

**Digitális képelemzés a kromatinkondenzálódás
intermedierjeinek vizsgálatában**

DR.SZEMÁN-NAGY GÁBOR

I. BEVEZETÉS.....5

1. A KROMATIN KONDENZÁLÓDÁS MECHANIZMUSÁNAK RÉSZLETEI

FELTÁRATLANOK5

2. CÉLKITŰZÉSEK.....7

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....8

1. A NUKLEINSAVAK STRUKTURÁLIS SZERVEZŐDÉSE8

A DNS ELSŐDLEGES SZERKEZETE.....8

A DNS MÁSODLAGOS SZERKEZETE.....9

A DNS HARMADLAGOS SZERKEZETE11

AZ EUKARYOTA SZUPERTEKERCS ANALÓG: NUKLEOSZÓMA15

2. A KROMOSZÓMÁLIS SZERVEZŐDÉS16

A PROKARYOTA NUKLEOID16

AZ EUKARYOTA KROMOSZÓMA KIALAKULÁSA17

3. A KROMATIN KONDENZÁLÓDÁS VIZSGÁLATA20

4. A KÍSÉRLETI RENDSZER ELŐZMÉNYEI.....21

1. A BIOTIN-11-DUTP BEÉPÍTÉSE NASZCENS DNS-BE21

2. A PERMEABILIZÁLÁS HATÁSA A SEJTMAG INTEGRITÁSÁRA.....22

3. A BIOTIN-NUKLEOTID BEÉPÜLÉS HATÁSA A CHO SEJTEK

KROMATINSZERKEZETÉRE23

III. EREDMÉNYEK 1.25

1. DEKONDENZÁLT KROMATIN SZERKEZETEK BIOTINÁLT CHO

SEJTPOPULÁCIÓBAN.....25

2. GLOBULÁRIS, SZUPERTEKERCSSELT, FIBRÓZUS, SZALAGSZERŰ KROMATIN

SZERKEZETEK BIOTINÁLT CHO SEJTPOPULÁCIÓBAN.26

3. KROMATIN KONDENZÁLÁS BIOTINÁLTAN, SZINKRONIZÁLT CHO

SEJTPOPULÁCIÓBAN.....27

4. KORAI S-FÁZISBAN SZINKRONIZÁLT SEJTEK DEKONDENZÁLT KROMATIN

FORMÁI (2.0 – 2.5 C)28

5. KORAI ÉS KÖZÉPSŐ S-FÁZISBAN SZINKRONIZÁLT SEJTEK ÁTMENETI

KROMATIN FORMÁI (2.5 – 3.0 C)30

6. PREKROMOSZÓMÁK LINEÁRIS ELRENDEZŐDÉSE SZINKRONIZÁLT CHO

SEJTEKBEN (3.0 – 3.5 C)31

7. KORAI KROMOSZÓMA FORMÁK MEGJELENÉSE SZINKRONIZÁLT CHO

SEJTEKBEN (3.5 – 4.0 C)32

8. KROMATIN IMAGE ANALÍZIS33

9. MORFOLÓGIAI VÁLTOZÁSOK A KROMATIN KONDENZÁLÁS SORÁN34

<u>IV. EREDMÉNYEK 2.</u>	35
1. GENOTOXIKUS HATÁSOK VIZSGÁLATA A KROMATINÁLLOMÁNY SZERVEZŐDÉSÉRE	35
2. A SEJTMEMBRÁN REGENERÁCIÓJA PERMEABILIZÁLÁS UTÁN	36
3. AZ SZINKRONIZÁLT EGÉR PREB SEJTFRAKCIÓK FLOW - CITOMETRIÁS JELLEMZÉSE	37
4. KORAI S-FÁZIS BLOKKOLÁS GAMMA-BESUGÁRZÁS HATÁSÁRA	38
5. A BESUGÁRZATLAN SEJTEK KROMATIN MORFOLÓGIÁJA	39
6. APOPTOTIKUS VÁLTOZÁSOK A KROMATINSZERKEZETBEN GAMMA-BESUGÁRZÁS HATÁSÁRA.....	41
<u>V. EREDMÉNYEK 3.</u>	45
1. A KROMATIN KONDENZÁLÁS INTERMEDIÉRIJEI NÉGY EMLŐSFAJ SEJTNYÉSZETÉBEN.....	45
<u>VI. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</u>	47
REAGENSEK, PUFFEREK, TÁPOLDATOK:	47
MÓDSZEREK:.....	47
SEJTVONALAK, SEJTNYÉSZTÉS	47
SEJTFRAKCIONÁLÁS ELUTRIÁLÓ ROTORRAL.....	48
A SZINKRONIZÁLÁS FLOW-CITOMETRIÁS ELLENŐRZÉSE	49
PERMEABILIZÁLÁS	49
SEJTEK REGENERÁLÁSA	50
SEJTMAGOK PREPARÁLÁSA	50
KROMATIN STRUKTÚRÁK FLUORESZCENS MIKROSKÓPOS VIZSGÁLATA.....	51
KROMATINSZERKEZET HÁROMDIMENZIÓS MEGJELENÍTÉSE	52
<u>VII. ÖSSZEGLZÉS</u>	56
<u>VIII. DVD-ROM MELLÉKLET</u>	59
<u>X. HIVATKOZÁSOK:</u>	62

I. Bevezetés

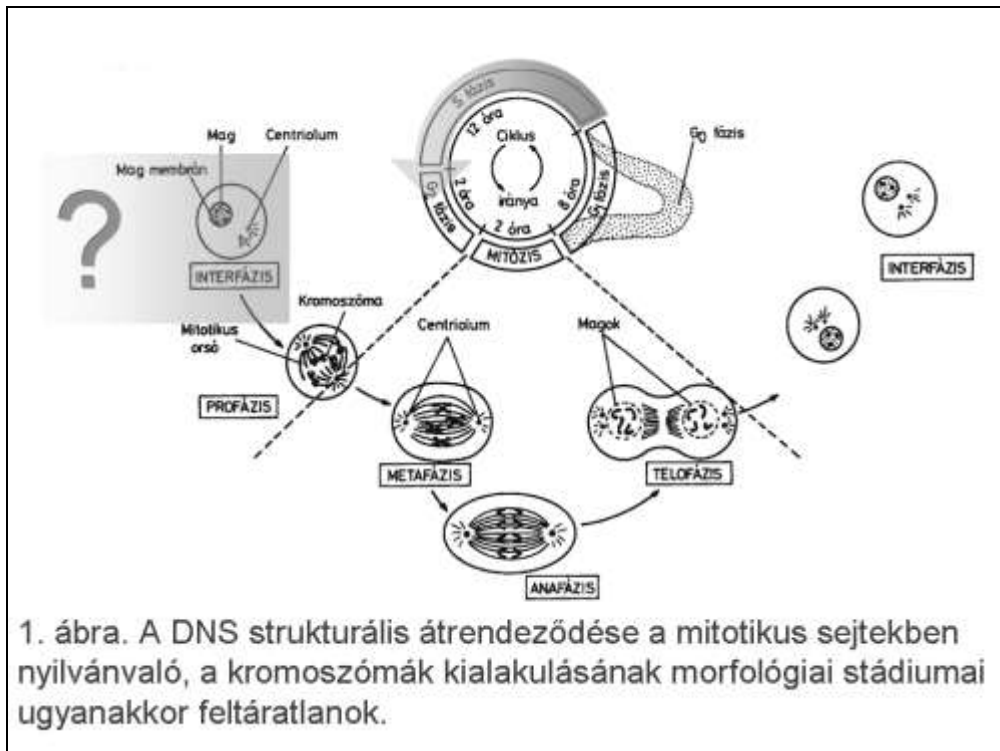
1. A kromatin kondenzálódás mechanizmusának részletei feltáratlanok

Eukaryotákban, a genetikai információt hordozó deoxiribonukleinsav hiszton és nem-hiszton fehérje tartalmú kromoszómához kötötten helyezkedik el a sejtciklus során. A DNS kötő fehérjék interakciójának egyik leglátványosabb megnyilvánulása maga a kromatin kondenzálás folyamata. A sejtek mitotikus osztódása közben fénymikroszkóposan észlelhető metafázisos kromoszómákat először 1842-ben figyelte meg Karl Wilhelm von Nägeli (1817-1891) svéd botanikus, 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.

Az interfázisos kromatin szerveződése a replikáció során kevésbé ismert, mivel ebben a fázisban körülhatárolt kromoszómák nem különíthetők el. A kromatin szerveződésének közvetlen megfigyelésére irányuló vizsgálatok részleges információkkal szolgáltak (Comings, 1980; Cremer és mtsai., 1979; Sperling and Luedtke, 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 and Laemmli, 1977; Cook and Brazell, 1980; Earnshaw and Laemmli, 1983; Rattner and Lin,

1985; Earnshaw, 1988). Ismert a kromatin kondenzálás génregulációs szerepe, melyben a gének kölcsönösen visszahatnak a kromatin struktúrára (Rein és mtsai.,1995). Számos magfehérjén azonosítottak kromodoméneket melyek változatos interakciókat alakítanak ki hisztonokkal, DNS-el és RNS-el (Brehm és mtsai., 2004). A kromatin kondenzálása transzkripció aktivitással áll kapcsolatban és korrelációt mutat a H3 hiszton foszforiláltságával (deCampos-Vidal és mtsai., 1998; Juan és mtsai., 1998). A kromatin nukleoszómákon végbemenő, ATP-függő újraszerveződési mechanizmusa a DNS torziós dinamikájának szerepét mutatja a kromatinállomány szerveződésében (Xue és mtsai., 1998.; Anjanabha és mtsai., 2002). Az interfázisos kromatinállomány morfológiai vizsgálata azonban problematikus, mivel paralell elektronmikroszkópos metszeteken csupán folytonos hálózatként jelenik meg (Heslop-Harrison és mtsai., 1988). A sejtmagban rejtetten és aránylag gyorsan végbemenő kromatin kondenzálás morfológiai vizsgálata ezért technikai nehézségekbe ütközik.

2. Célkitűzések



Munkánk során a következő kérdésekre kerestünk választ:

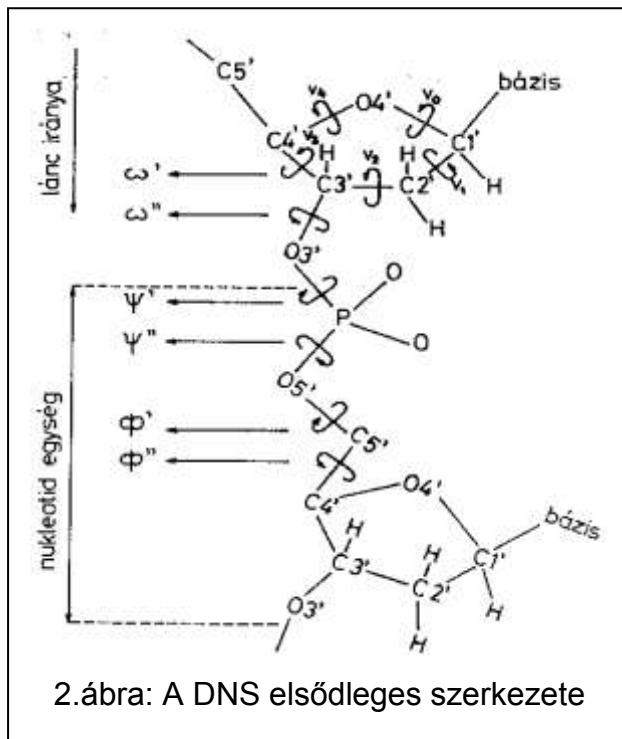
1. A folyamat előrehaladtával megkülönböztethetők-e morfológiai stádiumok a kromatin állomány szerveződésében, illetve hogyan viszonyulnak ezen szakaszok a sejt méretéhez, DNS tartalmához?
2. A genotoxikus ágensek milyen morfológiai elváltozásokat okoznak a kromatin kondenzálás szintjén ?
3. A kromatin kondenzálás folyamata sejttípusra, fajra jellemző módon megy-e végbe, vagy általános sémát követ?

II. Irodalmi áttekintés

1. A nukleinsavak strukturális szerveződése

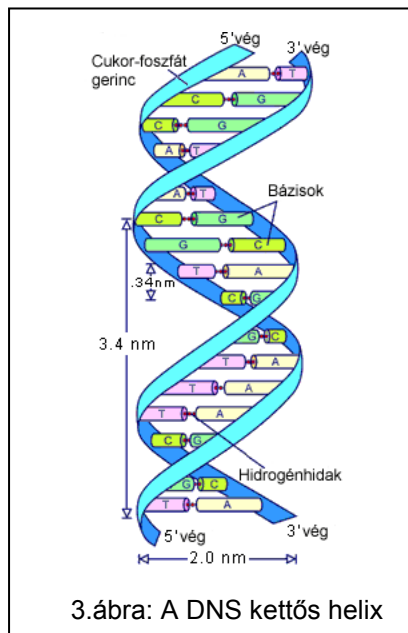
Az élő anyag szerveződésében központi szerepet játszik a struktúrát leíró kód ribonukleinsavakban való rögzülése. A szerkezeti információ ilyen módon való tárolása tette lehetővé az élet számára, hogy bolygónkat változatos formákban birtokba vegye. A genetikai információ nemzedékről nemzedékre való örökítésének elsődleges anyaga a deoxiribonukleinsav (DNS). A DNS előbb ribonukleinsavra (RNS) íródik át, majd az RNS-ről fehérje nyelvre fordítódik.

A DNS elsődleges szerkezete



A DNS deoxiribonukleozid monofoszfát monomerekből épül fel. A szerkezet gerincét a foszfodiészter kötésekkel kapcsolt deoxiribóz-foszfát lánc alkotja. Az információt ehhez a gerinchez kapcsolódó purin (adenin, guanin) és pirimidin (citozin, timin) bázisok hordozzák. A lánc növekedése 5' → 3' irányban a nukleotidok fej – láb kapcsolódásával valósul meg. Az elsődleges szerkezet egy egyszálú DNS-ben lévő összes kovalens kötést magában foglalja, ideértve a nukleotidok lineáris sorrendjét is. (2. ábra.)

A DNS másodlagos szerkezete



A bázisok közötti poláros és apoláros kölcsönhatások alakítják ki a DNS másodlagos szerkezetét. (3. ábra.) A poláros jellegű H-hidas kölcsönhatás a komplementer bázispárok között jön létre, oly módon, hogy az A-T párt kettő, a G-C párt pedig három H-híd köti össze.

Mivel a bázispárok a cukor - foszfát palást belsejében nem átlósan helyezkednek el, ezért egy kis és egy nagy árok jön létre a másodlagos szerkezetben. A duplaszálú DNS-en belül érvényesül az egymás felett elhelyezkedő aromás bázisok közötti apoláros kölcsönhatás („katal hatás”) is. A kétféle kölcsönhatás fiziológiás körülmények között, hosszú láncokban jelentős kötéseket képvisel. A fiziológiástól eltérő környezetben különböző másodlagos szerkezetek jöhetnek létre. A Watson és Crick által felfedezett kettőszálú DNS szerkezeteknek napjainkra egész csoportja vált ismertté. Jobbmenetes formák az A, B, C, D, E, K, T DNS-ek. Az RNS-DNS hibridek és a cruciform (kereszt alakú) szerkezetek szintén jobbmenetes lefutásúak. Balmenetes szerkezetű a Z DNS. Fiziológiás DNS-nek tartjuk az A, B és Z-DNS-t. A fiziológiás viszonyoktól távol eső kristályos DNS-minták elemzésével felfedezett C, D, L, S, T, V szerkezetek *in vivo* előfordulása kétséges. A Watson-Crick féle kettőszálú DNS-en B-DNS-t értünk. A B-DNS kettős szálának lefutása antiparalel bázissorrendet eredményez a két szálon. Fiziológiásan a DNS rendszerint a B alakot veszi fel mind a prokaryotákban, mind pedig az eukaryotákban. Az eukaryoták nukleoszómáiban 10 bázispár esik a kettős szál egy fordulatra, ami kissé lazább szerkezetet eredményez, mint a prokaryota DNS-re jellemző 10,4-es átlagérték. A B-DNS bázispárjai merőlegesek a hélix tengelyére. A szemközti bázisok síkja 12°-os torziós eltérést mutat, ezt nevezzük propeller csavarulatnak. A B-DNS bázispáronkénti rotációja 34,6°, a bázispárok távolsága 0,34 nm, egy menet magassága 3,4 nm, a kettős hélix átmérője 2 nm. Helyi torziós feszültségek hatására a B-DNS szálelválasztás és lánc törés

nélkül balmenetes hurokba fordulhat át. A balmenetes hurkoknál a DNS lineáris lefutása megtörik. Ennek a jelenségnek szerepe lehet a DNS hajtogatásában és szupertekercselésében. A B-DNS-nek önmagában is van némi görbülete (19°) egy virtuális tengelytől 112\AA távolságban mérve. Ez az enyhe görbület kedvez a zárt körkörös DNS kialakulásának és a szupertekercselődésnek.

