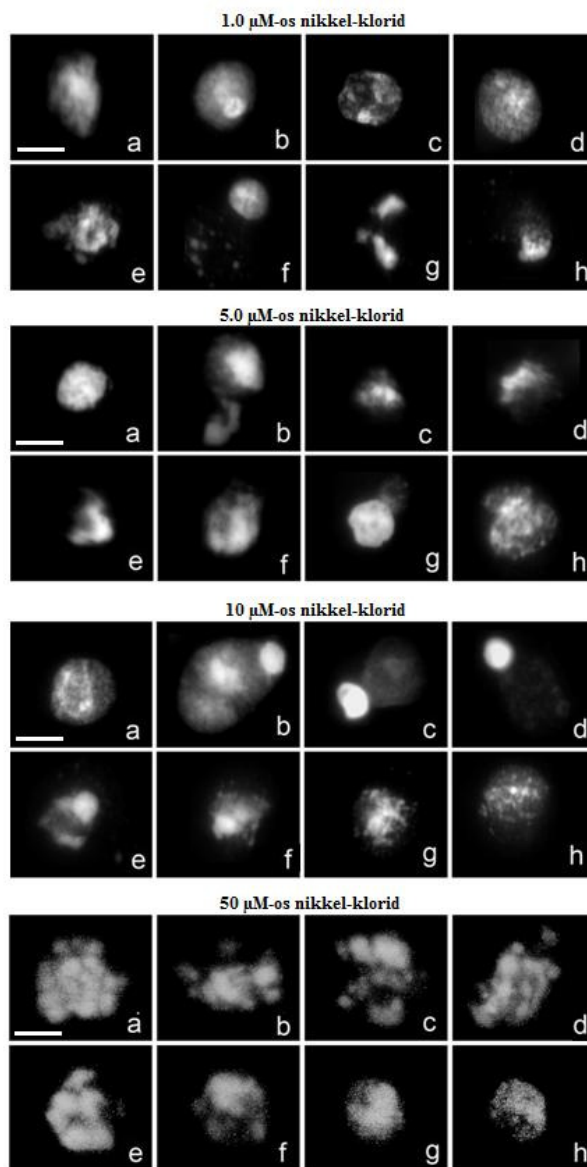
kiszabadulása (5 μM , C, F), nagyméretű extracelluláris perikromatikus granulumok (5 μM , A, C, D), illetve elongált prekromoszómák jelenléte (2 μM , F, H ; 5 μM , B, F, H). A 10, 20 és 40 μM -os $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ kezelést követően, megfigyelhetünk az S fázis

korai szakaszában apoptotikus testeket (10 μ M, H; 20 μ M, G, H; 40 μ M, H), az S fázis középső szakaszában kilöködött kromatin szálakat (10 μ M, B-E, G; 20 μ M, C, D; 40 μ M, C), prekondenzált kromoszómákat (20 μ M, G), valamint ragadós jellegűknél fogva összetapadt sejtmagokat (40 μ M F,H).

A kromatin kerek, polarizált, sűrű, erősen fluoreszcens marginális foltjai megkülönböztető jegyek az ólom-nitrát okozta elváltozásokban (2 μ M: C, D; 10 μ M: A, C, D, E, G; 20 μ M: A, B; 40 μ M: B, D, F). Ezek a polarizált formák a kromatin prekromoszómális egységei lehetnek (pl; 10 μ M: G, 20 μ M: A) (Bánfalvi és mtsai, közlés előtti eredményei). 10 μ M feletti koncentrációknál a magállomány kilöködése gyakori jelenség (10 μ M: C, D).

4.13.3 Nikkel-klorid (NiCl₂)

1-50 μ M nikkel-kloriddal kezelt K562 sejtekre jellemző (26. ábra), hogy már 1 μ M esetében zavart okoz a szupertekercselésben (b, d), a szalagszerű kromatin szerkezetet is torzítja (a, g) és apoptózist indukál (f, h). 5 μ M-nál az interfázisos kromatin kilöködése (b, g) már megfigyelhető. A korai fátyolos szerkezetek jelenléte, a kondenzálás folyamatának nikkel-klorid okozta gátlásával magyarázható (d, e, f). Már ennél a kis koncentrációnál is megfigyelhető a preapoptotikus forma (h). 10 μ M-nál a maganyag kilöködése (b-d), illetve apoptotikus testek jelenléte (e-h) általánosan jellemző jelenség. Nagy polarizáltságú tömör állomány, illetve a felhőszerű dekonzenzálatlan formák



26. ábra A nikkel-klorid hatása K562 humán sejtek kromatin kondenzálására (1-50 μ M) (festék: DAPI, vonalméret: 5 μ M)

egyidejűleg jelennek meg (b-e). 50 μ M esetében a meghatározó forma a nekrotikus megnagyobbodott sejtmag (a-f).