A DNS harmadlagos szerkezete

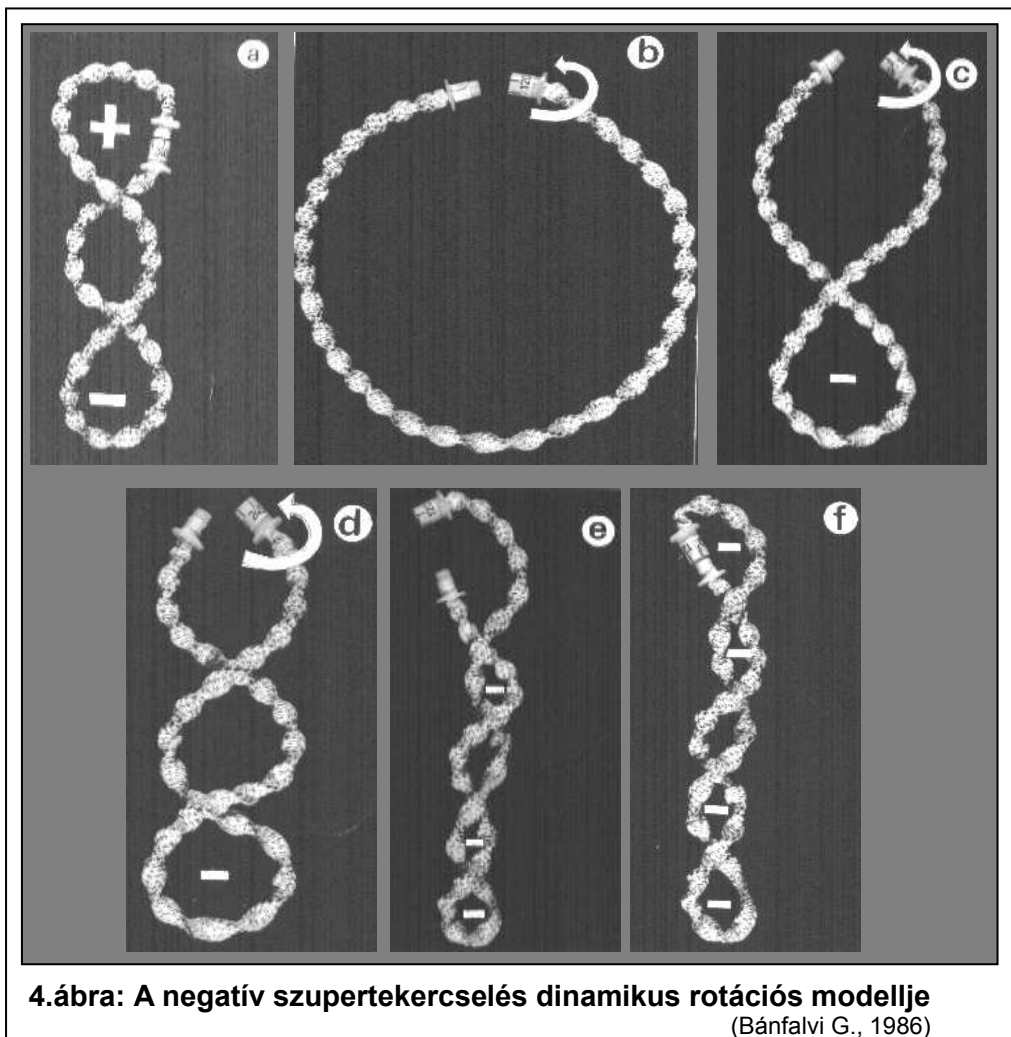
A harmadlagos szerkezet (topológia) a lineáris szekvenciában távol elhelyezkedő szakaszok topológiai viszonyaira utal. A legegyszerűbb és legstabilabb harmadlagos szerkezet az ún. relaxált körkörös DNS, mely nincsen hajtogatva, torziós feszültségektől mentes. A relaxált DNS úgy jön létre, hogy a duplaszálú, lineáris DNS gyűrűvé záródik. A kromoszómális DNS több ezerszer nagyobb lehet a sejt méreténél, így csak hajtogatva fér bele. Nyilvánvaló, hogy a DNS kicsomagolása is csak szakaszosan történhet. A klasszikus értelemben vett szupertekercselődés során a DNS önmagára tekeredik. Ilyen szupertekercselés a prokaryota sejtek DNS-ére jellemző. A sejtben található topoizomerek száma magas és változékony. A szupertekercselés termodinamikailag magasabb energiájú állapotot hoz létre a relaxált állapothoz képest, így energetikailag kedvezően hat a száleválasztó folyamatok, például replikáció, rekombináció, transzkripció lezajlására. Ha a relaxált körkörös B-DNS egy pontját rögzítve a DNS-t ettől távolabb jobbra forgatjuk, pozitív, ha balra sodorjuk, akkor negatív szupertekercset kapunk. A szerkezet úgy

rögzül, hogy kettős száltörés után, a hélix átfűződik majd ismét egyesül. Ezt a szupertekercselési folyamatot a II-es típusú topoizomeráz, a bakteriális giráz katalizálja. Egyéb topoizomerek is létrehozhatók: hurkolt, csomós, katenált, katenált és szupertekercselt, katenált és csomózott DNS.

A bakteriális DNS önmagára tekeredik plektonémásan és ily módon szupertekercselődik, mely kisebb kompaktságot eredményez, mint az eukaryoták nukleoszóma füzérjéből létrejövő szolenoid forma. Az eukaryota DNS-re jellemző szolenoid abban különbözik a plektonémától, hogy a nukleoszóma füzér nem önmagára tekeredik, hanem újabb helikális elrendezésben kondenzálódik, és nagyobb kompaktságot eredményez, mint a plektonéma. Lánctörés nélküli szupertekercselődés is létrejöhethet és szupertekercselt DNS szakaszok jöhetnek létre a torziós feszültség egyenetlen eloszlása miatt. A DNS egyes szakaszainak denaturálódása, például száleválasztó folyamatok eredményeként a szál más pontjain szupertekercselődés jöhet létre. Ennek a replikáció száleválasztási fázisában és a replikációs villa haladása során van jelentősége. Két duplaszálú DNS önmagára való feltekeredése tetraplex szerkezetet eredményez, pozitív és negatív szupertekercseket hozva létre a szál távolabbi részein.

A DNS harmadlagos szerkezetének változásait a topoizomerázok katalizálják a DNS lánc törésével és újraegyesítésével. Az I-es típusú topoizomerázok egy szálon hasítanak és működésükhöz nem igényelnek ATP-t, míg a II-es típusúak mindkét szálon hasítanak és ATP-igényesek.

A szupertekercselődés jelváltós modellje szerint a pozitív szupertekercsek bakteriális giráz által katalizált lánctörés és átfűződés révén negatív szupertekercsekké alakulnak, ATP igényes folyamatok során. A folyamat lépései: A pozitív szupertekercselt DNS kettős lánctöréssel relaxálódik. A törések mentén átfűződik a duplaszálú DNS, ezáltal negatív szupertekercs jön létre. A negatív szupertekercs stabilizálódik a láncok újraegyesülésével. Ez a modell nem tételezi fel a szálak törések mentén történő elfordulását és energetikailag kedvezőtlen az ismétlődő lánctörés és újraegyesítés miatt. A negatív szupertekercselődés dinamikus rotációs modellje szerint, a DNS duplaszálú törés után relaxálódik a szabad végek rotációjával (4.ábr. a.-b.), majd a szálak további forogásával (4.ábr. c.-d.) negatív szupertekercs jön létre. (4.ábr. e.) A szupertekercselés a szálak újraegyesítésével ér véget. (4.ábr. f.)



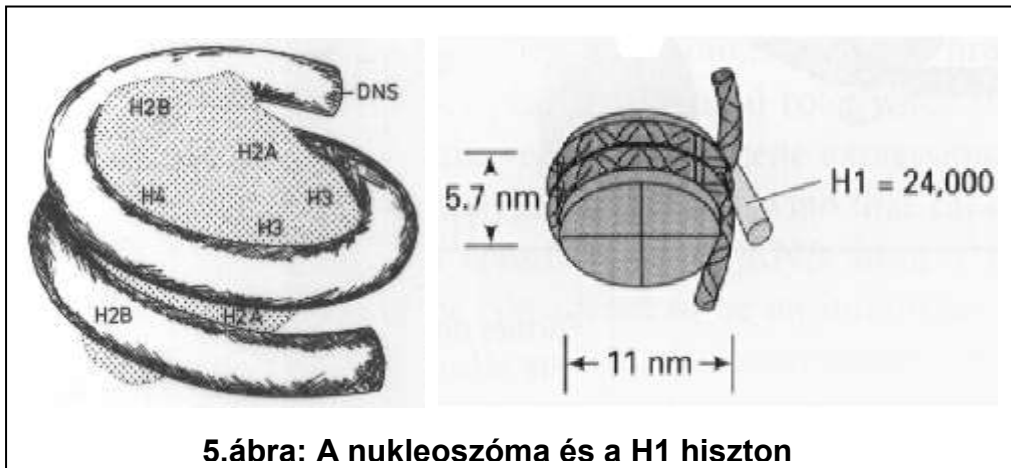
4.ábra: A negatív szupertekercselés dinamikus rotációs modellje
(Bánfalvi G., 1986)

Ez a modell kevésbé energiaigényes, mert nem tételezi fel a szálak ciklikus törését és újraegyesítését.

A II-es típusú prokaryota és eukaryota topoizomerázok képesek katalizálni a katenálást, dekaténálást, csomókötést és oldást a jelölt modellnek megfelelő módon.

Az eukaryota szupertekercs analóg: nukleoszóma

Míg a bakteriális DNS-ben a torziós feszültség arányos a szupertekercselés mértékével és a sejt energetikai állapotával, vagyis ATP-tartalmával, addig eukaryotákban a hiszton orsóhoz rögzített DNS torziós feszültsége nem additív módon izolálódik. Ezért a DNS kettősszát a $(H4)_2$, $(H3)_2$, $(H2a)_2$, $(H2b)_2$, hiszton oktetten rögzítő H1 hiszton fehérje a felelős. Az így létrejövő nukleoszóma 11 nm átmérőjű, magassága 5,7 nm, a DNS 145 bázispárja 1,8 fordulattal 2,8 nm-es menettávolsággal fut körbe rajta. A nukleoszómák közötti távolságot egy átlag 60 bázispár hosszúságú linker régió hidalja át. (5.ábr.)



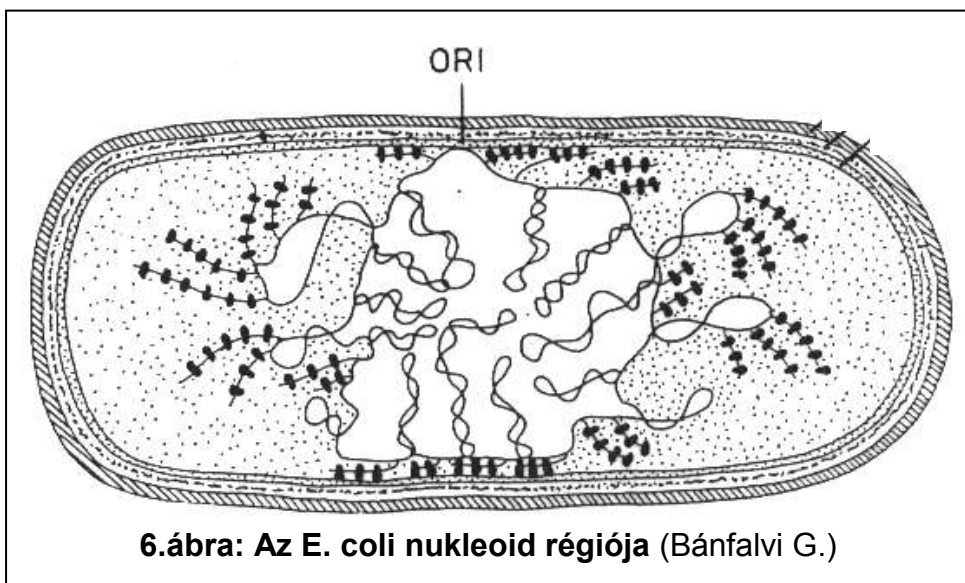
A prokaryoták és az eukaryoták genomjának harmadlagos szerkezetében tapasztalható különbségek eltérő génregulációs mechanizmusok kifejlődéséhez vezettek. A prokaryota genomban jelenlévő torziós feszültségek a gének kifejeződésének kedveznek, mert a szál felnyílása alacsonyabb energiaszintet jelent. Ennek megfelelően

a prokaryota információ átvitelre általában a negatív szabályozás a jellemző. Az eukaryota genom, a nukleoszómákban izolált alacsonyabb torziós feszültség miatt inaktívabb, itt a pozitív reguláció dominál. A torziós feszültség mértéke a DNS szintézis sebességét is befolyásolja, erre vezethető vissza a prokaryota és eukaryota DNS szintézis sebességében mutatkozó jelentős eltérés is.

2. A kromoszómális szerveződés

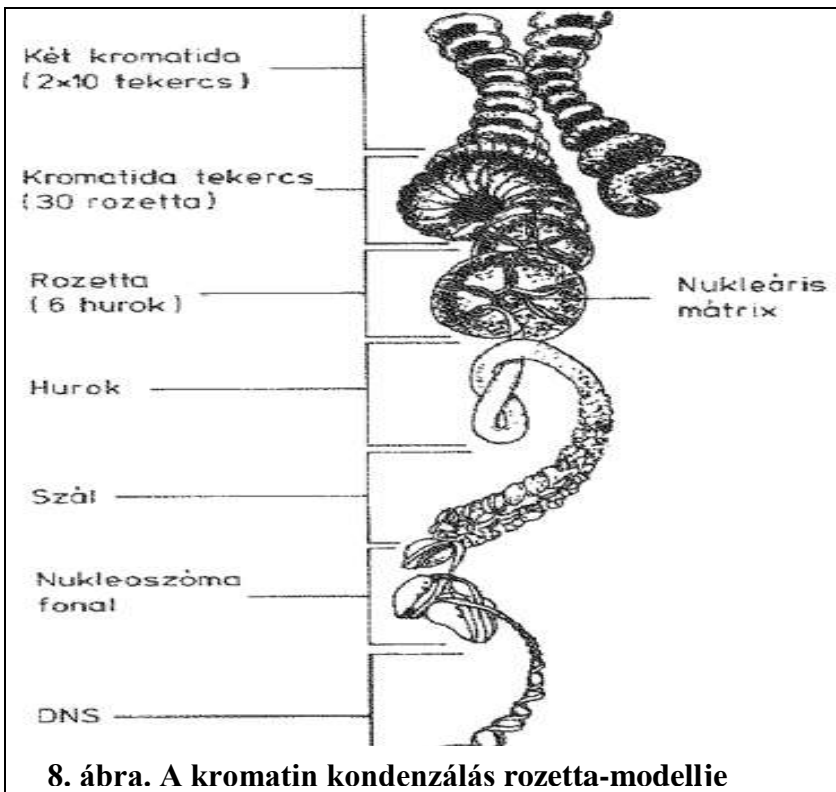
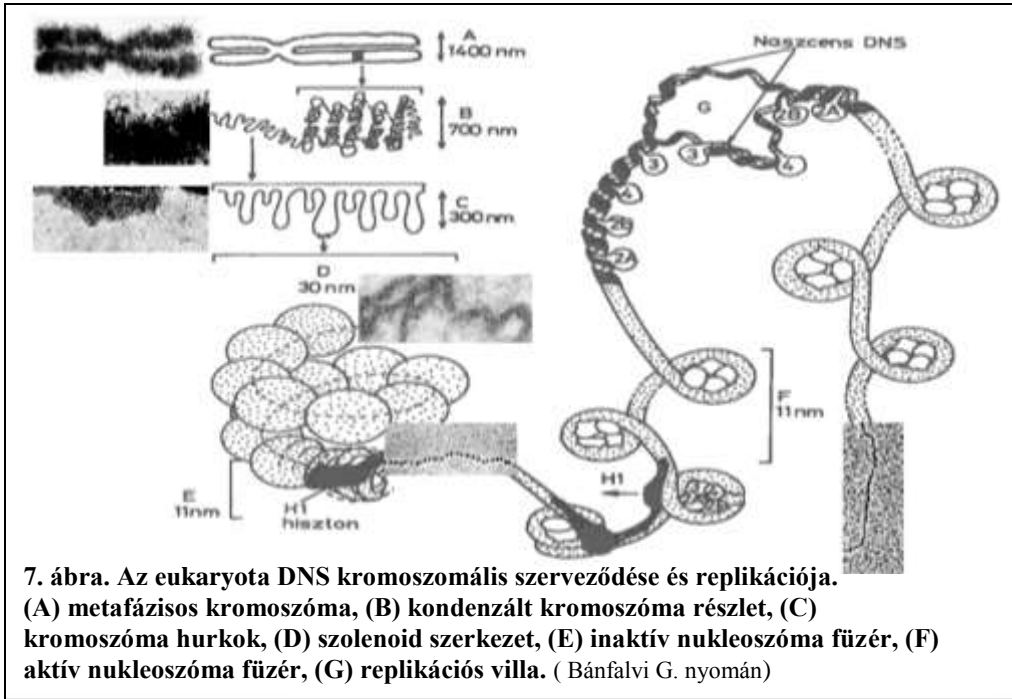
A prokaryota nukleoid

Az *E. coli* mintegy 4 megabázis méretű cirkuláris genomja a sejt egy kondenzáltabb, ún. nukleoid régiójában helyezkedik el. Ebben a régióban a DNS mellett RNS-t és fehérjéket mutattak ki. Autoradiográfias vizsgálatokból kiderült, hogy a szupertekercselt DNS a sejt egész ciklusa alatt érintkezik a sejtmembránnal, rögzülési pontja pedig a replikációs origó.