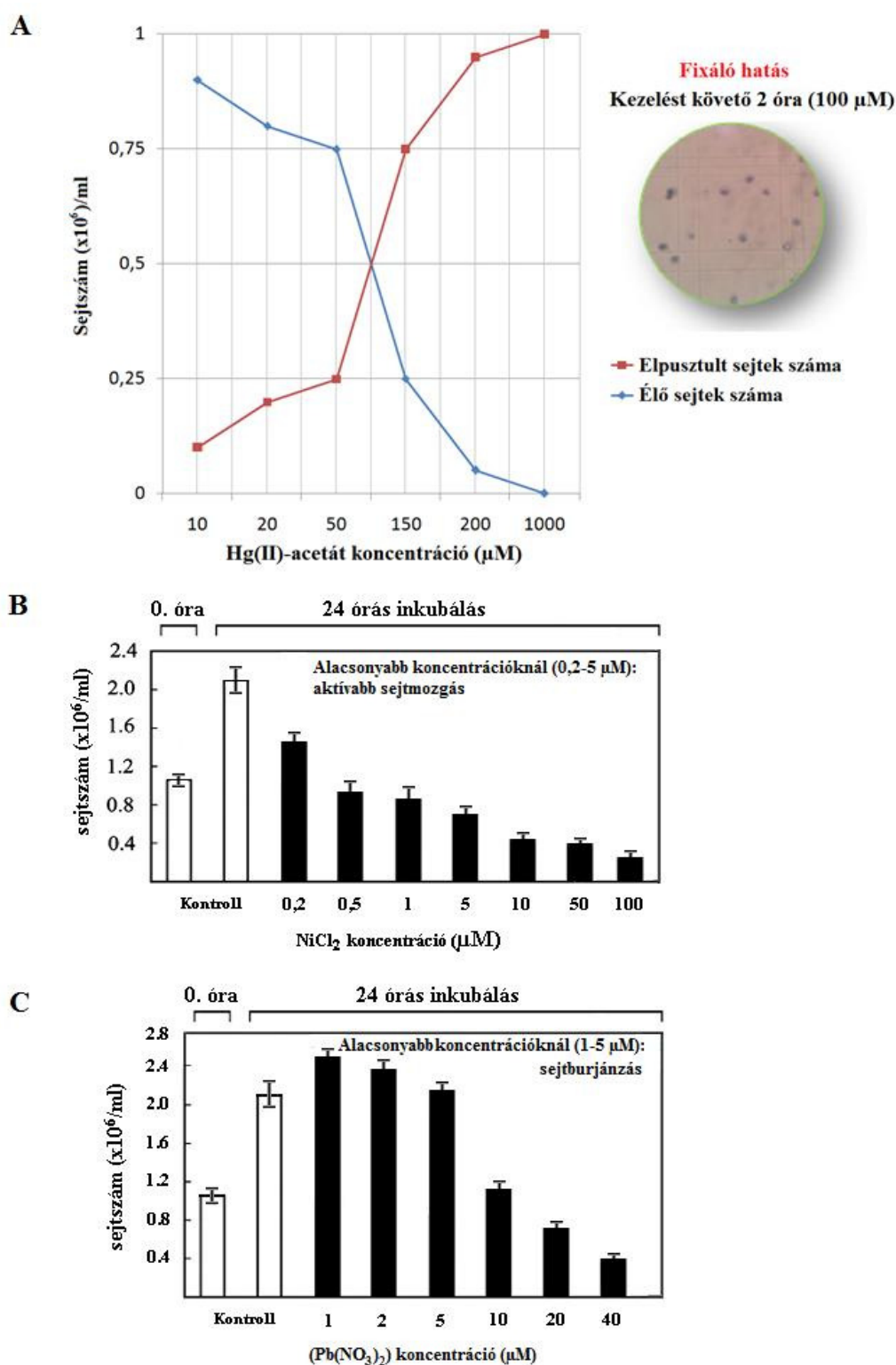
További kísérleteket végeztünk egyéb vegyületekkel (nikotinsav-klorid, koffein, aktinomicin, ethidium-bromid), melyek eredményei nem képezik jelen disszertáció tárgyát.

4.14 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 nyomon követhettük a sejtek viselkedését. Minden esetben a nehézfém koncentráció emelkedésével a sejtnövekedés gátlása figyelhető meg (27. ábra), 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 koncentrációinál 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 nikkel enzimaktiváló hatásával függhet össze.