Az eukaryota kromoszóma kialakulása

Az eukaryota sejtek kromatinjának fehérjetartalma messze meghaladja a prokaryota genomhoz asszociált fehérjék mennyiségét. A gyöngysorszerűen megjelenő nukleoszóma füzér képezi a kromoszómális szerveződés alapját. Ez a 11 nm átmérőjű struktúra önmagában a DNS kompaktságát hatszorosára növeli. A DNS kompaktabbá válásában a következő szint a DNS eredeti hosszához képest negyvenszeres rövidülést biztosító szolenoid szerkezet, mely a nukleoszóma fonál spirális felcsavarodásával létrejövő kromatin fonálra jellemző. A kromatin fonál rendszertelen felcsavarodásával egy 300 nm átmérőjű bolyhos szerkezet, ún. bolyhos fonál (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 fonál a nukleáris mátrixra tekeredve és nem-hisztón fehérjékkel asszociálva hozza létre a kromatidákat, kromoszómákat (7. ábra.) Egy alternatív kromoszóma szerveződési modell szerint a szolenoid szupertekercs plektonémásan önmagára tekeredve hat hurokból álló rozettákat alkot és újabb szolenoid szerkezetet létrehozva kondenzálódik kromatida tekerccsé. (8. ábra.)



Emésztési kísérletek alapján a kromoszómák váza nem-hisztin fehérjékből áll, melyhez 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 is eltérő a DNS kompaktsága. A sejtmagon belül a heterokromatin kondenzáltabb, mint az eukromatin, tehát a génátírás ebben a régióban nehezebb, aminek fontos szerepe van a génexpresszió szabályozásában. A kondenzáltsági fok növekedése (heterokromatin) teljes kromoszóma inaktiválását is eredményezheti. Így például az egyik női X kromoszóma Barr testté alakul. A kromatin állomány szélsőséges kondenzálása valósul meg a spermiumban is, ahol a hisztin fehérjék helyett a kisebb molekulatömegű spermin és spermidin lép kölcsönhatásba a DNS-el. 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 $G_0 - G_1$ átmenet során, mind pedig a $G_2 - M$ átmenethez kötött DNS-repair aktivitásának szabályozásában. (Offer és mtsai, 2001)

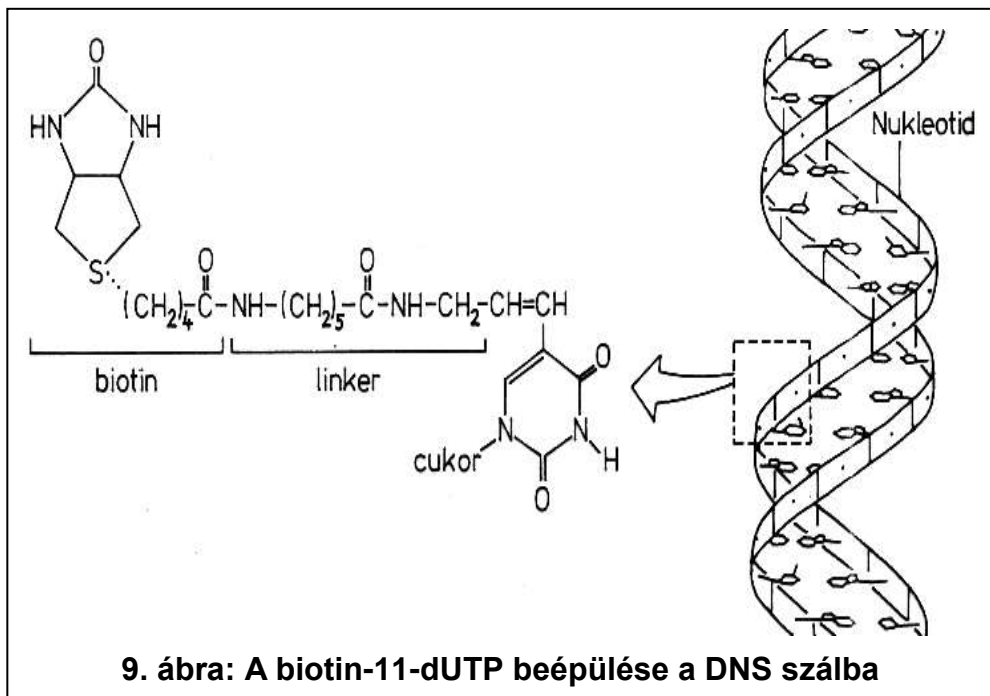
3. A kromatin kondenzálódás vizsgálata

A 30 nm átmérőjű kromatinszál fölötti szerveződés kialakulásáról kevés adat áll rendelkezésünkre (Belmont, 2002). Permeabilizált, interfázisos sejtek magján vizsgálták a kromatin kondenzálást a membrán regenerációja mellett (Banfalvi, 1993). A permeábilis sejtek replikációs köztitermékeit C-5 pozícióban szubsztituált pirimidin analógok felhasználásával vizsgálták, mivel erre a pozícióra úgy helyezhetők nagy térkitöltésű csoportok, mint például a Hg, hogy a DNS nagy árkába épülve, a DNS polimeráz funkcióját nem korlátozzák (Dale és mtsai., 1981; Langer és mtsai., 1981; Basnakian és mtsai., 1989). A biotin beépítése C-5 pozícióba szintén nem zavarja meg a replikációt (Hiriyanna és mtsai., 1988; Blow and Watson, 1987), ugyanakkor inkorporálódik a permeábilis sejtekbe (Hunting és mtsai., 1985; Nakayasu and Bereznyay, 1989). A biotin segítségével immunfluoreszcens módszerrel láthatóvá tehetők az újonnan szintetizálódott DNS szakaszok (Banfalvi és mtsai. 1989). A permeabilizálás megfordításával, membrán regenerációval, megőrizhető a sejtek életképessége és a replikációs gépezet intaktsága (Banfalvi és mtsai. 1984). 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 (Banfalvi és mtsai. 1989; Banfalvi, 1993).

4. A kísérleti rendszer előzményei

1. A biotin-11-dUTP beépítése naszcens DNS-be

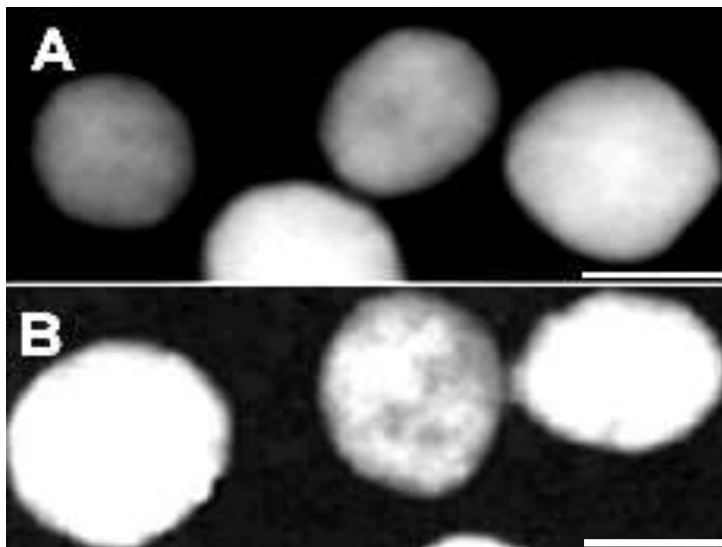
Vizsgálatainkat kínai hörcsög ovárium sejteken végeztük. A logaritmikus fázisban növekedő sejteket reverzibilis módon permeabilizáltuk. A újonnan létrejövő DNS a négy dNTP jelenlétében szintetizálódott úgy, hogy a dTTP-t kicseréltük biotin-11-dUTP-re. A biotin nukleotidok nem zavarják meg a DNS replikációt, de a DNS nagy árkába beépülve hosszú spacer karjuk révén gátolják a kondenzálódást, így a közti termékek feldúsulását okozzák. (9. ábra)



A biotin immunfluoreszcens jelölésével tettük láthatóvá az újonnan szintetizálódott DNS – szakaszokat. A nagyfelbontású elutriációval nyert szinkronizált sejtfrakciók vizsgálata során a biotinálást, és az immunfluoreszcens jelölést elhagytuk, a sejtciklus lelassítására a reverzibilis permeabilizálás elégségesnek bizonyult. A sejtmagokat izoláltuk, majd mechanikai feltárásnak vetettük alá. Az intermediereket diaminofenil-indollal (DAPI) való DNS festés után fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A rögzített felvételek elemzése az e célra általunk kifejlesztett Kromatin Image Analízis (CIA) nevű célszoftverrel történt.

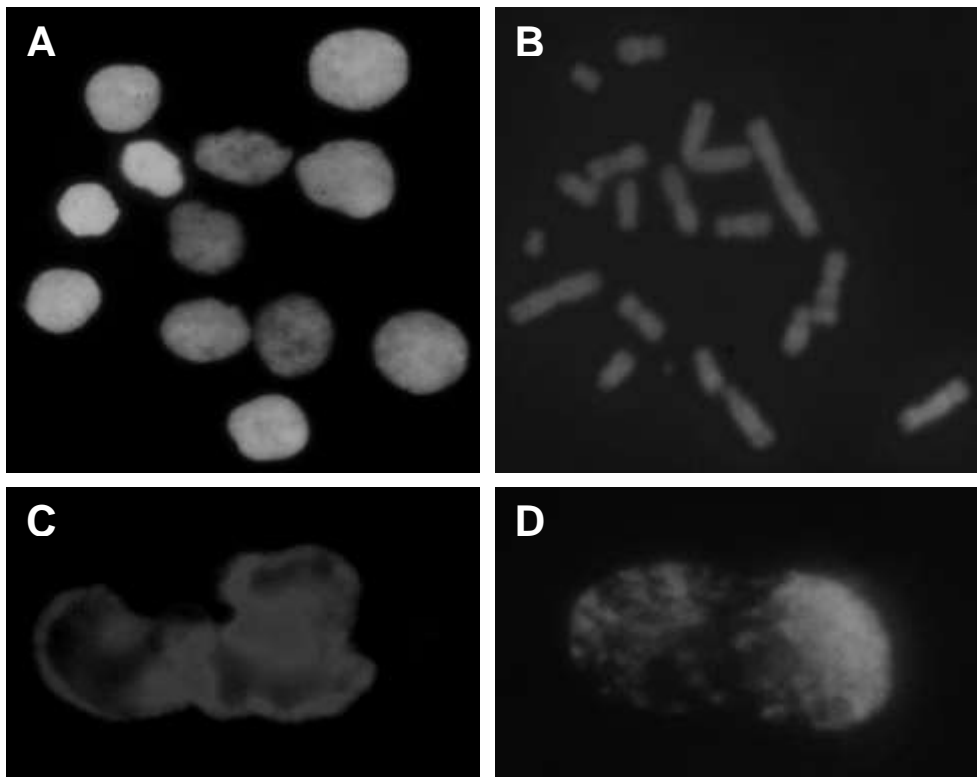
2. A permeabilizálás hatása a sejtmag integritására

Kontroll kísérletben megvizsgáltuk a permeabilizálás hatását a sejtmagokra (10. ábra A, B).



10.ábra. Permeabilizálás hatása a CHO sejtek kromatinállományára. (A) DAPI-val festett permeabilizálatlan CHO sejtmagok. (B) DAPI-val festett, permeabilizált, majd helyreállított membránintegritású CHO sejtek magjai. Vonal: 5 μ m

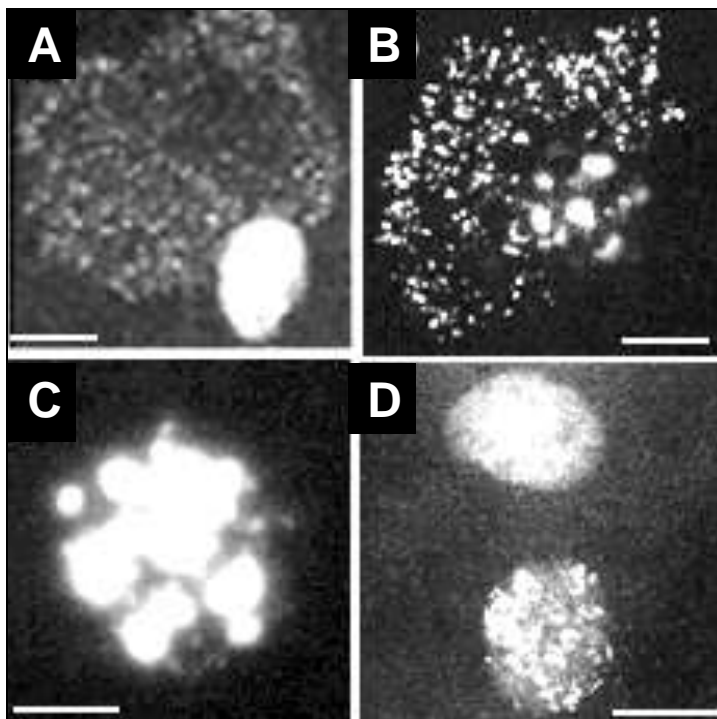
A kezeletlen sejtekről készült felvételeken interfázisos magokat és metafázisos kromoszómákat figyelhetünk meg. (11. ábra A, B). Egy másik kontroll kísérletben nem regeneráltuk a mag- és a sejtmembránokat, ami a sejtmagok homogén dezintegrációjához vezetett. (11. ábra C) A kondenzálódás intermedierjei azoknál a sejtpopulációknál figyelhetők meg jól, melyeknél a maghártya regenerációja nem volt tökéletes. Ezen sejtek magja a 30 cm-ről való lecseppentés hatására felszakadt, lehetővé téve a mikroszkópos megfigyelést. (11. ábra D).



11.ábra: (A) Interfázisos magok, (B) metafázisos kromoszómák, (C) Dezintegrált mag, (D) Felszakadt mag (Bánfalvi és mtsai. 1989)

3. A biotin-nukleotid beépülés hatása a CHO sejtek kromatinszerkezetére

A membrán integritásának helyreállítása után a biotinált DNS a feltárt magból kiszabadulva dekondezálta struktúrát mutat. (12. ábra, A, B, C). A 12. ábra D felvételén látható két mag közül az alsó replikációs fázisban van, míg a felső replikációs nyugalmat mutat. A biotin nem épül be metafázisos kromoszómákba pulse-chase labelling után sem, hanem nagy kromatin klaszterek jönnek létre, a korábbi megfigyeléseknek megfelelően (Banfalvi és mtsai.1989). Ezért a későbbi vizsgálatok során a biotinált nukleotidok beépítését elhagytuk.

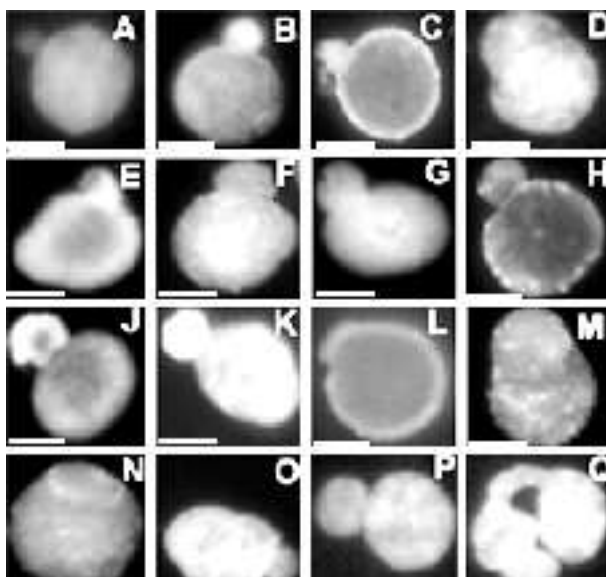


12. ábra. Biotinilálás hatása a CHO sejtek kromatinstruktúrájára. (A) Permeabilizált, biotinillált, regenerált CHO sejtek magja. (B, D) Permeabilizált, biotinillált, regenerált CHO sejtek magja immunfluoreszcens amplifikáció után. (C) Azonos az előzőekkel, de a biotinilálást 1 órás inkubáció követte 1mM dTTP-vel. Vonal: 5 μ m. (Bánfalvi és mtsai. 1989)

III. Eredmények 1.

1. Dekondenzált kromatin szerkezetek biotinált CHO sejtpopulációban

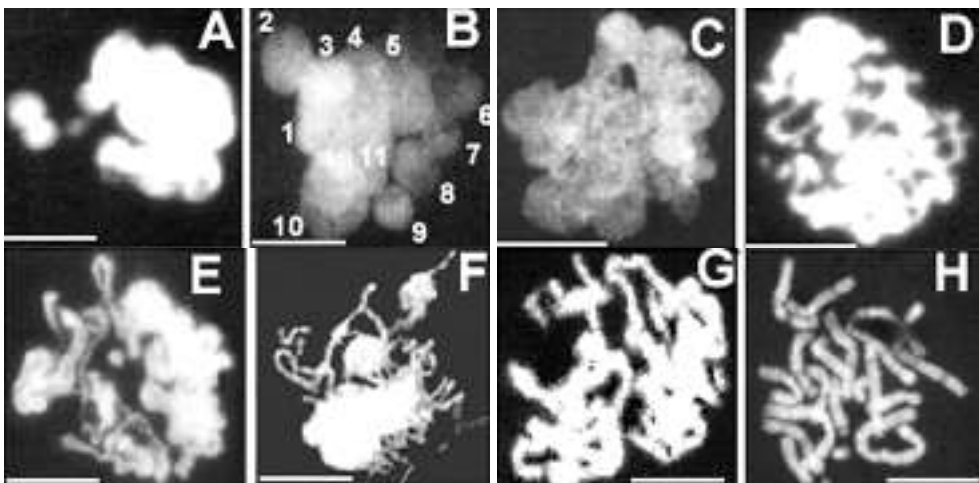
A biotinálás elhagyásával nyert mintákon nem tapasztaltuk a korai kondenzálási intermedierek feldúsulását. Megfigyeléseink szerint, a kondenzálás a magállomány polarizációjával kezdődik (13. ábra). Az S-fázisban lévő sejtek a kromatin állomány kondenzáltsági fokainak széles spektrumát fogják át. A maganyag polarizációjával szférikus kromatinrészek jelennek meg, mint a kromoszómák előtelepei (13. ábra A, B, C, F, G, O). A dekonzenzált DNS, bolyhos, fátyolszerű struktúrákat alkot (13. ábra D, O, P, Q), melyek egy lemezszerű magképlet kialakulását eredményezik (13. ábra D, J, K, L, M, N, P). A maganyag szalagszerű szerkezetet vehet fel, mely az elongált prekromoszómák kiindulási alapja lehet (13. ábra Q).



13. ábra. Dekondenzált kromatin szerkezetek biotinált CHO sejtpopulációban. Vonal: 5 μ m

2. Globuláris, szupertekercselt, fibrózus, szalagszerű kromatin szerkezetek biotinált CHO sejtpopulációban.

A kondenzálódó kromatin a fátolszerkezet tekercselődésével fokozatosan átalakul a globuláris szerveződési szinten át az elongált kromoszómák felé (14. ábra). A dekondezáltaabb szférikus kromatin testek (14. ábra A-D), egyre kompaktabb körkörös és fibrózus alakot öltenek (14. ábra D-E). A megfigyelhető szupertekercsek és kromatin testek, feltehetően az interfázisos kromoszómákat reprezentálják. A magrégió egyes részei ebben a stádiumban is dekondezáltaak (14. ábra F). A globuláris testek különböző hosszúságú, és vastagságú, egyre kompaktabb struktúrákon át (14. ábra D, E), alakulnak elongált kromoszómákká (14. ábra E-G). Az elongált pre-kromoszómák valószínűleg további hajtogatódás, és fehérjebeépülés révén érik el a metafázisos kromoszóma állapotot (14. ábra H).



14. ábra. Globuláris, szupertekercselt, fibrózus, szalagszerű kromatin szerkezetek biotinált CHO sejtpopulációban. Vonal: 5 μ m

3. Kromatin kondenzálás biotinátlan, szinkronizált CHO sejtpopulációban

A biotin-nukleotidok a korai kondenzációs köztitermékek feldúsulása révén teszik lehetővé a kromatinszerkezet vizsgálatát. Szinkronizált sejtpopulációban azonban vizsgálhatók az intermedierek biotinálás nélkül is, ezáltal a replikáció és kondenzálás megzavarása nélkül figyelhetjük meg a folyamatot. Biotinátlan, szinkronizált sejtpopulációkon végzett fluoreszcen mikroszkópos vizsgálataink során a szinkronizált sejtfrakciókban rendszeresen megfigyelt, fizikai behatások által nem deformált köztiformákat írtuk le. Ellenáramú centrifugális elutriáció során nyolc sejtfrakciót gyűjtöttünk. A frakciók sejtciklusban elfoglalt helyét az átlagos sejt- és magméret, a magátmérő, és a C-érték alapján határoztuk meg (1. táblázat).

Frakció szám	Áralmási sebesség (ml/min)	Sejtszám ($\times 10^6$)	Sejttérfogat (fl)	Átlagos magtérfogat (fl)	Átlagos magátmérő (μm)	Átlagos C-érték
1	13.5	2.2	770	n/a	n/a	2.02
2	19	3.51	836	190	6.8	2.21
3	24	12.83	988	230	7.2	2.55
4	30	17.87	1119	250	7.6	2.76
5	36	23.57	1268	280	8.0	2.98
6	41	14.08	1498	335	8.5	3.28
7	47	9.12	2004	470	9.9	3.72
8	52	3.14	2618	530	10.3	3.99
Kontroll		9.15	1231	265	7.9	

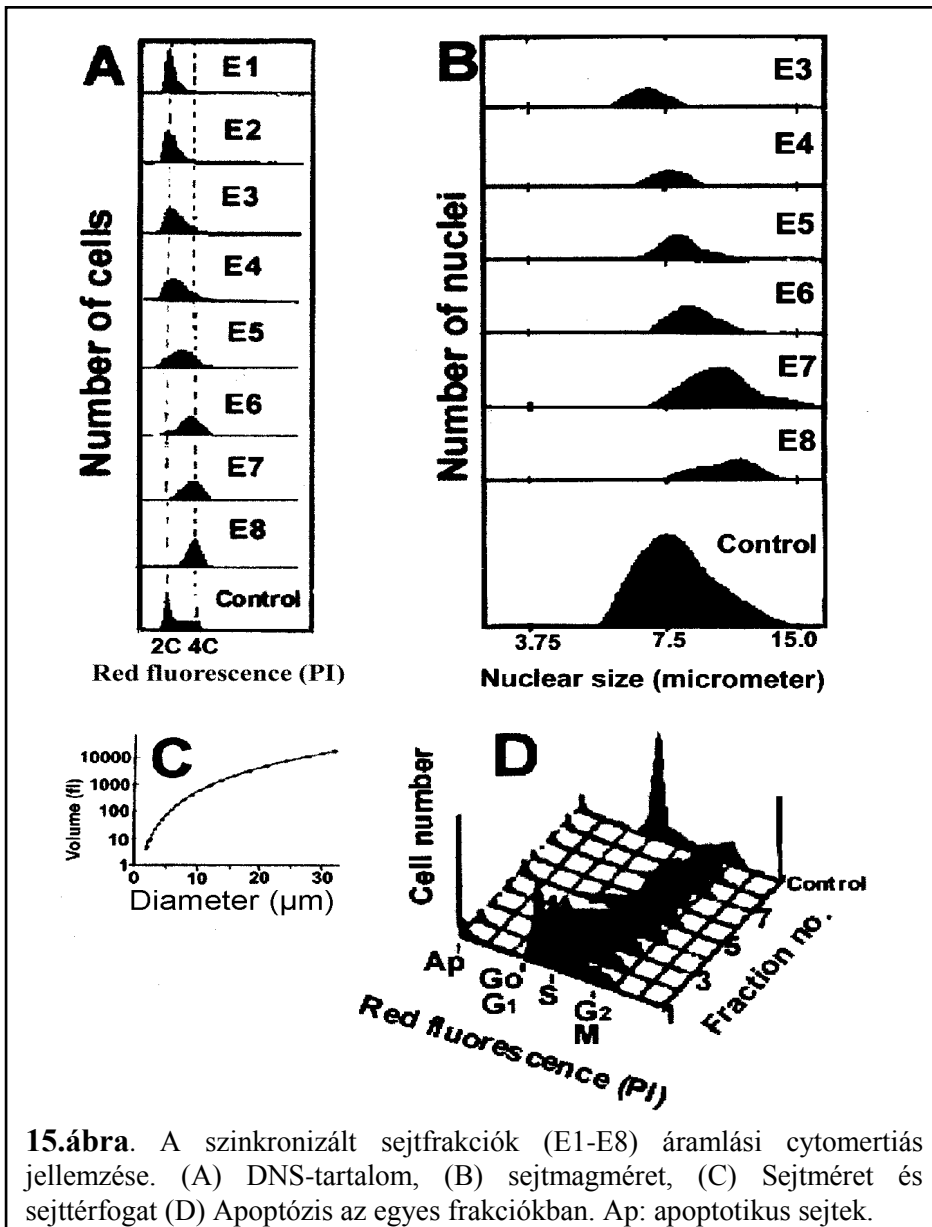
1. Táblázat. Szinkronizált sejtpopulációk tulajdonságai.

Elutriált sejtek száma: 9.7×10^7 (100 %)

Elutriálódott sejtek száma: 8.6×10^7 (89 %)

Sejtvesztés az eljárás során: 1.1×10^7 (11 %)

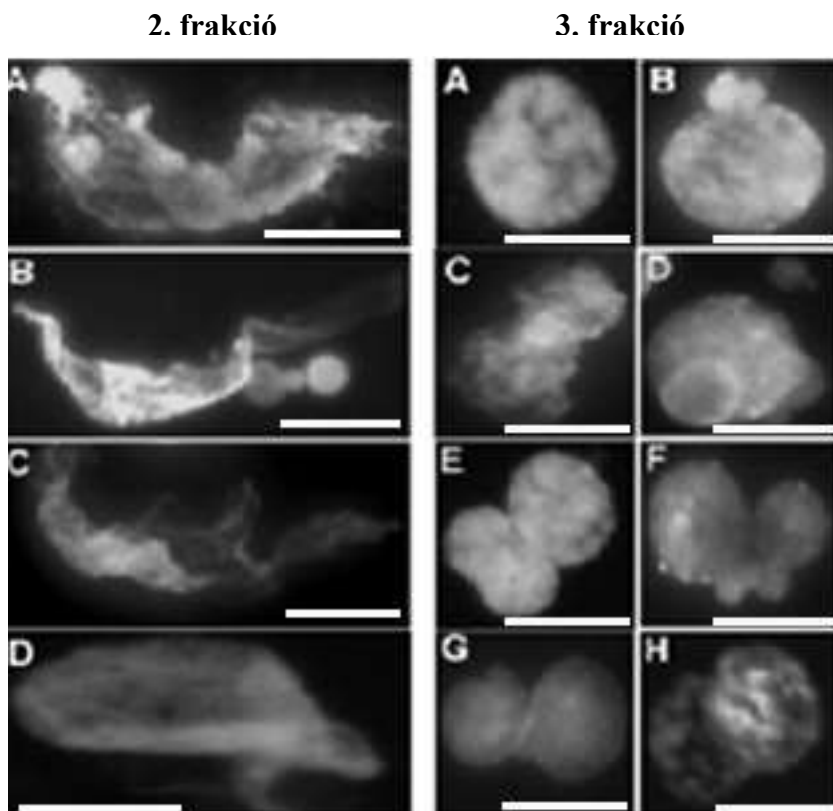
A sejtciklus paramétereit áramlási citometriás vizsgálattal határoztuk meg, mely a sejtpopulációk szinkronizálásának kontrolljaként is szolgált (15. ábra A-C). Ugyanígy vizsgáltuk a sejtmembrán helyreállítás apoptózis indukáló hatását. Azt tapasztaltuk, hogy minden frakcióban 5 % alatt maradt az apoptotikus ráta (15. ábra D), a kezeletlen populációkhoz hasonlóan.



15.ábra. A szinkronizált sejtfrakciók (E1-E8) áramlási cytometriás jellemzése. (A) DNS-tartalom, (B) sejtmagméret, (C) Sejtméret és sejttérfogat (D) Apoptózis az egyes frakciókban. Ap: apoptotikus sejtek.

4. Korai S-fázisban szinkronizált sejtek dekondezálta kromatin formái (2.0 – 2.5 C)

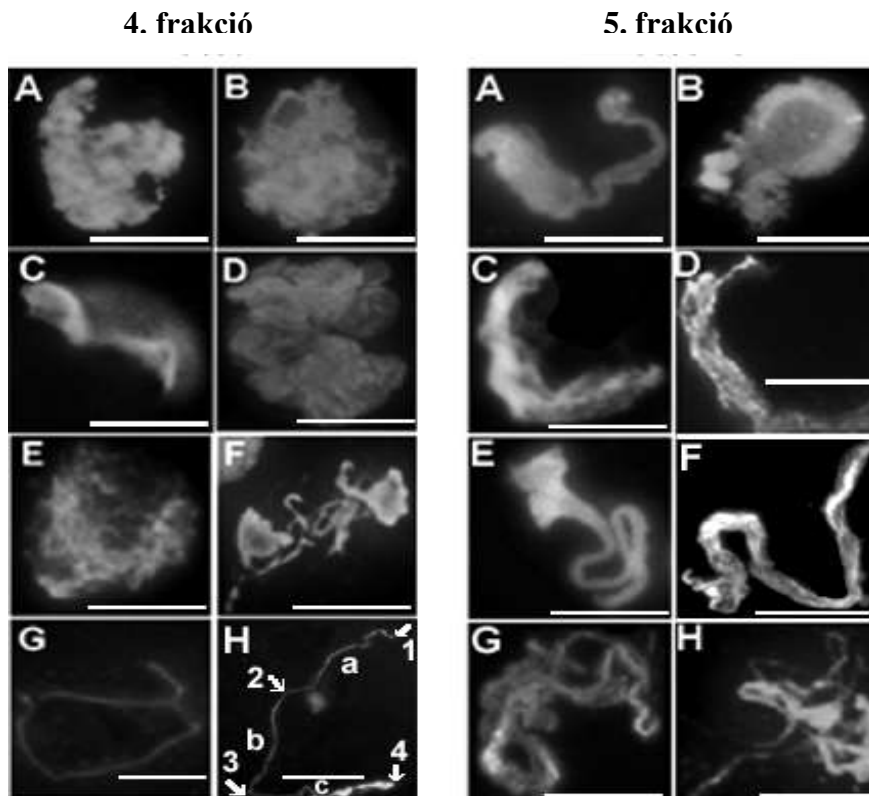
A 2. frakció sejtjei a korai S-fázisban (2.21 C-érték), erősen dekondezálta kromatin állománnyal rendelkeznek (16. ábra bal panel). Kromatinszerkezetükre a bolyhos, fátyolszerű formák jellemzőek. A elutriálás 3. frakciójában (2.55C) a kromatin polarizációja figyelhető meg (16. ábra jobb panel A-D), hasonlóan a biotinált sejtekhez. Ebben a frakcióban már megfigyelhető bizonyos fokú szupertekercselődés is (16. ábra jobb panel E-H).



16. ábra. Elutriációval szinkronizált CHO sejtek, 2.-3. elutriációs frakció (2.0 – 2.5 C). Vonal: 5 μ m

5. Korai és középső S-fázisban szinkronizált sejtek átmeneti kromatin formái (2.5 – 3.0 C)

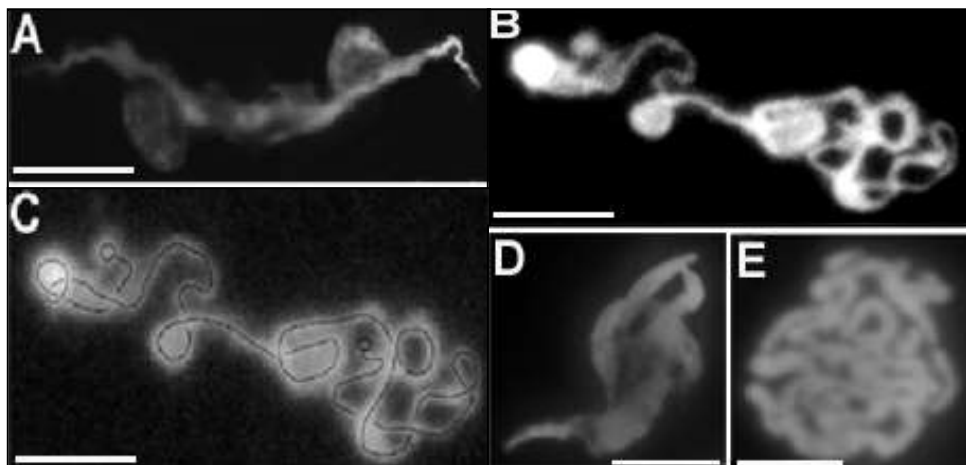
A 4. frakció korai-közép S fázisban (2.76C) lévő sejtjeinek magjában megfigyelhető, amint a fátyolszerű kromatin fokozatosan szupertekercselt hurkokat alkot (17. ábra bal panel A-E). Körülbelül 300 nm vastag, eukromatinhoz hasonló, fonalak jelennek meg (17. ábra bal panel G-H). Az 5. frakcióban (2.98C) a fibrózus szerkezetek tovább kondenzálódnak szalagos struktúrákká (17. ábra jobb panel A-F). A kondenzálás jól megfigyelhető a 17. ábra jobb panel G felvételén.



17. ábra. Elutriációval szinkronizált CHO sejtek, 4.-5. elutriációs frakció (2.5 – 3.0 C). Bal panel (H (a-c)) és nyilak: eltérő kondenzáltságú kromatinrészek folytonos szálon belül. Vonal: 5 μ m

6. Prekromoszómák lineáris elrendeződése szinkronizált CHO sejtekben (3.0 – 3.5 C)

A 6. frakcióban lineáris elrendezésű kromatin struktúrákat találunk (18. ábra). Gyakran lineáris kromatinszálhoz, mint gerinchez asszociálódott dekondezált kromoszómák figyelhetők meg (18. ábra A, D). Az előző frakcióban észlelt kondenzációs dinamika itt is megjelenik a kromatinszál végein (18. ábra A). A 18. ábra B felvételén megfigyelhető hosszú kromatinszál gerincét vonallal jelöltük, míg végeit az elemzés során két körrel jeleztünk (18. ábra C). A hurkok mellett nem találunk elkülöníthető kromoszómákat, ami egybevág azon megfigyelésünkkel, miszerint a kromatinszál kontinuitása egészen az elongált prekromoszómális stádiumig fennmarad (18. ábra E).