27. ábra Kezelt minták élő sejtszám-változásai (higany-acetát, nikkel-klorid, ólom-nitrát)

A. 10-1000 μM koncentrációjú Hg(II)-acetáttal kezelt K562 sejtek pusztulási görbéje. Az élő sejtek mellett, az elpusztult sejtek is láthatóak voltak fénymikroszkópos megfigyeléssel a kezelés teljes időtartama alatt. B. 10^6 /ml kezdeti denzitású sejtkultúrák 24 órás inkubálása után meghatározott sejtszámok kontroll tenyészetben, illetve 0,2, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100 μM

NiCl₂ jelenlétében. C. 10⁶/ml kezdeti denzitású sejt kultúrák 24 órás inkubálása után meghatározott sejtszámok kontroll tenyésztetben, illetve 1, 2, 5, 10, 20, 40 µM Pb(NO₃)₂ jelenlétében.

A sejtek életképesség-vizsgálatának statisztikai elemzése során szintén eltérő eredményeket kaptunk (IV. táblázat). 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 1µM-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 1µM-os koncentrációban a kiindulási sejtszámhoz képest 24 óra elteltével körülbelül 2.5x-ére 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%).

Nehézfém koncentrációk (µM)	Élő sejt-szám kiindulási $N \times 2 \times 10^4$ /ml (N)	Pusztult sejt-szám kiindulási $M \times 2 \times 10^4$ /ml (M)	Kiindulási sejt-szám összes $P \times 2 \times 10^4$ /ml (P)	Élő sejt-szám kísérlet után (24 h) $N' \times 2 \times 10^4$ /ml (N')	Pusztult sejt-szám kísérlet után (24 h) $M' \times 2 \times 10^4$ /ml (M')	Sejtszám összes kísérlet után (24 h) $P' \times 2 \times 10^4$ /ml (P')	Élő sejtek aránya $[(N'/N) \times 100] - 100$	Pusztult sejtek aránya $(M'/P') \times 100$
Kontroll sejtek	54	6	60	110	14	124	106%±12	13%±5
Higany (10 µM)	52	5	57	74	35	109	75%±5	37%±4
Higany (1000µM)	53	5	58	0	48	48	0%	100%
Nikkel (0,2 µM)	54	7	61	78	29	107	75%±4	27%±5
Nikkel (100 µM)	53	6	59	37	24	61	0,3%±2	39%±3
Ólom (1µM)	52	6	58	126	23	149	156%±3	15%±4
Ólom (40µM)	54	5	59	4	29	70	18%±3	41%±2

IV. táblázat Kezelt minták életképesség-vizsgálat átlagértékei (higany-acetát, nikkel-klorid, ólom-nitrát), Bürker-kamrás sejtszámolások 3 vizsgálat átlagából kapott eredményei

5 Megbeszélés

Kísérletes eredményeink alapján a célkitűzéseinkben megfogalmazottaknak eleget tettünk, melyeket pontokba szedve foglalkozunk 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 (Nagy és mtsai, 2005).

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 esetén (25 J/m²) hatása főleg egy fibrózus felhőszerű képződményként manifesztálódik a kondenzálódó kromatinszerkezet 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. Ennek hátterében az a repair rendszer állhat, mely első sorban az UVB

károsodások javításáért felelős. A fibrózus felhőszerű képződmény kialakulása az UVA sugárzásra is jellemző a kondenzálódó kromatinszerkezet körül.

5. Alapvető különbség a gamma és az UVB kezelt sejtek között az, hogy 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.

A továbbiakban a fenti eredményekhez – a felsorolás sorrendjében – további megjegyzéseket szeretnék fűzni.

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. Permeabilizált egér limfocitákkal végzett korábbi kísérletek során szintén megerősítést nyert a sejtmembrán integritásának helyreállása scanning elektronmikroszkópos felvételek analizálásával (Bánfalvi és mtsai, 1984).

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 (Gujuluva, 1994, Ceruti, 2005). **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 (Higuchi és mtsai, 2003). 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 (Edenberg, 1976). Ezen megfigyeléseket erősítették az általunk vizsgált K562 sejtvonalon végzett kísérletek is. A K562 sejteknél az alacsonyabb dózis esetén (2 , 5 , és 15 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 dózissal, 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/m^2) esetében csak szórványosan jelennek meg, és ritka előfordulásuk miatt nem ezeket alkalmaztuk. Magas UVB dózis esetén (25 J/m^2) 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 kezeltlen 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 sejttípuson 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 sejttípustól 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 derítettek 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 megfigyelhetők 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 egér 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 (Farkas és mtsai, 2009). 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 (Bánfalvi közlés előtti eredményei). 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 apoptózis 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 sejttermékek 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.