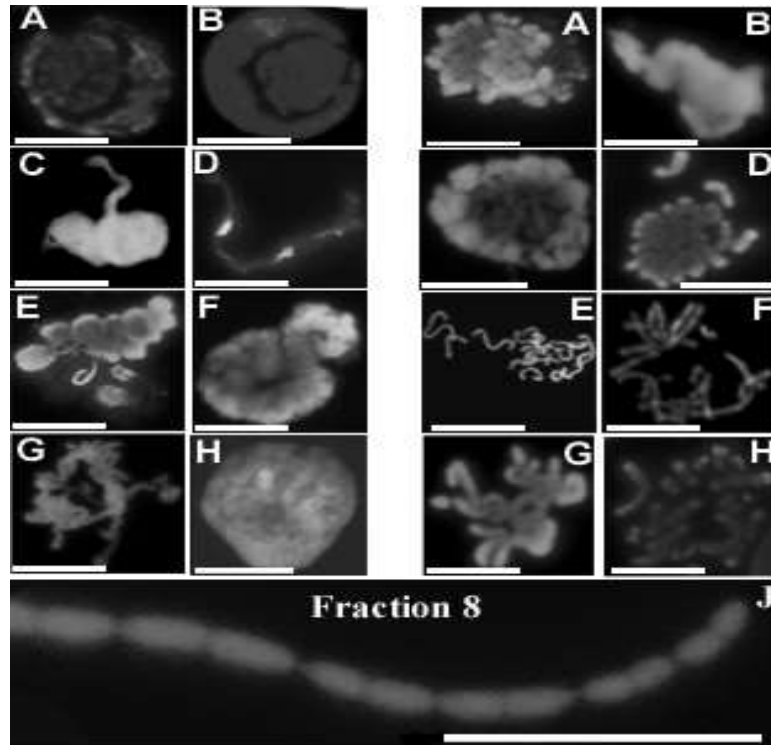
18. ábra. Elutriációval szinkronizált CHO sejtek, 6. elutriációs frakció (3.0 – 3.5 C). Vonal: 5 μm

7. Korai kromoszóma formák megjelenése szinkronizált CHO sejtekben (3.5 – 4.0 C)

A késői S fázisban (7. frakció, 3.72C) láthatóvá válnak a kromoszómák ívesen, körkörös elrendeződött csoportjai (19. ábra bal panel). Ekkor már különálló kromoszómák is megfigyelhetők (19. ábra bal panel E, G, H). Az utolsó szinkronizált populációban (8. frakció, C 3.98), mely az S-fázis végét, G2 fázist és a metafázist is reprezentálja kompakt, de még nem teljesen kondenzált kromoszómák (19. ábra jobb panel) mellett, metafázisos kromoszómák (19. ábra jobb panel H) is megjelennek (19. ábra jobb panel E-G). A lineáris elrendeződés még a metafázisos kromoszómáknál is megfigyelhető (19. ábra J).

7. frakció

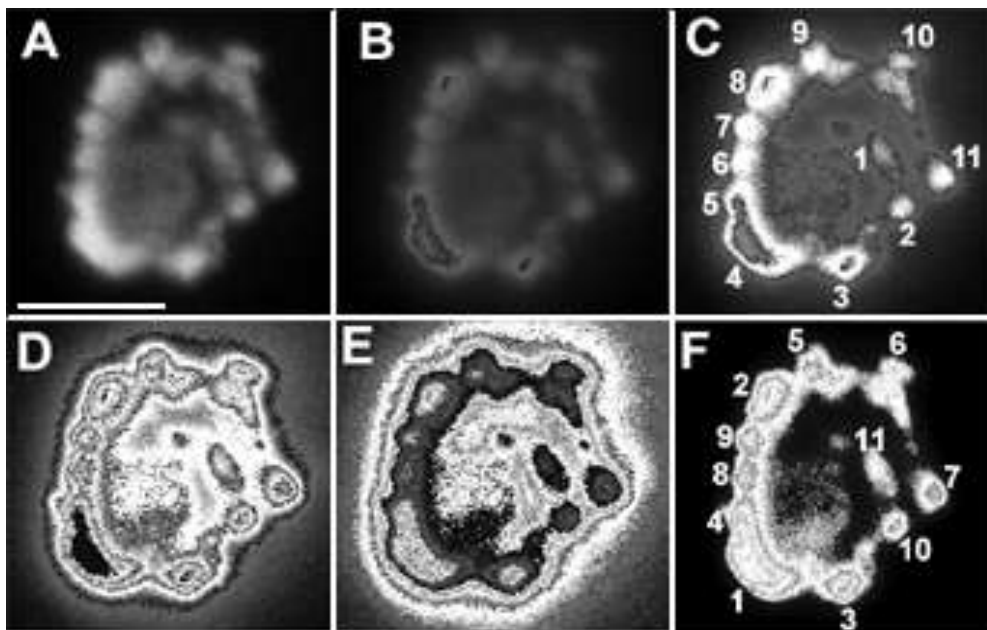
8. frakció



19. ábra. Elutriációval szinkronizált CHO sejtek, 7.-8. elutriációs frakció (3.5 – 4.0 C). Vonal: 5 μ m

8. Kromatin image analízis

A 7. frakciónak (3.72C) egy DAPI-val festett sejtmagján mutatjuk be, az intermedierek digitális analízisét (20. ábra). A kép



intenzitástartományából kalkulált intenzitási maszk illesztése több lépésben történt (20. ábra B-F). Az intenzitási spektrum elemzését az egyes kromoszómákra jellemző hisztogramm tartományok kétdimenziós egymásra vetítésével valósítottuk meg. Az így kapott intenzitási térkép által mutatott maximumok száma megegyezett a CHO sejtek kromoszómaszámával. A kromoszómák méret szerinti elkülönítése révén feltérképezhetővé vált a kromoszómák kapcsolódási sorrendje ezen korai stádiumban (20. ábra F).

20. ábra. 7. frakció (3.72C) DAPI-val festett sejtmag digitális analízisének lépései. Vonal: 5 μm

9. Morfológiai változások a kromatin kondenzálás során

A korai dekondezálta formák vatta-szerűen önmagukra tekeredő szárai, a folyamat előrehaladtával fátyolszerű struktúrává szerveződnek, melyek egy közepől kondenzálódó fonál alakú átmeneti stádium után gömbformájú kromatin testekké állnak össze. Ezek a kromatin testek a további kondenzálás során patkó alakot vesznek fel. A folyamat végén a patkó alak kiegyenesedik és megjelennek a metafázisos kromoszómák.

Megfigyelhető, hogy a biotin által megakasztott kondenzálás gyakran okozza a sejtek kondenzációs polaritását. Az előrehaladott stádiumban lévő kondenzációs alakok mellett is megfigyelhetők laza vagy a kondenzálódás kezdeti stádiumában lévő formák ugyanazon sejtmagban. Ez alátámaszthatja azon feltételezést, miszerint az egyes kromoszómák kialakulása nem azonos időben zajlik.

IV. Eredmények 2.

1. Genotoxikus hatások vizsgálata a kromatinállomány szerveződésére

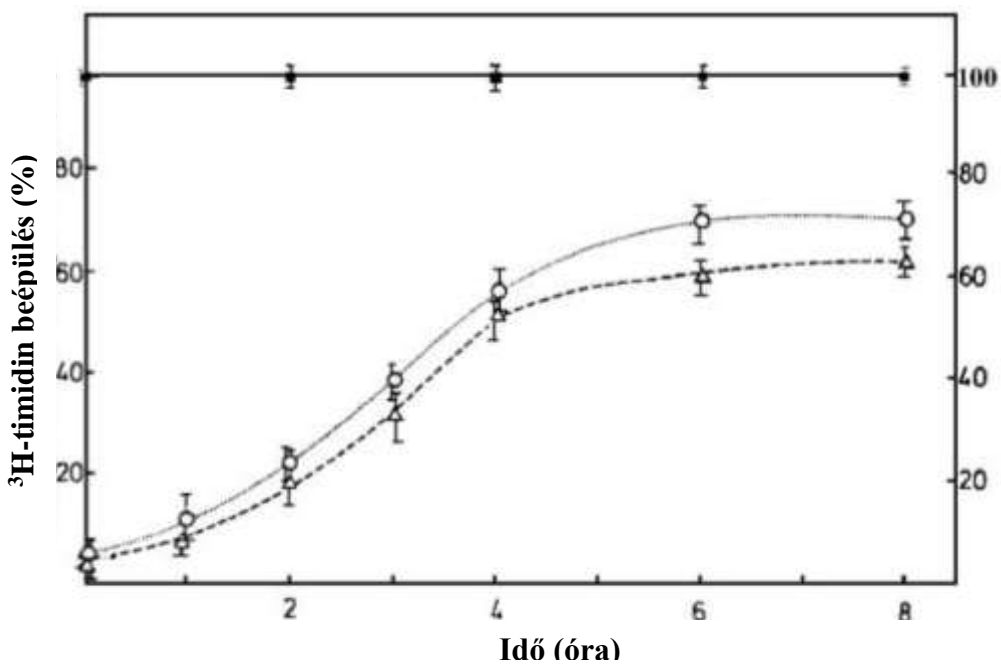
A genotoxikus ágensek a kromatinállomány fizikokémiai sebezhetőségének függvényében fejtik ki destruktív hatásukat. A DNS replikációja, és a kromatin kondenzálása során az örökítőanyag sérülékenyebb. Mivel a gamma – sugárzás genotoxicitása régóta ismert, feltételeztük kromatinkondenzálást befolyásoló szerepét is. A CHO sejtek kromatinállományának vizsgálatánál alkalmazott nagyfelbontású elutriációs sejtszinkronizációval követtük a gamma-besugárzás hatását egér preB-M8 sejttenyészetben.

Az irodalmi előzmények alapján elsősorban apoptotikus testek megjelenését vártuk gamma besugárzás hatására, bár a folyamat interfázisos stádiumai kevésbé ismertek.

2. A sejtmembrán regenerációja permeabilizálás után

A sejtek életképességét tripánkék vizsgálattal és ^3H -timidin inkorporáció méréssel vizsgáltuk.

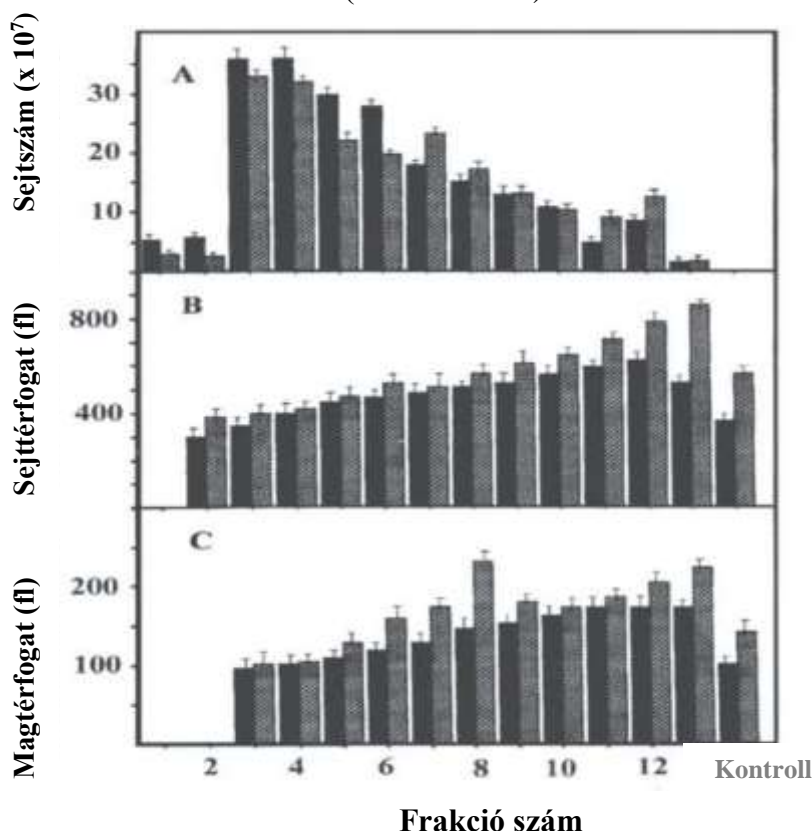
Mind a besugárzott (O), mind a kezeletlen (Δ) sejtek timidin inkorporációs rátája lelassult 4 órával a regeneráció kezdete után, míg a permeabilizálatlan, kontroll sejteké (\blacksquare) konstans maradt.



21. ábra. ^3H -timidin inkorporáció alakulása a membrán regenerálódása során.

3. Az szinkronizált egér preB sejtfrakciók flow - citometriás jellemzése

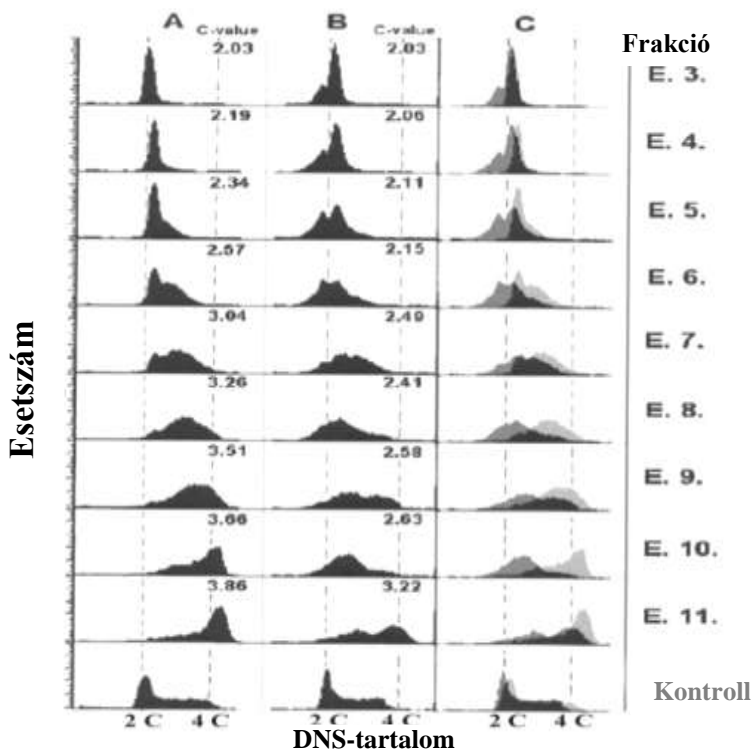
Az elutriációs szinkronizálás során 13 frakciót gyűjtöttünk. Besugárzás előtt és után áramlási citometriás vizsgálatnak vetettük alá az elutriált sejtpopulációkat (22. ábra). A G0-G1 fázishoz tartozó 1.-2. frakciókban és a korai S fázishoz tartozó 3.-6. frakciókban csökkent, míg a korai középső S fázishoz tartozó 7.-8. frakcióban és a középső S-fázishoz tartozó 11.-12. frakcióban nőtt besugárzás hatására a sejtszám (22. ábra A). A sejtek és sejtmagok térfogata besugárzás hatására minden frakcióban nőtt (22. ábra B-C).



22. ábra. Gamma besugárzás hatása az egyes frakciók (A) sejtszámára, (B) sejttérfogatára és (C) magtérfogatára. (sötét oszlopok) kezeletlen sejtek, (szürke oszlopok) besugárzott sejtek.

4. Korai S-fázis blokkolás gamma-besugárzás hatására

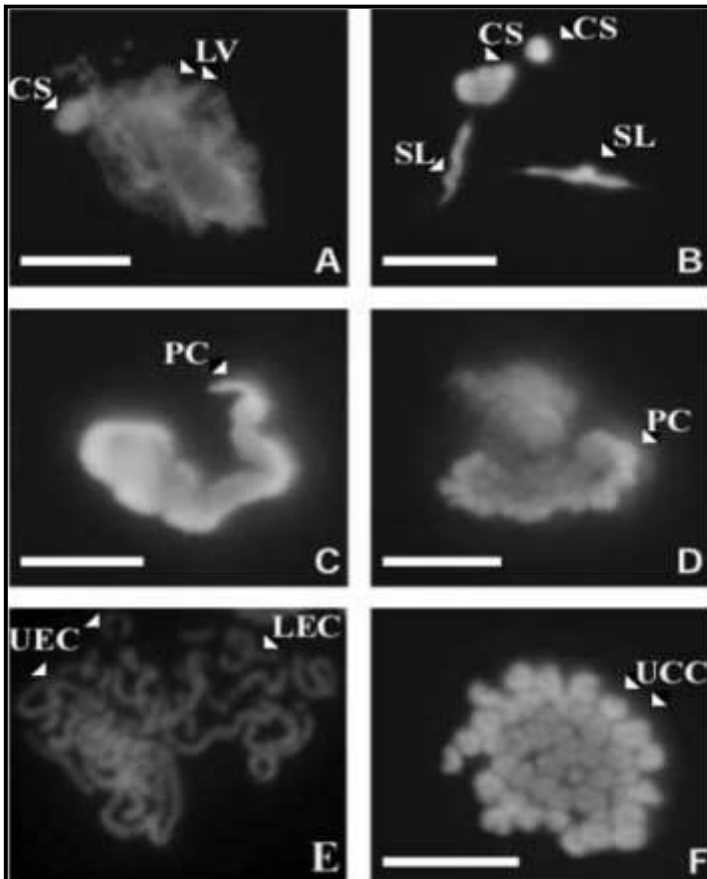
Az elutriált sejtek kétharmadát adó 1.-6. frakcióban a korai S – fázis sejtjei domináltak, míg a maradék a középső S-fázis és az M fázis közötti sejteket tartalmazta. A besugárzatlan sejtek citometriás profilja a DNS tartalom fokozatos növekedését mutatja 2.03-tól 3.86 C értékig (23. ábra A). A 400 R gamma-besugárzásnak kitett sejtek DNS tartalma kétfázisú eloszlást mutat, mely a magállomány heterogenitására utal minden besugárzott populációban (23. ábra B). A besugárzott sejtek minden frakciójában alacsonyabb DNS tartalmat mértünk, mint a besugárzatlan sejtek megfelelő frakcióiban. A besugárzott populációkban a DNS tartalom növekedése a 8. frakciónál megáll.



23. ábra. Gamma –besugárzás hatása a sejtfrakciók DNS tartalmára. A kezeletlen sejtek (A) és a besugárzott sejtek (B) sejtciklusmintázata az elutriált frakciókban. A (C) oszlop az átfedő régiókat mutatja.

5. A besugárzatlan sejtek kromatin morfológiája

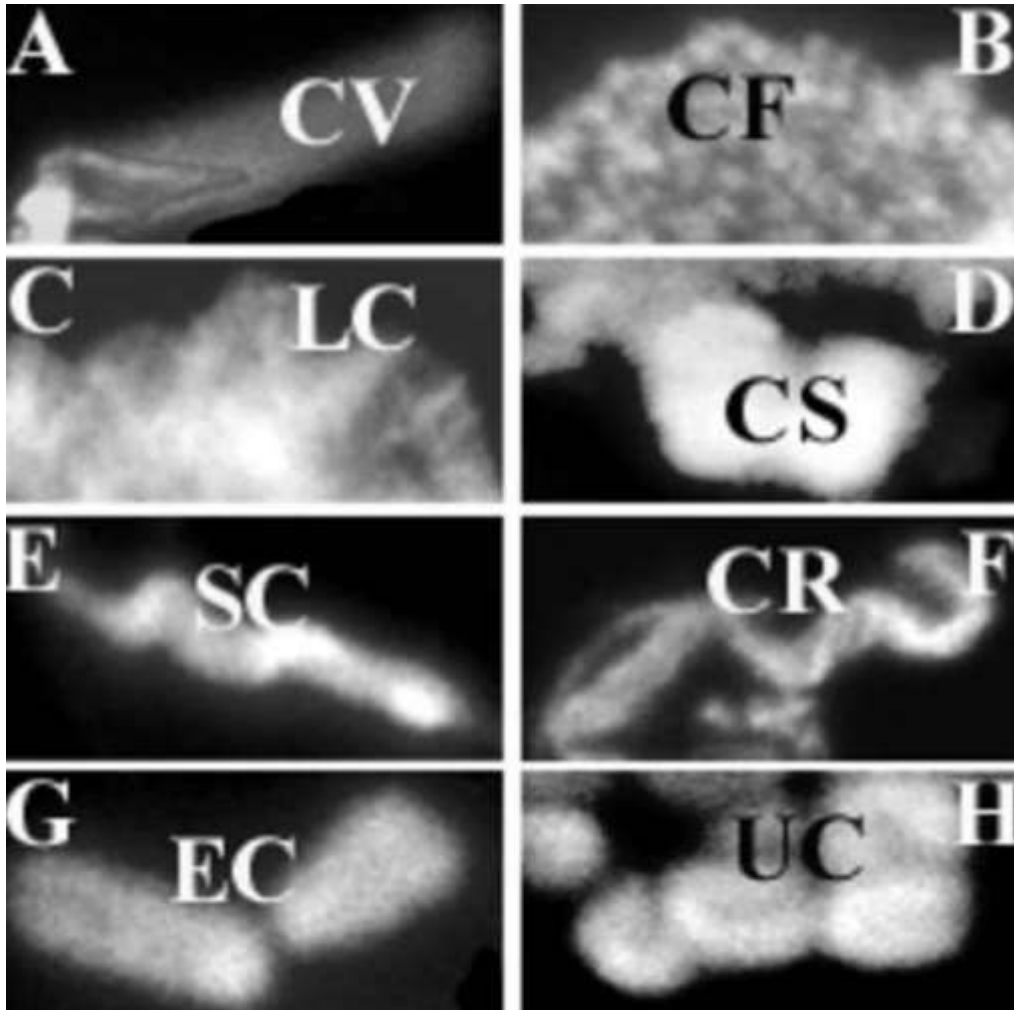
A besugárzatlan egér preB sejtek alapvetően a CHO sejteknél felismert köztiformákat prezentálják. A kondenzálás lépései ennél a sejttypusnál is a fátolszerű struktúráktól a polarizációs stádiumon át az elongált prekromoszóma szerkezetig, majd a metafázisos kromoszómákig terjedő intermedierekkel jellemezhetők (24.-25. ábra).



24. ábra. A kromatin kondenzálás intermedierei kezeletlen sejtekben.

Megfigyelt szerkezetek: (A) 4. frakció (2.19 C) csavart fátýol, (B) 6. fr. (2.57 C) kromatin testek, szupertekercselt hurkok, (C) 7. fr. (3.04) lineárisan kapcsolt szupertekercselt hurkok, (D) 8. fr. (3.26) prekondenzált kromoszómák, (E) 9. fr. (3.51) megnyúlt, U- és L- alakú prekromoszómák, (F) 10. fr. (3.66) patkó alakú kondenzált prekromoszómák.

Rövidítések: CS:kromoszóma kezdemény, LP: csavart fátýol, SL: szupertekercselt hurok, PC: prekondenzált kromoszóma, UEC: U- alakú elongált kromoszóma, LEC: hurkos elongált kromoszóma, UCC: U-alakú kondenzált kromoszóma. Vonall= 5µm

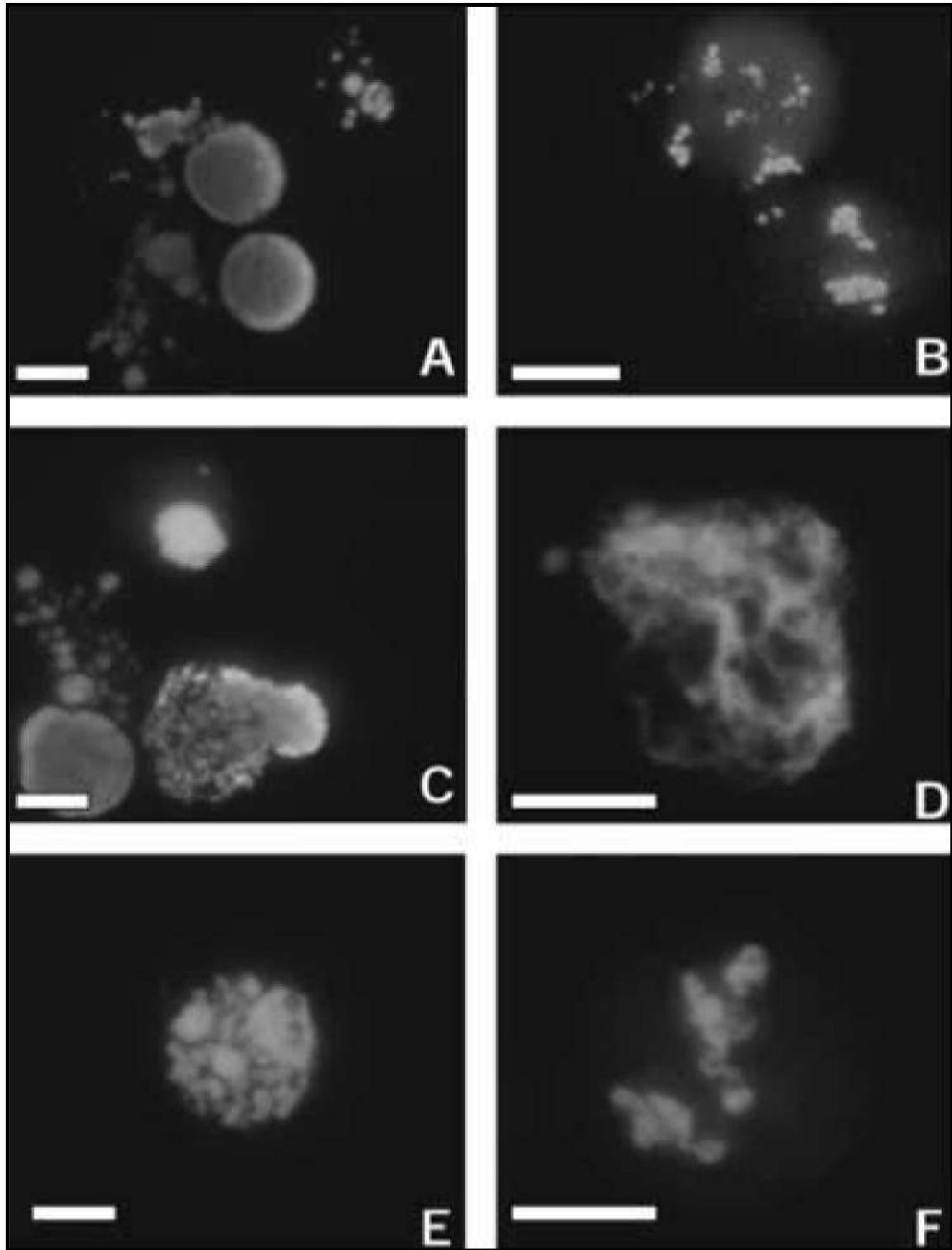


25. ábra. A kromatin kondenzálás jellegzetes intermedierjei kezeletlen egér pre-B M8 sejtekben.

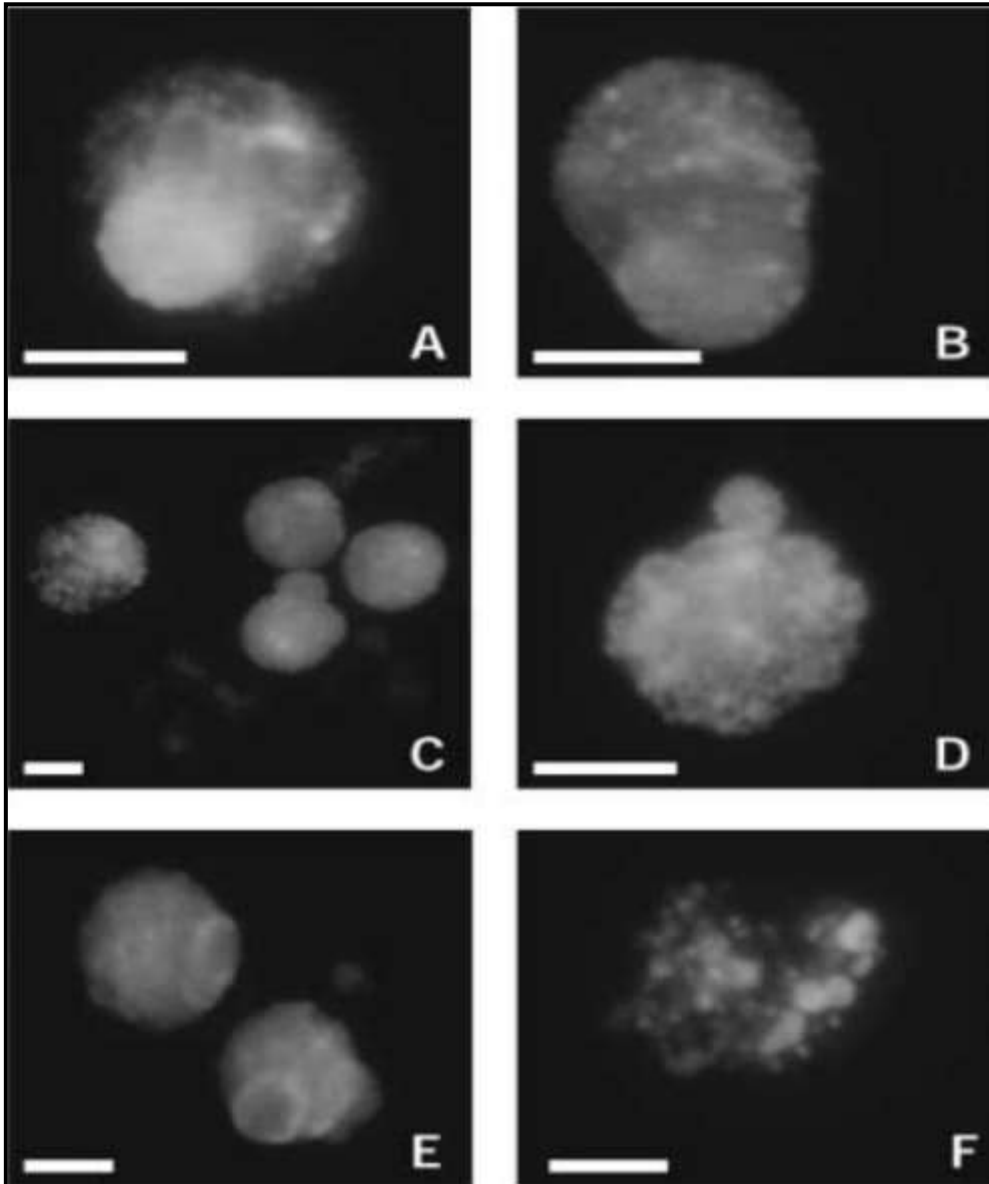
- (A) 2. fr. (2.0 C) CV: kromatin fátyol
- (B) 3. fr. (2.03 C) CF: kromatin szálak
- (C) 4. fr. (2.19 C) LC: kromatin hurok
- (D) 5. fr. (2.34 C) CS: kromatin testek,
- (E) 6. fr. (2.57 C) SC: szupertekercselt kromatin
- (F) 7. fr. (3.04 C) CR: kromatin szalag
- (G) 9. fr. (3.51 C) EC: elongált prekromoszómák
- (H) 11. fr. (3.86 C) UC: U-alakban hajlott prekromoszómák.

6. Apoptotikus változások a kromatinszerkezetben gamma-besugárzás hatására

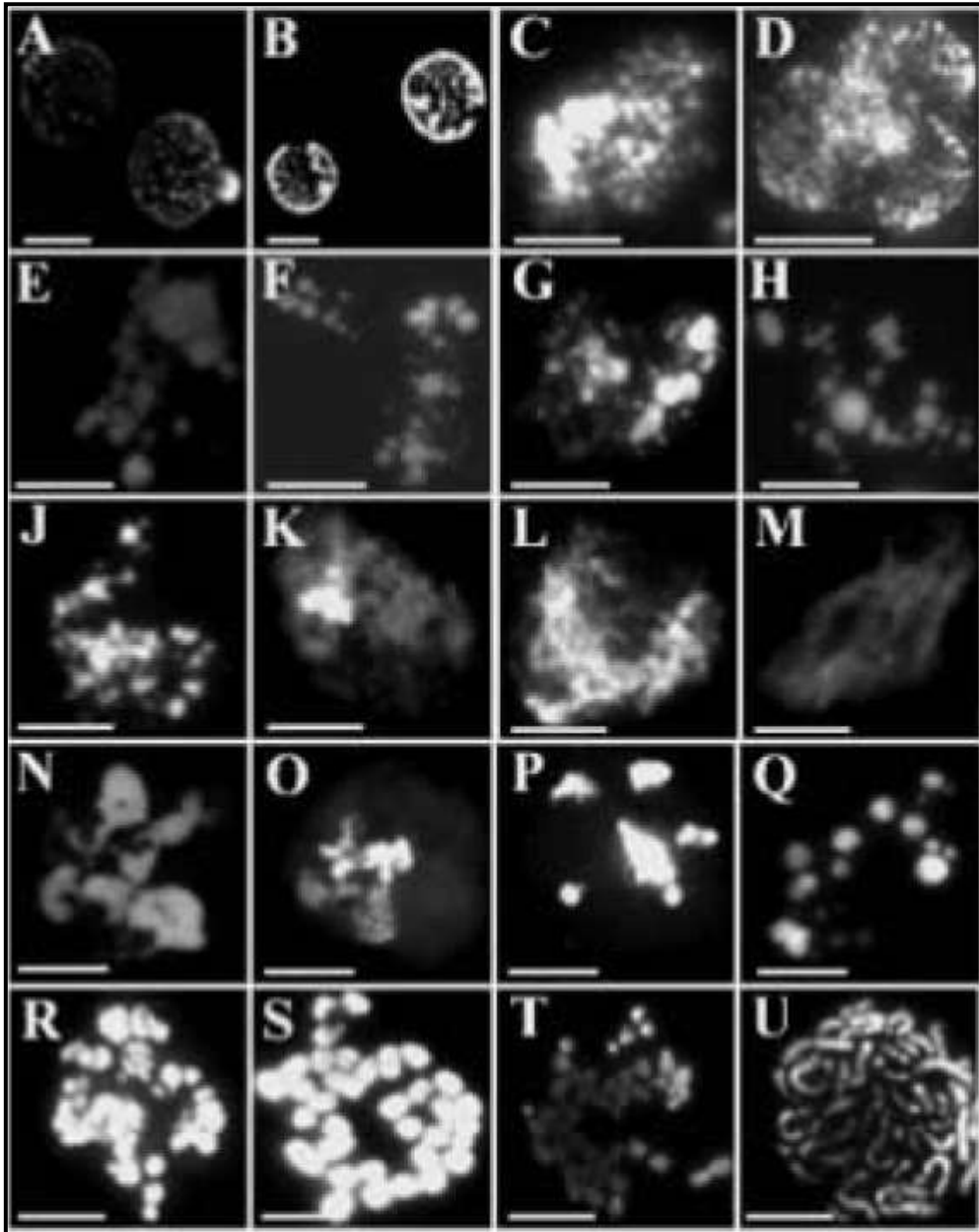
A fluoreszcens felvételek szerint a gamma-besugárzás hatására a kromatin kondenzálás az S fázisban zavart szenved. Sejtciklusfüggő számban jelennek meg apoptotikus testek (26. ábra), melyek a korai S-fázisban számos apró kromatinrögként láthatóak a sejtmagban (26. ábra A, B, C.). A kromatin kondenzálás retardációja mellett, a DNS tartalom növekedésének lassulása is megfigyelhető a 4.-7. frakciókban. Kisebb károsodás figyelhető meg a 8.-11. frakciókban. A középső S-fázis sejteiben megfigyelhető az eltérő stádiumokat jellemző intermedierek együttes megjelenése (27. ábra). A sejtmagállomány polarizáltságának fennmaradása mellett fibrózus struktúrák előfordulása gyakori (27. ábra A-C). Prekondenzált kromoszómák korai fibrózus szerkezetek mellett figyelhetők meg (27. ábra D-F). A kolhicinnel (Colcemid) történő metafázisos blokk elhagyásával végzett vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a sejtciklus előrehaladtával a besugárzás hatására képződött apoptotikus testek száma csökkent, ugyanakkor méretük nőtt (28. ábra). Ez arra enged következtetni, hogy a besugárzás genotoxikus hatásában fontos szerepe van a kromatinállomány kompaktságának és a torziós energiájából fakadó szerkezeti változásoknak.