6 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 repairt 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 logaritmikusan 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 megreked, 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.

7 Summary

The aim of our experiments was the visualization of chromatin changes taking place in human erythroleukemia cells during the interphase upon UVB irradiation and other genotoxic agents, to compare the different structures, apoptotic features and to categorize them.

Two different approaches were used to answer the questions, involving biochemical and morphological studies.

We have provided evidence that the reversible permeabilization that allowed the visualization of chromatin structures of interphase nuclei did not reduce significantly the viability of cells and that DNA synthesis taking place in permeable K562 cells is an ATP dependent process. UVB irradiation inhibited replicative DNA synthesis and activated repair synthesis. Our flow cytometry measurements proved that small apoptotic cells did not appear within a few hours after UVB irradiation i.e. apoptosis does not occur within this short period of time. UVB irradiation and reversible permeabilization did not induce the apoptotic shrinking of cells. Based on our measurements in K562 cells UVB irradiation blocked chromatin condensation in the early stage of S phase between 2.2 and 2.4 C values.

In further experiments at lower UVB doses (2, 5, 15 J/m²) chromatin changes were observed only occasionally, while the weaker UVA irradiation of higher wavelength generated noticeable chromatin changes at lower doses. The basic difference between the chromatin structures of exponentially growing K562 cells after gamma and UVB irradiation was that in UVB treated cells there were only a few apoptotic bodies, and chromatin condensation was blocked in its fibrillary stage, preventing the formation of metaphase chromosomes. Examination shed light on similar effects of genotoxic agents such as the local density increase of chromatin or the quite opposite effects involving disintegration, depolarization, exclusion of nuclear material, disruption of nuclear membrane. However, significant differences were also observed, that resulted in a specific chromatin pattern, typical to the agent. Morphological changes generated by genotoxic agents pointed to the possibility that these changes could be categorized. Cellular ethology and viability studies by our long term scanning (LTS) system after mercuric acetate, lead nitrate and nickel chloride confirmed the results of morphological analyses.

These results may contribute to the understanding of the mode of action of genotoxic agents at the chromatin level and contribute to the knowledge of eukaryotic chromatin condensation under normal and pathologic conditions.

8 Irodalomjegyzék

8.1 Hivatkozott közlemények jegyzéke

Anjanabha, S, Wittmeyer, J and Cairns, BR. Chromatin remodeling by RSC involves ATP-dependent DNA translocation Genes Dev. 2002 August 15; 16(16): 2120–2134

Banfalvi, G. Apoptotic chromatin changes. Springer Verlag, Holland 2008

Banfalvi, G, Gacsi, M., Nagy, G, Kiss, B Z, Basnakian, AG. Cadmium induced apoptotic changes in chromatin structure and subphases of nuclear growth during the cell cycle in CHO cells. Apoptosis 2005 10: 631-642

Banfalvi, G, Nagy, G, Gacsi, M, Roszer, T, Basnakian, AG. Common pathway of chromosome condensation in mammalian cells. DNA Cell Biol 2006 25:295–301

Banfalvi, G, Nagy, G, Gacsi, M, Roszer, T, Basnakian, AG. Common pathway of chromosome condensation in Mammalian cells. DNA Cell Biol. 2006 May 25(5):295-301

Banfalvi, G, Poirier, L, Mikhailova, M, Chou, MW. Relationship of repair and replicative DNA synthesis to cell cycle in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. DNA Cell Biol 1997 16:1155–1160

Banfalvi, G, Sooki-Toth, A, Sarkar, N, Csuzi, S, Antoni, F. Nascent DNA synthesized reversibly permeable cells of mouse thymocytes. Eur J Biochem 1984 139:553 559

Banfalvi, G, Trencsenyi, G, Ujvarosi, K, Nagy, G, Ombodi, T, Bedei, M, Somogyi, C, Basnakian, AG. Supranucleosomal organization of chromatin fibers in nuclei of Drosophila S2 cells. DNA Cell Res. 2007 26, 55-62

Banfalvi, G, Ujvarosi, K, Trencsenyi, G, Somogyi, C, Nagy, G, Basnakaian, AG. Cell

culture density dependent toxicity and chromatin changes upon cadmium treatment in murine pre-B-cells. *Apoptosis* 2007 12:1219–1228

Banfalvi, G, Wiegant, J, Sarkar, N, Duijn van, P. Immunofluorescent visualization of DNA replication sites within nuclei of Chinese hamster ovary cells. *Histochemistry* 1989 93, 81-86