26. ábra. 400 rad gamma-besugárzás hatása a kondenzálás intermedierjeinek morfológiájára.(A – C) Apoptotikus testek a 4.,5.,6. frakcióból.(D) Fibrózus kromatinhálózat a 7. frakcióból.(E – F) Inkomplett átmeneti formák a fibrózus kromatin és a prekondenzált kromoszómák között a 8. – 9. frakcióból. Vonal= 5µm



27. ábra. Fibrózus kromatinszerkezetek akkumulációja gamma-besugárzott sejtekben a középső S-fázisban. (8. frakció)
 (A - C) Fibrózus struktúrák polarizált kondenzációs régiókkal.
 (D, E) Fibrózus szerkezetek, U-alakú prekondenzált kromoszómákkal
 (F) Fibrózus struktúra néhány torz prekondenzált kromoszómával.
 Vonal= 5 μ m



28. ábra. Gamma- besugárzás hatása a kromatin kondenzálásra , a metafázisos blokk elhagyásával. (A – D) 3. fr. – 4. fr., (E – H) 5. fr. – 6. fr., (J, K) 7. fr., (L, M) 8. fr., (N, O) 9. fr., (P, Q) 10. fr., (R, S) 11. fr. Heterogén, inkomplett kondenzációjú kromozómapopuláció (T, U) 12. fr., Vonal= 5 μ m

V. Eredmények 3.

1. A kromatin kondenzálás intermedierjei négy emlősfaj sejttenyészetében

A kromatin kondenzálás intermedierjeinek vizsgálatát elvégeztük négy emlősfaj sejttenyészetében. Az Indian muntjac sejt kultúra, Chinese hamster ovary sejt kultúra, Egér pre-B M8 sejt kultúra, K 562 humán erytroleukémia sejt kultúra, párhuzamosan elutriált frakcióit hasonlítottuk össze. (Az első frakció a tenyésztőfolyadékból származó szennyeződések és sejt töredékek miatt nem került értékelésre.)

A G1/G0 fázisban levő sejtek kromatin állománya még nagyrészt dekondezálta, mikroszkóposan felhő-, vagy fátyolszerű képet ad.

A korai S-fázis sejtjeiben a kromatin szerkezet kondenzáltsága heterogén, még azonos sejt magon belül is, mert a replikációban éppen résztvevő állomány fellazult.

Korai és középső S-fázisban levő sejtek magjában összecsavart, szalagszerű kromatin fonalak figyelhetők meg, melyek mikroszkóppal élesen ábrázolódó struktúrák, ezen sejt magok némelyikében kromoszóma kezdemények már kivehetőek.

A középső, illetve késői S-fázisban lévő sejt magokban a kondenzálódás előrehaladott állapotban van, a sejt mag szinte teljes egészére kiterjedt.

A késői S-fázis sejtjeinek magjában jellemzőek az önálló, gyűrűs, kondenzálódó kromatin struktúrák, mint a később kialakuló kromoszómák előhírnökei.

Késői S-fázisú és G-fázisú sejtek alkotják a legheterogénebb frakciót, melyben különböző kondenzáltságú, de már elkülönülő kromoszómák figyelhetők meg.

Az M és a késői S-fázisú sejtekben félkörív mentén rendeződött kromoszómafonalak, illetve azokban a sejtekben, melyek elérik a metafázist, teljesen kondenzált kromoszómák is megfigyelhetők.

VI. Anyagok és módszerek

Reagensek, pufferek, tápoldatok:

A 2,6-diamino-2-phenylindol (DAPI) a Braunschweig Chemie terméke. A dextran T-150 a Pharmacia, a colcemid a Boehringer, a biotin-11-dUTP és a többi nukleotid illetve a 1,4-diazobiciklo-(2,2,2)-oktán Sigma gyártmány. Az izotóniás puffer 140mM szacharóz, 60mM KCl, 10mM Hepes, pH 7.4, 5 mM KPO₄, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, összetételű volt.

Az 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.

A permeabilizáláshoz használt hipotóniás puffer összetevői: 9 mM Hepes, pH 7.8, 5.8 mM ditiotritol, 4.5 % dextran T-150, 1 mM EGTA és 4.5 mM MgCl₂.

Az F-12 tápoldat és a borjúsavó GIBCO termékek.

Módszerek:

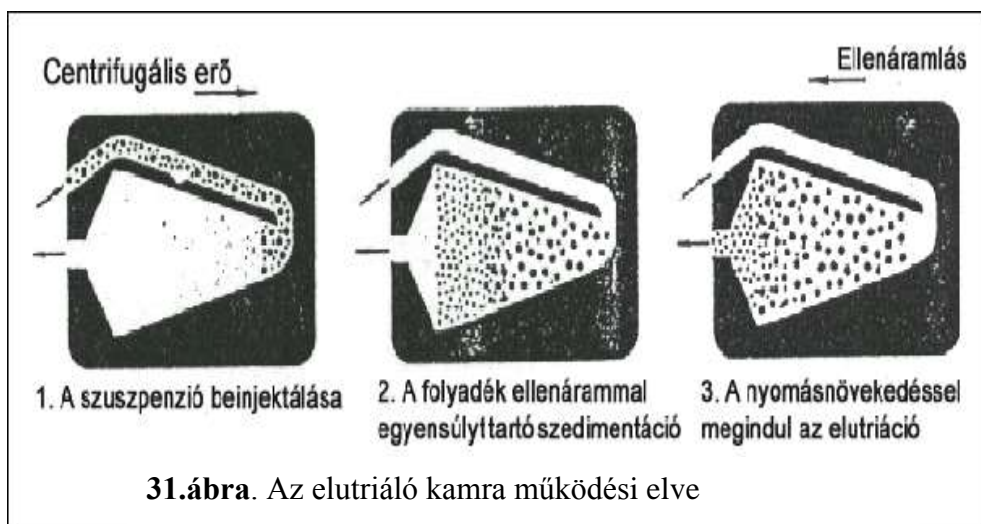
Sejtvonalak, sejtenyésztés

- A kínai hörcsög ovárium sejteket (CHO-K1, ATCC#CCL61) F-12 médiumban tenyésztettük letapadó kultúra formájában.
- A sejteket 10%-os hőkezelt foetalis borjúsavóval (FBS) dúsított 20ml F-12 Ham médiumban készítettük elő a szinkronizáláshoz.

- A sejteket 24 órával a szinkronizáció előtt passzáltuk.
- Szinkronizáció előtt a sejteket kétszer reszuszpendáltuk (1% FBS-t tartalmazó F-12-es médiumban)

Sejtfractionálás elutriáló rotorral

Az elutriálás olyan centrifuga rotorral történik, melyben a sejtek egy a centrifugális erővel ellentétes irányú folyadékáramlás hatására méret szerint szeparálódnak, majd az elfolyó ágon méret szerint frakcionálva gyűjthetők össze. (11. ábra)



2,0 -2,5x 10⁸ sejtet töltöttünk 10 ml/perces pumpasebességgel elutriáló rotorral ellátott J2-21 centrifugába (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA), mely JE-5,0 típusú szeparáló kamrával (Beckman Instruments) volt felszerelve. A rendszer Sanderson elutriáló kamrával (Beckman Instruments, Inc.) és egy MasterFlex (Cole-Palmer Instruments) perisztaltikus pumpával volt ellátva. A perisztaltikus pumpát 70%-os

etanollal sterilizáltuk. Az elutriálás 20°C-on 1%-os FBS-t tartalmazó F-12 médiummal történt. Az elutriálással 8 sejtfrakciót nyertünk, melyeket egyenként rutinszerűen flow-cytométerrel ellenőriztünk. A szétválasztást követően a sejteket PBS-ben átmostuk, Coulter multisizerrel számoltuk és 10%-os FCS-t tartalmazó F-12-ben szuszpendáltuk, majd 37 °C-on 2-4 órán át inkubáltuk. A sejtek nagyságát Coulter Channelizer-rel ellenőriztük, életképességüket Bürker-kamrában tripánkék festéssel vizsgáltuk.

A szinkronizálás flow-citometriás ellenőrzése

A sejteket megfestettük 0,1 M ammonium-citrát és 50 µg/ml propidium-jodid (Sigma) oldatával 15 percig 0°C-on, majd egyenlő térfogatú 70%-os metanol hozzáadásával fixáltuk. A megfestett sejteket FACS scan flow cytométerrel (Beckton Dickinson) vizsgáltuk. A mérésekhez a CellQuest szoftvert (Beckton Dickinson) használtuk.

Permeabilizálás

Szinkronizálás után a sejteket centrifugálással üleptettük. A sejteket (2×10^6) kíméletes rázatással reszuszpendáltuk 200 µl permeabilizáló pufferben 0 °C-on 15 percig. A permeabilizálás során a sejteket a pufferhez adott 4.5 % (w/w) dextran T-150 védte meg a dezintegrációtól. A sejtek 95%-a 15 percen belül felvette a tripánkéket.

Sejtek regenerálása

Permeabilizálás után *in vitro* DNS szintézist hajtottunk végre a sejtekben a 4 nukleozid trifoszfát jelenlétében. A TTP-t biotin-11-dUTP-vel helyettesítettük az inkubáló pufferben. A permeábilis sejteket 200µl permeabilizáló pufferben tartalmazó csöveket folyamatos rázatás mellett fokozatosan 10 ml-re egészítettük ki 10 % FBS-t tartalmazó F-12 médiummal. A sejteket ezután 37 °C-on 5% széndioxid és 95% relatív nedvesség tartalmú Assab T-304 inkubátorban tartottuk. A sejt regenerálódást bizonyította, hogy a sejtek 3 órán belül képesek voltak a tripánkéket kizárni. A permeabilizálatlan kontroll sejtek 5 %-a pusztult el a procedúra során.

Sejtmagok preparálása

2 x 10⁶ darab sejtet 37 °C –on 3 órán át inkubáltunk tápfolyadékban a permeabilizálás után magas (10%) foetalis borjú szérum koncentráció mellett, regenerálás céljából, majd metafázisos blokkot alkalmaztunk 0,1 ng/ml Colcemid-el történő kezeléssel. További két óra 37 °C-os inkubáció és tripszines kezelés után a sejteket PBS-el mostuk. Ezután 37 °C-on 10 percig 10 ml duzzasztó pufferrel (50 mM KCl, 10 mM MgSO₄ , 3 mM ditiotreitól és 5 mM NaPO₄, pH 8.0) kezeltük őket. A duzzasztó puffert centrifugálással (500g, 8 perc) távolítottuk el. A magizolálás 20x térfogatú jégcet: metanol (1:3) elegy lassú hozzáadásával

történt. A sejtmagokat ezzel a fixálószerrel mostuk kétszer, majd 2 ml fixáló elegyben vettük fel.

A sejtmag preparátum tárgylemezre való felvitele körülbelül 30 cm magasról való lecseppentéssel történt. A lemezeket levegőn szárítottuk, majd szobahőmérsékleten éjjel állni hagytuk. PBS-sel történő lemosást követően 70%-tól 100%-ig felszálló alkoholsorban dehidratáltuk a lemezeket.

Kromatin struktúrák fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata

A dehidratált, majd levegőn szárított tárgylemezeket 35 µl antifade médium felvitele után 24 x 50 mm-es fedőlemezekkel takartuk le. A DAPI-val ilyen módon festett lemezeket ezután Dialux 20 (Leitz) fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

Kromatinszerkezet háromdimenziós megjelenítése

A kromatin kondenzálás intermedierjeinek fluoreszcens mikroszkóppal történő vizsgálata nagy mennyiségű felvétel gyors morfológiai elemzését teszi szükségessé, ezért a folyamatot célszerű bizonyos szinten automatizálni.

A számítástechnika fejlődésével mind több laboratóriumban számítógéphez kapcsolt mikroszkópkamerák váltják föl a fotóapparátust. A nagyfelbontású CCD egységek elterjedésével egyre jobb minőségű felvételek készíthetők rövid idő alatt. A jelenlegi képfeldolgozó módszerekkel nehezen kezelhető felvételek elemzésében az ember kulcsszerepet játszik. A számítógépek szempontjából adathalmazként megjelenő felvételek azonban tartalmaznak a kutató számára nehezen elkülöníthető részleteket, melyeket célszerű szemléletessé tenni.

Szoftverünket a kromoszóma kondenzálódás intermediereit ábrázoló felvételeken fejlesztettük ki. A digitális elemzés ilyen esetben nehéz, mert ritkák a tipizálható, betanítható formák. A nehezen standardizálható képtartalom miatt adott felvételhez dinamikusan illeszthető, ugyanakkor könnyen kezelhető humán interfész kialakítását láttuk célszerűnek.

A CCD kamerával digitalizált mikroszkópos képet a számítógép vörös, zöld és kék színek árnyalataiként tárolja. A médium által kibocsátott fény karakterisztikájának megfelelő vörös, zöld és kék beállításokkal előállítjuk a fényintenzitás monokróm mintázatát. Az így nyert adathalmaz három, számunkra fontos paramétert tartalmaz. Az első kettő a képpont x és y koordinátái, a harmadik pedig a képponthez tartozó 0 és 256 közötti fényintenzitási érték. A feldolgozás első lépésében a program elkülöníti a felvétel információt hordozó területeit. A további műveletek már ezen az optimalizált adatbázison történnek. Az eltérő intenzitású képpontokhoz

egyéni vagy beépített színskálákat rendelhetünk. Az így nyert kép alkalmas kvalitatív és kvantitatív értékelésre egyaránt. Az intenzitási adatokat megfeleltetjük egy virtuális tér z koordinátáinak is, létrehozva egy háromdimenziós modellt. Az objektum ezután már tetszőleges nézetből vizsgálható, megvilágítható, részletei kiemelhetőek. A monokróm modellre ráfeszíthetjük a kiválasztott színskálát (32. ábra). A folyamat a mikroszkópos munkával párhuzamosan, valós időben is futtatható. Az elmentett háromdimenziós objektumok tartalmazzák saját megjelenítő algoritmusukat, így a programtól függetlenül is felhasználhatók. A program illeszthető hangfelismerő alkalmazásokhoz, ezáltal szóban is vezérelhető.

A szoftver fejlesztői környezete PC-s platformon Borland Delphi® programnyelv, illetve DirectX® 8a utasításkészlet. A szoftver Microsoft® Windows® 9x és NT alatt fut DirectX8a mellett.

Minimális rendszerkövetelmények:

CPU: AMD® Duron® 750MHz (900MHz ajánlott)

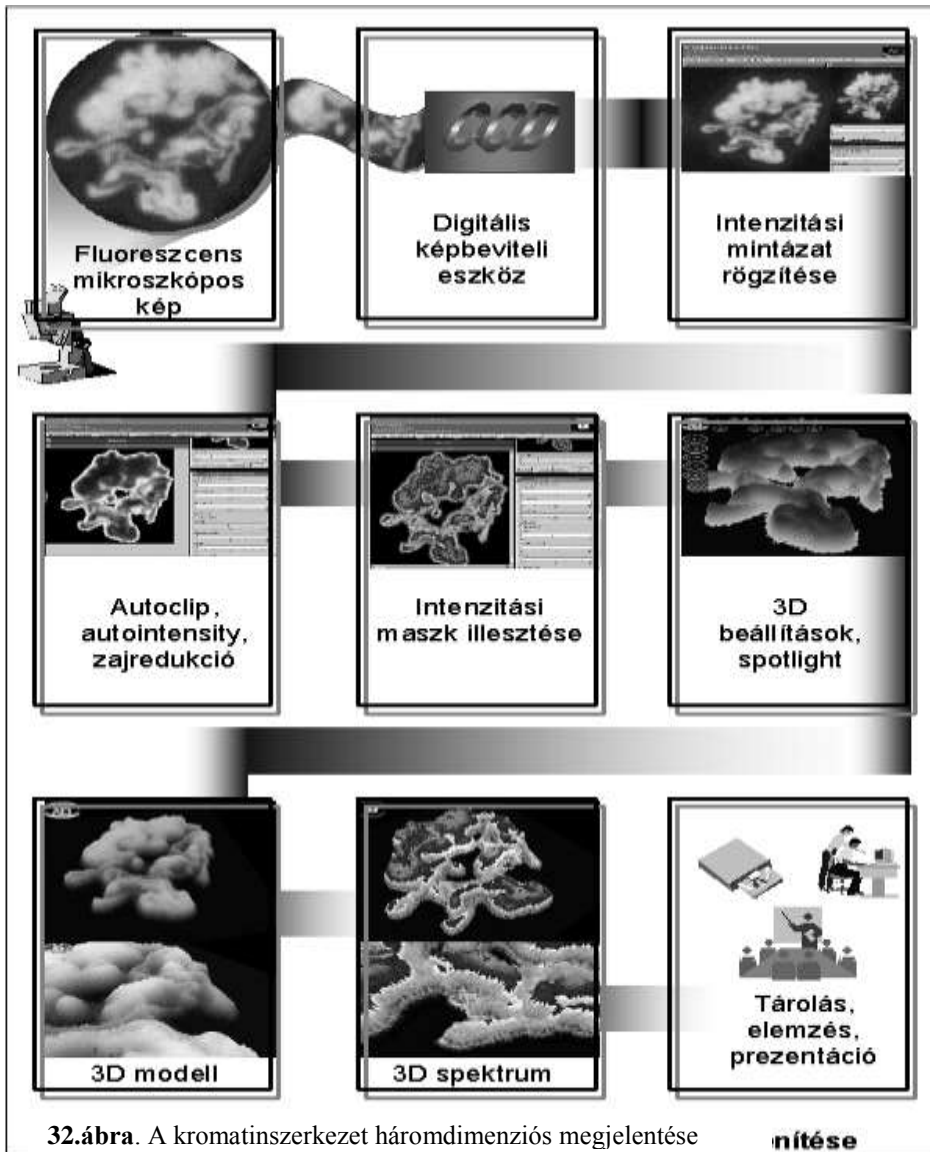
Memória: 256Mb

Videókártya: 1024 x 768 16Mb Direct3D támogatással (32Mb ajánlott)

Merevlemez: 200Mb

Hangkártya: SB 16 kompatibilis (opcionális)

Dinamikus- vagy kondenzátormikrofon (opcionális)



A mikroszkópkamerák felbontásának javulásával a nagyfelbontású képek valós idejű feldolgozása nehézkessé vált. Gyakran egyetlen számítógép kapacitása nem elegendő arra, hogy a kutatónak valós idejű információt szolgáltatson a vizsgált objektumról. Ezért fejlesztjük a több számítógép szabad kapacitását hálózaton keresztül kihasználó

VII. Összegzés

Korábbi megfigyelések alapján (Banfalvi és mtsai.1989, Banfalvi, 1993), a biotin-nukleotid beépülés a DNS-be akadályozza a kromatin kondenzációt. Mivel metafázisos kromoszómákban nem sikerült biotin jelölést megfigyelni, feltételezhető volt, hogy a biotinálás a korai kondenzációs termékek stádiumában állítja meg a folyamatot. Vizsgálatainkat ezért a permeabilizálás által biztosított lehetőségekre alapozva, a biotinált nukleotidok replikáció alatt való sejtbejuttatásával végeztük. Exponenciálisan növekvő sejtenyészetek használatával biztosítottuk, hogy a sejtek többsége S – fázisban legyen a kezelés során. Ezáltal a dekondezálalt DNS-állományba tudtuk a biotin-nukleotidot inkorporálni. A membránintegritás helyreállításával a köztitermékek vizsgálhatóvá váltak.

Eredményeink megerősítették, miszerint a biotin-11-dUTP DNS-láncba való beépülése a kondenzációs köztitermékek feldúsulását okozza. A sejtmagok fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata során számos átmeneti formával jellemezhető hajtogatódási dinamikát figyeltünk meg: a dekondezálalt fátyolszerű szerkezetek a kondenzálás előrehaladtával szalagszerkezetet vettek fel, majd globuláris és fibrózus struktúrák alakultak ki. A globuláris és fibrózus szerkezetek jelenlétét nagyfelbontású scanning elektronmikroszkópos vizsgálatok is megerősítették (Iwano és mtsai. 1997).

Mivel a biotinálás megakasztja a kondenzálást a fibrózus stádiumban, nagyfelbontású centrifugális elutriációval, biotinbeépítés

nélkül vizsgáltuk a köztiformákat további munkánk során. Kísérleteink megerősítették a biotinnal végzett vizsgálataink eredményét, és további intermedierek vizsgálatát is lehetővé tették. Az így felfedezett átmeneti formák vizsgálata során felvetődött, hogy a megfigyelt globuláris szerkezetek a metafázisos kromoszómák interfázisos megfelelői lehetnek. A globuláris szerkezetek fokozatosan kromatinhurkokká kondenzálódnak, majd a folyamat előrehaladtával körkörös elhelyezkedő patkó alakú struktúrákon át lineáris elrendeződésű elongált prekromoszómákat alkotnak. Az elongált kromoszómák a rövidebb metafázisos kromoszómák dekondezáltabb formái.

A kromatin kondenzálódása egér pre-B sejtekben a CHO sejteknél is megfigyelhető tranzíciós formákon keresztül megy végbe.

Gamma- besugárzás hatására a pre-B sejtek kromatin kondenzálódása korai S fázisban retardálódott, a sejtmagok jelentős megduzzadása 2.4 C –értéknél érte el maximumát. A korai S –fázis dekondezált állapotában apróbb, majd a későbbi stádiumokban nagyobb apoptotikus testek képződtek. Gamma besugárzás hatására a kondenzálás blokkolódott a fibrilláris és a szupertekercselt szalag formák közötti átmenet stádiumában. A megfigyelt elváltozások egyik lehetséges magyarázata a kromatin szupertekercseléséből származó torziós energia felszabadulása 2.4 C értéknél a gamma sugárzás következtében fellépő többszörös száltörések miatt.

Négy emlősfaj sejtjeinek tenyésztésében megvizsgáltuk a kromatin kondenzálás intermediereit. Eredményeink azt mutatják, hogy a kondenzálás mind a négy vizsgált faj esetében hasonló köztitermékek keletkezése mellett megy végbe. Methodikánk lehetővé

tette, hogy fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáljuk a sejtmagban zajló kromatin kondenzálódási folyamatot. Az általunk kifejlesztett számítógépes szoftver segítségével morfológiai elemzést végeztünk a fluoreszcens mikroszkópos felvételeken. Vizsgálataink arra engednek következtetni, hogy a kromatin kondenzálódás a várakozásoknak megfelelően, egy dinamikus folyamat, mely több morfológiailag elkülöníthető intermedier struktúrán át zajlik le. A kondenzálódás folyamata jellemezhető a sejt nagyságával és DNS tartalmával, de az intermedierek egy sejtmagon belül is heterogenitást mutathatnak. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a DNS kondenzálás nem azonos fázisban megy végbe az egész genomon. A kromoszómák kialakulásának sorrendiségét a későbbiekben FISH - technikával kívánjuk vizsgálni.

VIII. DVD-ROM MELLÉKLET

Az adathordozó az objektumok elkészítéséhez használt programot nem tartalmazza!

A csatolt DVD-ROM lemezen található állományok:

Fájlok

Help.txt:

Rövid szöveges dokumentum a program telepítéséről és kezeléséről. Bármilyen szövegszerkesztő alkalmazással megnyitható.

License.txt:

A programmal kapcsolatos szerzői jogi információk. Bármilyen szövegszerkesztő alkalmazással megnyitható

Demo.avi:

Rövid demonstrációs videoklipp. Videolejátszó alkalmazással tekinthető meg.

DX80eng.exe:

A DX80eng.exe fájl a grafikus alkalmazások futtatásához szükséges. Úgy lehet meggyőződni arról, hogy az a számítógépen már installálva van-e ez a program, hogy a Start menü / Futtatás (Run)–ra kattintva a következő parancsot írjuk be: dxdiag [ENTER]. Ha megjelenik egy panel, akkor a Rendszer fülre kattintva alulról a második sorban nézhető meg a gépen jelenleg telepített DirectX verziószáma. Amennyiben nem jelenik meg a panel, úgy a gépen nincs DirectX, így telepíteni szükséges a CD-ROM-on található DX80eng.exe fájlra való dupla kattintással. A telepítés automatikus, a végén a számítógép újraindul. Akkor is ajánlatos feltelepíteni a DirectX-et ha a gépen lévő verzió száma 7.0-nál alacsonyabb. Ez esetben az előzőekben leírtak szerint kell eljárni.

Könyvtárak:

Monokrom:

Monokromatikus intenzitási maszk nélküli 3D objektumok.

Mixed spectrum:

Semi-monokromatizált 3D objektumok a kiemelt részeken intenzitási maszkkal.

Spectrum:

Intenzitási maszkkal ellátott 3D objektumok.

Mindhárom típusú objektum esetén a vertikális kiterjedés arányos a fluoreszcens jel intenzitásával, az Y-scale beállítás szerint.

A könyvtárakban található fájlokra duplán kattintva indíthatja el a 3D megjelenítést. Mivel az objektumok saját megjelenítőjüket tartalmazzák, nem szükséges egyéb szoftver a megtekintésükhöz, ha a DirectX installálva van a számítógépen.

A fájlnevek tartalmazzák az objektumokra vonatkozó információkat.

Kezelőszervek:

3D setup:

Ez a beállítópanel teszi lehetővé, hogy kisebb teljesítményű gépen is futtatható legyen a program. A Mesh quality alapbeállítás (High). Nagyobb objektumok megtekintéséhez legalább 1 GHz-es processzort és legalább 16 MB-os videokártyát igényel. Ha számítógép nem rendelkezik ilyen teljesítménnyel, akkor kisebb Mesh minőséggel érdemes próbálkozni. A program automatikusan figyelmeztet, ha egy művelet 20 másodpercnél tovább fog tartani. Ha a számítógép videokártyája támogatja a hardveres 3D gyorsítást, akkor hagyjuk a beállítást „enabled” állásban. Ha nem rendelkezik hardveres gyorsítással, akkor állítsuk „disabled”-re. Az Y-scale funkcióval a vertikális nagyítást állíthatjuk be.

gombok	
2D like	felülnézeti kép
Camera 1-5	előre beállított kameraállások
Camera 6-12	szabadon definiálható kameraállások
Free move	belépés a 3D térbe, szabad mozgás
<i>Kezelőgombok a 3D térben</i>	
<i>Előre</i>	előre nyíl
<i>Hátra</i>	hátra nyíl
<i>Oldalazás balra</i>	balra nyíl
<i>Oldalazás jobbra</i>	jobbra nyíl
<i>Fel</i>	Home
<i>Le</i>	End
<i>Forgás</i>	Egér
<i>Közelít</i>	Egér bal gomb
<i>Távolít</i>	Egér jobb gomb
F1 – F12	Kameraállás betöltése
Ctrl + F1 – F12	Kameraállás mentése
Exit	Kilépés

Animáció:

A gombra kattintva megjelenik egy panel, melyen a felhasználó által meghatározott helyre lementhetjük a demonstrációs videót. Itt tudjuk beállítani a video felbontását, a kezdő- és a befejező kameraállást, illetve a két kamerapozíció között felvett képkockák számát. Filmet úgy készíthetünk, hogy free move módban lementjük (Ctrl + F1 – F12) a megtekintendő kameraállásokat (max.12).

X. Hivatkozások:

1. Anjanabha Saha, Jacqueline Wittmeyer, and Bradley R. Cairns, (2002) Chromatin remodeling by RSC involves ATP-dependent DNA translocation. *Genes and Development* Vol. 16, No. 16, pp. 2120-2134,
2. Banfalvi, G., Sooki-Toth, A., Sarkar, N., Csuzi, S., and Antoni, F. (1984) Nascent DNA chains synthesized in reversibly permeable cells of mouse thymocytes. *Eur. J. Biochem.* 139: 553-559
3. Banfalvi, G. (1986) Structural Organization of DNA *Biochemical Education* 14(2) 50-59
4. Banfalvi, G., Wiegant, J., Sarkar, N., and van Duijn, P. (1989) Immunofluorescent visualization of DNA replication sites within nuclei of CHO cells. *Histochemistry* 93: 81-86
5. Banfalvi, G., Tanke, H., Raap, A.K., Slats, J., and van der Ploegh, M. (1990) Early replication signals in nuclei of Chinese hamster ovary cells. *Histochemistry* 94: 435-440
6. Banfalvi, G. (1993). Fluorescent analysis of replication and intermediates of chromatin folding in nuclei of mammalian cells. In *Biotechnology applications of microinjection, microscopic imaging, and fluorescence*. P. Bach, C.H. Reynolds, J.M. Clark, J. Mottley, P.L. Poole (eds). Plenum Press/New York, London. pp. 111-119.
7. Basnakian A, Banfalvi, G., Sarkar, N. (1989). Contribution of DNA polymerase δ to DNA replication in permeable CHO cells synchronized in S phase. *Nucleic Acids Res.* 17, 4757-4767.
8. Belmont, A.S. (2002). Mitotic chromosome scaffold structure: new approaches to an old controversy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 15855-15857.

9. Blow, J.J., and Watson, J.V. (1987) Nuclei act as independent units of replication in *Xenopus* cell-free DNA replication system. *EMBO J.* 6: 1997-2002
10. Brehm A, Tufteland KR, Aasland R, Becker PB (2004) The many colours of chromodomains. *Bioessays*,2004 Feb;26(2):133-40.
11. Comings, D.E. (1968) The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus. *Am. J. Hum. Genet.* 20: 440-460
12. Comings, D.E. (1980) Arrangement of chromatin in the nucleus. *Hum. Genet.* 53: 131-143
13. Cook, P.R., Brazell, I.A. (1980). Mapping sequences in loops of nuclear DNA by their progressive detachment from the nuclear cage. *Nucleic Acids Res.* 8, 2895-2907.
14. Cremer, C., Cremer, T., Zorn, C., and Cioreanu, V. (1979) Partial irradiation of Chinese hamster cell nuclei and detection of unscheduled DNA synthesis in interphase and metaphase. A tool to investigate the arrangement of interphase chromosomes in mammalian cells. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360: 244-245
15. Dale R.M.K., Livingston, D.C., Ward, D.C. (1973). The synthesis and enzymatic polymerization of nucleotides containing mercury: potential tools for nucleic acid sequencing and structure analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2238-2242.
16. deCampos-Vidal, B., Russo, J., Mello, M.L. (1998). DNA content and chromatin texture of benzo[\square]pyrene-transformed human breast epithelial cells as assessed by image analysis. *Exp. Cell Res.* 244, 77-82.
17. Earnshaw, W.C., Laemmli, U.K. (1983). Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds. *J. Cell Biol.* 96, 84-93.
18. Earnshaw, W.C. (1988). Mitotic chromosome structure. *BioEssays* 9, 147-150.

19. Heslop-Harrison, J.S., M.Huelskamp, Wendroth, M., Atkinson, M.D., Leicht, A.R., Benett, M.D. (1988). Chromatin and centromeric structures in interphase nuclei. In *New chromosome conference III*. P.E. Brandham, editor. Allan & Unwin/London. pp. 209-217.
20. Hiriyanna, K.T., Varkey, J., Beer, M., and Benbow, M. (1988) Electron microscopic visualization of sites of nascent DNA synthesis by streptavidin-gold binding to biotinylated nucleotides incorporated in vivo. *J. Cell Biol.* 107: 33-44
21. Hunting, D.J., Dresler, S.L., and Murcia, G. (1985). Incorporation of biotin-labelled deoxyuridine triphosphate into DNA during excision repair and electron microscopic visualization of repair patches. *Biochemistry* 24: 5729-5734
22. Iwano, M., Fukui, K., Tkaichi, S., Isogai, A. (1997). Globular and fibrous structure in barley chromosomes revealed by high-resolution scanning electron microscopy. *Chromosome Res.* 5, 341-349.
23. Juan, G., Traganos, F., James, W.M., Ray, J.M., Roberge, M., Sauve, D.M., Anderson, H., Darzynkiewicz, Z. (1998). Histone H3 phosphorylation and expression of cyclins A and B1 measured in individual cells during their progression through G2 and mitosis. *Cytometry.* 32, 71-77.
24. Kirsch-Volders, M., Hens, L., and Susanne, C. (1980) Telomere and centromere association tendencies in the human male metaphase complement. *Hum. Genet.* 54: 69-77
25. Langer, P.R., Waldrop, A.A., and Ward, D.C. (1981) Enzymatic synthesis of biotin-labelled polynucleotides : novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 78: 6633-6637
26. Nakayasu, H., and Berezney, R. (1989) Mapping replicational sites in the eukaryotic cell nucleus. *J. Cell Biol.* 108: 1-11
27. Paulson, J.R., and U.K. Laemmli. (1977) The structure of histone depleted chromosomes. *Cell.* 12:817-828

28. Offer H, Zurer I, Banfalvi G, Reha'k M, Falcovitz A, Milyavsky M, Goldfinger N, Rotter V. (2001) p53 modulates base excision repair activity in a cell cycle-specific manner after genotoxic stress. *Cancer Res.* 2001 Jan 1;61(1):88-96.
29. Rattner, J.B., Linn, C.C. (1985). Radial loops and helical coils coexist in metaphase chromosomes. *Cell* 41, 291-296.
30. Rein Aasland, Toby J. Gibson and A. Francis Stewart (1995) The PHD-finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* 20(2) 56-59
31. Sperling, K., and Luedtke, E-K. (1981) Arrangement of prematurely condensed chromosomes in cultured cells and lymphocytes of the Indian muntjac. *Chromosoma* 83: 541-553
32. Vogel, F., and Schroeder, T.M. (1974) The internal order of the interphase nucleus. *Hum. Genet.* 25: 265-297
33. Wan, K.M., Nickerson, J.A., Krockmalnik, G., Penman, S. (1999). The nuclear matrix prepared by amine modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 933-938.
34. Xue, Y., Wong, J., Moreno, G.T., Young, M.K., Cote, J., Wang, W. (1998). NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol. Cell.* 2, 851-861.
35. Zang, K.D., and Back, E. (1968) Quantitative studies of the arrangement of human chromosomes. I. Individual features in the association pattern of acricentric chromosomes of normal males and females. *Cytogenetics* 7: 455-470
36. Zankl, H., and Zang, K.D. (1974) Quantitative studies on the arrangement of human metaphase chromosomes. IV. The association frequency of human acrocentric marker chromosomes. *Hum. Genet.* 23: 259-265