Banfalvi, G. Linear connection of condensing chromosomes in nuclei of synchronized CHO cells. *DNA Cell Biol* 2006 25:541–545

Banfalvi, G. Cell cycle synchronization of animal cells and nuclei by centrifugal elutriation. *Nature Protocols* 2008 3(4):663-673

Banfalvi, G. Condensation of interphase chromosomes in nuclei of synchronized CHO cells. *DNA Cell Biol.* 2006 25: 641-645

Banfalvi, G. Molekuláris sejtbiológia 2. kiadás (Molecular cell biology 2nd edn.). Kossuth Kiadó, Debrecen, 2005 (440 pp, 225 fig)

Bánfalvi, G. MTA doktori értekezése 1987

Banfalvi, G. Structural organization of DNA. *Biochemical Education* 1986 14, 50-59

Banfalvi, G., Bach, PH, Reynolds, CH, Clark, JM, Poole, PL, Mottley, J. Fluorescent analysis of replication and intermediates of chromatin folding in nuclei of mammalian cells. *Biotechnology Applications of Microinjection, Microscopic Imaging and Fluorescence*. Plenum Press, New York, 1993. pp. 109-118

Banfalvi, G., Sooki-Toth, A., Sarkar, N., Csuzi, S. & Antoni, F. Nascent DNA chains synthesized in reversibly permeable cells of mouse thymocytes. *Eur. J. Biochem.* 1984 139, 553-559

Basnakian, A, Banfalvi, G and Sarkar, N. Contribution of DNA polymerase delta to DNA replication in permeable cells synchronized in S phase. *Nucleic Acids Res.* 1989 17, 4757–4767

Basnakian, A, Banfalvi, G, Sarkar, N. Contribution of DNA polymerase delta to DNA replication in permeable CHO cells synchronized in S phase. *Nucleic Acids Res* 1989 17:4757–4767

Belmont, AS. Mitotic chromosome scaffold structure: new approaches to an old controversy *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 10;99(25):15855-7

Blow, JJ, Watson, JV. Nuclei act as independent and integrated units of replication in a *Xenopus* cell-free DNA replication system. *EMBO J.* 1987 Jul 6(7):1997-2002

Bogdanov, KV, Chukhlov, AB, Zaritskey, AI, Frolova, OI, Afanasiev, BV. Ultraviolet irradiation induces multiple DNA double-strand breaks and apoptosis in normal granulocytes and chronic myeloid leukaemia blasts. *Brit J Haematol* 1997 98:869– 872

Brehm, A, Tufteland, KR, Aasland, R, Becker, PB. The many colours of chromodomains. *Bioessays.* 2004 Feb 26(2):133-40

Castellot, JJ Jr, Miller, MR, Pardee, AB. Animal cells reversibly permeable to small molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978 75:351–355

Ceruti, JM, Scassa, ME, Flo, JM, Varone, CL, Canepa, ET. Induction of p19INK4d in response to ultraviolet light improves DNA repair and confers resistance to apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 2005 24:4065–4080

Cleaver, JE. Normal reconstruction of DNA supercoiling and chromatin structure in Cockayne syndrome cells during repair of damage from ultraviolet light. *Am J Hum*

Genet 1982 34:566–575

Comings, DE. Arrangement of chromatin in the nucleus. Hum. Genet. 1980 53: 131-143 Review

Cook, PR, Brazzell, IA. Conformational constraints in nuclear DNA. Journal of Cell Science. 1976 Vol 22, Issue 2 287-302

Dale, RMK, Livingston, DC and Ward, DC. The synthesis and enzymatic polymerization of nucleotides containing mercury: potential tools for nucleic acid sequencing and structure analysis. 1973 Proc Nat Acad Sci USA. 70, 2238–2242

de Campos Vidal, B, Russo, J, Mello, ML. DNA content and chromatin texture of benzo[a]pyrene-transformed human breast epithelial cells as assessed by image analysis. Exp Cell Res. 1998 Oct 10 244(1):77-82

Downes, CS, Ord, MJ, Mullinger, AM, Collins, AR, Johnson, RT. Novobiocin inhibition of DNA excision repair may occur through effects on mitochondrial structure and ATP metabolism, not on repair topoisomerases. Carcinogenesis. 1985 Sep;6(9):1343-52.

Dresler, SL, Lieberman, MW. Requirement of ATP for specific incision of ultraviolet-damaged DNA during excision repair in permeable human fibroblasts. J Biol Chem. 1983 Oct 25;258(20):12269-73

Earnshaw, WC. Mitotic chromosome structure. Bioessays. 1988 Nov; 9(5):147-50. Review

Earnshaw, WC, Laemmli, UK. Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds. J. Cell Biol. 1983 Jan 96(1):84-93

Edenberg, HJ. Inhibition of DNA replication by ultraviolet light. *Biophys J.* 1976 16:849–860

Fadok, VA, Savill, JS, Haslett, C, Bratton, DL, Doherty, DE, Campbell, PA, Henson, PM. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol.* 1992 Dec 15;149(12):4029-35

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. *Toxicology In Vitro* 2009 (in press)

Felsenfeld, G. Chromatin unfolds. *Cell.* 1996 86:13–19

Fekete A., Elektromágneses sugárzások biofizikája II. Az optikai tartomány (fény) biológiai hatásai (előadásvázlat)

Ferri, KF, Jacotot, E, Blanco, J, Esté, JA, Zamzami, N, Susin, SA, Xie, Z, Brothers, G, Reed, JC, Penninger, JM, Kroemer, G. Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspases. *J Exp Med.* 2000 Oct 16;192(8):1081-92

Fordis, MC, Anagnou, NP, Dean, A, Nienhuis, AW, Schechter, AN. A beta-globin gene, inactive in the K562 leukemic cell, functions normally in a heterologous expression system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984 81:4485–4489

Friedberg, EC, Walker, GC, Siede, W. DNA repair and Mutagenesis (2nd edition) 1995 American Society for Mikrobiology, Washington, DC

Gacsi, M, Nagy, G, Pinter, G, Basnakian, AG, Banfalvi, G. Condensation of interphase chromatin in nuclei of Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *DNA Cell Biol.* 2005

24: 43-53

Gardos, G, Straub, FB. The role of adenosine-triphosphoric acid (ATP) in the potassium permeability of human erythrocytes. *Acta Physiol Hung.* 1957 12(1-3):1-8

Gujuluva, CN, Baek, JH, Shin, KH, Cherrick, HM, Park, NH. Effect of UV irradiation on cell cycle, viability and the expression of p53, gadd153 and gadd45 genes in normal and HPV immortalized human oral keratinocytes. *Oncogene.* 1994 9:1819– 1827

Hanavalt PC. DNA repair comes of age. *Mut Res.* 1995, 336: 101-113

Handbook for the Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer. Ozone Secretariat United Nations Environment Programme - 7th Edition 2006

Heslop-Harrison, JS, Leitch, AR, Schwarzbacher, T, Smith, JB, Atkinson, MD, Bennett, MD. The volumes and morphology of human chromosomes in mitotic reconstructions. *Hum Genet.* 1989 Dec 84(1):27-34

Higuchi, Y, Mizukami, Y, Yoshimoto, T. Ultraviolet ray induces chromosomal giant DNA fragmentation followed by internucleosomal DNA fragmentation associated with apoptosis in rat glioma cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 1010:326–330

Hiriyanna KT, Varkey J, Beer M, Benbow RM. Electron microscopic visualization of sites of nascent DNA synthesis by streptavidin-gold binding to biotinylated nucleotides incorporated in vivo. *J Cell Biol.* 1988 Jul;107(1):33-44

Hozier J, Renz M, Nehls P. The chromosome fiber: Evidence for an ordered superstructure of nucleosomes. *Chromosoma (Berl.)* 1977 62, 301-317

Hunting, DJ, Dresler, SL, de Murcia, G. Incorporation of biotin-labeled deoxyuridine triphosphate into DNA during excision repair and electron microscopic visualization of repair patches. *Biochemistry*. 1985 Oct 8;24(21):5729-34

Jiang, Y, Rabbi, M, Kim, M, Ke, C, Lee, W, Clark, RL, Mieczkowski, PA, Marszalek, PE. UVA generates pyrimidine dimers in DNA directly. *Biophys J*. 2009 Feb 96(3):1151-8

Johnson, JE, Zimmerman, ML, Daleke, DL, Newton, AC. Lipid structure and not membrane structure is the major determinant in the regulation of protein kinase C by phosphatidylserine. *Biochemistry*. 1998 Sep 1;37(35):12020-5

Jorcano JL, Meyer G, Day LA, Renz M. Aggregation of small oligonucleosomal chains into 300-Å globular particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1980 77: 6443-6447

Juan, G, Traganos, F, James, WM, Ray, JM, Roberge, M, Sauve, DM, Anderson H, Darzynkiewicz Z. Histone H3 phosphorylation and expression of cyclins A and B1 measured in individual cells during their progression through G2 and mitosis. *Cytometry*. 1998 Jun 1;32(2):71-7

Kireeva, N, Lakonishok, M, Kireev, I, Hirano, T, Belmont, AS. Visualization of early chromosome condensation: a hierarchical folding, axial glue model of chromosome structure. *J Cell Biol*. 2004 166:775–785

Klein, E, Ben-Bassat, H, Neumann, H, Ralph, P, Zeuthen, I, Polliack, A, Vanky, F. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer*. 1976 18:421–431

Klug, A, Butler PJ. The structure of nucleosomes and chromatin. *Horiz Biochem Biophys*. 1983 7:1–41

Kornberg, RD. Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem*. 1977 46:931–954

Laird CD. Structural paradox of polytene chromosomes. *Cell* 1980 22, 869-874

Langer, PR, Waldrop, AA and Ward, DC. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1981 78, 6633–6637

Lin, CP, Ban, Y, Lyu, YL, Liu, LF. Proteasome-dependent processing of topoisomerase I-DNA adducts into DNA double-strand breaks at arrested replication forks *J Biol Chem*. 2009 Aug 6.

Lozzio, BB, Machado, EA, Mitchell, J, Lozzio, CB, Wust, CJ, Golde, DW. Proliferation of human malignant hematopoietic cells in immunodeficient mice: suppression by antibody to pluripotent K-562 leukemia cells involves direct cytolysis and effector cells. *Blood*. 1983 Jun;61(6):1045-53

Lozzio, CB, Lozzio, BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 1975 45:321–334

Martin, SJ, Cotter, TG. Ultraviolet B irradiation of human leukemia HL-60 cells in vitro induces apoptosis. *Int J Radiat Biol*. 1991 59:1001–1016

Moses, RE, Richardson, CC. Replication and repair of DNA in cells of *Escherichia coli* treated with toluene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1970 67:674–681

Nagy, G, Gacsi, M, Rehak, M, Basnakian, AG, Klaisz, M, Bánfalvi, G. Gamma irradiation-induced apoptosis in murine pre-B cells prevents the condensation of fibrillar chromatin in early S phase. *Apoptosis*. 2004 9, 765-776

Nagy, G., Pintér, G., Szepessy, E., Bánfalvi, G. Kromatin szerkezetek három dimenziós megjelenítése. *Acta Biol. Debrecina*. 2001 23: 77-79

Nakayasu, H, Berezney, R. Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus. *J Cell Biol.* 1989 Jan 108(1):1-11

Nagy, G, Pinter, G, Kohut, G, Adam, AL, Hornok, L, Banfalvi, G. Time-lapse analysis of cell death in mammalian and fungal cells. *DNA Cell Biol.* (in press).

Nemeth, A, Langst, G. Chromatin higher order structure: opening up chromatin for transcription. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2004 2:334–343

Offer, H, Zurer, I, Banfalvi, G, Reha'k, M, Falcovitz, A, Milyavsky, M, Goldfinger, N, Rotter, V. p53 modulates base excision repair activity in a cell cycle-specific manner after genotoxic stress. *Cancer Res.* 2001 Jan 1;61(1):88-96

Paulson, JR and Laemmli, UK. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell.* 1977 Vol 12, Issue 3, Nov 817-828

Rattner, JB, Lin, CC. Radial loops and helical coils coexist in metaphase chromosomes. *Cell.* 1985 Aug 42 (1):291-296

Rein, T, Schreck, R, Willenbrink, W, Neubert, WJ, Zorbas, H, Bäuerle, PA. Conserved high-affinity NF-kappa B binding site in the interferon regulatory factor-1 promoter is not occupied by NF-kappa B in vivo and is transcriptionally inactive. *J Inflamm.* 1995 45(4):269-82

Ronto, G, Berces, A, Fekete, A, Kovacs, G, Grof, P, Lammer, H. Biological UV dosimeters in simulated space conditions. *Adv Space Res.* 2004 33(8):1302-5

Sakahira, H, Enari, M, Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 1998 Jan 1;391(6662):96-9

Scheer U, Sommerville J, Muller U. DNA is assembled into globular supranucleosomal chromatin structures by nuclear contents of amphibian oocytes. *Expl Cell Res.* 1980, 129, 115-126

Sooki-Toth, A, Csuzi, S, Altmann, H, Antoni, F, Banfalvi, G. Poly-(ADP-ribose) and replicative DNA synthesis studied in permeable mouse thymocytes. *Acta Biochem. Biophys. Hung.* 1986 21, 313-325

Sperling, K and Luedtke, E-K. Arrangement of prematurely condensed chromosomes in cultured cells and lymphocytes of the Indian muntjac. *Chromosoma.* 1981 83, 541–553.

Trencsenyi, G, Kertai, P, Somogyi, C, Nagy, G, Dombradi, Z, Gacsi, M, Banfalvi, G. Chemically induced carcinogenesis affecting chromatin structure in rat hepatocarcinoma cells. *DNA Cell Biol.* 2007 Sep;26(9):649-55

Twiddy, D, Brown, DG, Adrain, C, Jukes, R, Martin, SJ, Cohen, GM, MacFarlane, M, Cain, K. Pro-apoptotic proteins released from the mitochondria regulate the protein composition and caspase-processing activity of the native Apaf-1/caspase-9 apoptosome complex. *J Biol Chem.* 2004 May 7;279(19):19665-82

Wan, KM, Nickerson, JA, Krockmalnic, G, Penman, S. The nuclear matrix prepared by amine modification. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 Feb 2;96(3):933-8

Watson JD, Crick FHC. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 1953, 171: 737-738

Winter, DB, Gearhart, PJ, Bohr, VA Homogeneous rate of degradation of nuclear DNA during apoptosis. *Nucleic Acids Res.* 1998 26:4422–4425

Wood, RD. Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. J Biol Chem. 1997 Sep 19;272(38):23465-8

Workman, JL, Kingston, RE. Alteration of nucleosome structure as mechanism of transcriptional regulation. Annu Rev Biochem. 1998 67:545–579

Xue, Y, Wong, J, Moreno, GT, Young, MK, Côté, J, Wang, W. NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. Mol Cell. 1998 Dec 2(6):851-61

Zorn, C, Cremer, C, Cremer T, Zimmer, J. Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus. Distribution in Interphase and Methaphase Experimental Cell Research. 1979 124, 111-119

8.2 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

$\Sigma_{IF}:15,313$

8.3 Poszter

Farkas Erzsébet, Laza Diana, Sárvári Anitta, témavezető: **Ujvárosi Kinga**
Nehézfémekkel kezelt humán K562 sejtek Long-Term Scanning mikroszkópos vizsgálata, 39. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg 2009.05.19-2009.05.22

8.4 Konferencia

Ujvárosi Kinga, Nehézfémek okozta etológiai változások bemutatása humán K562 sejtvonalon, Long Term Scanning technológia segítségével. Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék tudományos estje. Állati sejtek apoptózisa és daganatképzése szekció. DAB Székház, 2009. március 31.

8.5 Oktatási segédanyag

B. Kiss Zs., Nagy G., Sári K., Pinczés Gy., **Ujvárosi K.**, Rózsa D.: Állatélettani gyakorlatok biológus hallgatóknak I. (2007.)

B. Kiss Zs., Nagy G., Sári K., Pinczés Gy., **Ujvárosi K.**, Rózsa D.: Állatélettani gyakorlatok biológus hallgatóknak II. (2007.)

9 Tárgyszavak

Apoptózis	Apoptosis
Elutriálás	Elutriation
Fluoreszcens mikroszkóp	Fluorescence microscope
Hg(II)-acetát	Hg(II) acetate
Inkorporáció	Incorporation
Kadmium	Cadmium
Kondenzálás	Condensation
Kromatin	Chromatin
Long Term Scanning	Long Term Scanning
Nekrózis	Necrosis
Nikkel-klorid	Nickel chloride
Ólom-nitrát	Lead nitrate
Replikatív DNS szintézis	Replicative DNA synthesis
Reverzibilis permeabilizálás	Reversible permeabilisation
Sejtciklus	Cell cycle
Szinkronizálás	Synchronization
UVB sugárzás	UVB radiation

10 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek;

Prof. Dr. Bánfalvi Gáspárnak az eredmények értelmezésében, a publikációk és a Ph.D. értekezés megírásában nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért és támogatásáért,

és **Prof. Dr. Hunyadi Jánosnak** az eredmények értelmezésében, a disszertáció megírásában nyújtott segítségéért és önzetlen támogatásáért.

Köszönet illeti **Dr. Nagy Gábort** a gyakorlati kérdésekben adott hasznos útmutatásáért.

Pócsi Imrének köszönöm a labormunkában való közreműködését és önzetlen segítségnyújtását.

Valamint köszönettel tartozom a TTK Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék vezetőjének, **Dr. Pócsi Istvánnak**, aki lehetővé tette a tanszéken folyó munkát, valamint köszönettel tartozom a bízató, őszinte és gyakorlatias tanácsaiért, és a jövőmet befolyásoló támogatásáért.

Illetve köszönöm a **Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék**, valamint a **Bőrgyógyászati Klinika** összes dolgozójának, hallgatótársaimnak, asszisztenseknek, a munkám során nyújtott segítségüket.