

Humán metafázisos kromoszómák nanomechanikai vizsgálata

készítette: **MOLNÁR ZSANETT**

ELTE-TTK

fizika BSc III.

témavezető: Dr. Kellermayer Miklós

egyetemi tanár

Semmelweis Egyetem

Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet



ELTE, 2012

Absztrakt

Humán metafázisos kromoszómák nanomechanikai vizsgálata

Készítette: Molnár Zsanett, Fizika BSc, III. évf.

Témavezető: Dr. Kellermayer Miklós

Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

A kromoszómák DNS, hiszton és non-hiszton fehérjék speciális komplexumai, melyek a sejtosztódás során biztosítják az átörökítő anyag megfelelő szegregációját. Szerkezetük és a kialakulásukhoz vezető kondenzációs folyamat molekuláris mechanizmusai nem pontosan ismertek. Kísérleteink célja a humán metafázisos kromoszómák szerkezetének és szerkezeti dinamikájának pontosabb megismerése speciális molekuláris mechanikai módszerekkel. Kromoszómákat perifériás vérlimfocitákból izoláltunk. A sejtosztódást kolhicinnel állítottuk meg metafázisban, a sejteket hipotóniás oldattal tártuk fel, majd a kromoszómákat metanol-ecetsavas kezeléssel tisztítottuk, fixáltuk. A nanomechanikai méréseket atomerőmikroszkóppal végeztük. Sikerrel vizualizáltunk, manipuláltunk egyedi humán metafázisos kromoszómákat. A kromatida karok hossz tengelye mentén periodikusan ismétlődő barázdáltság volt megfigyelhető, mely periodicitásnak a mértéke analízisünk alapján 400-600 nm között váltakozott. Nanomechanikai manipulálás során viszkoelasztikus struktúrákat húztunk ki a kromoszómák felületéből. A maximális megnyúlás típusosan több száz nanométer volt. A kihúzott struktúrákat sikerrel azonosítottuk. A felvett erőspektrumokban repetitív fűrészfogak jelentek meg, amelyek a kromatinszálat rögzítő kölcsönhatások felszakadásával, illetve a kromatinban mechanikai erő hatására fellépő szerkezeti változásokkal kapcsolatosak.

TARTALOMJEGYZÉK

1. Irodalmi bevezetés	4
1.1 Bevezetés	4
1.2 Sejtciklus	5
1.3 Sejtmag	6
1.4 Kromoszóma morfológia	7
1.4.1 Általános szerkezet	7
1.4.2 A kromatin	9
1.4.3 Hiszton fehérjék	12
1.5 Atomerőmikroszkóp (AFM)	13
2. Célkitűzések	15
3. Anyag és módszer	16
3.1 Kromoszóma preparálás perifériás vérből	16
3.2 Az atomerőmikroszkóp mérési eljárásai	17
4. Eredmények és megvitatásuk	21
4.1 Topográfiai szerkezet analízise	23
4.2 Nanomechanikai tulajdonságok vizsgálata	25
4.3 Erőmérések analízise	27
5. Összefoglalás	30
6. Irodalmi hivatkozások	31

1. Irodalmi bevezetés

1.1 Bevezetés

A kromoszóma a görög *chroma*=színes és *soma*=test szavakból tevődik össze. A kromoszómákat először Karl Wilhelm von Nageli figyelte meg 1842-ben, részleteiben pedig 1882-ben vizsgálta meg Walter Flemming. A sejtmag állományát „chromatin”-nak keresztelte el, emellett pedig pontosan leírta a testi sejtek osztódását, amelynek a „mitosis” nevet adta. Nevéhez fűződik az első kromoszómaszám meghatározása és a kromoszómák hosszanti szétválásának pontos leírása.

Waldeyer fedezte fel a kromoszómák legfontosabb szerkezeti elemét, a centromert. Emlősök sejthibridjein végzett vizsgálatok eredményei alapján annyi tűnt bizonyosnak, hogy az emlősfajok teljesen eltérő DNS-éből felépülő centromerjei egymás sejtjeiben működőképesek, tehát az eltérő molekuláris felépítés ellenére idegen környezetben is képesek feladatuk ellátására.

1902-ben, az amerikai Walter Stanborough Sutton kísérletei alapján megszületett a „kromoszómaelmélet”, mely kimondja, hogy a normális fejlődéshez teljes kromoszómaállomány szükséges, az egyes kromoszómák eltérő genetikai tartalommal rendelkeznek és az egyes kromoszómapárok tagjai függetlenül, véletlenszerűen jutnak az ivarsejtekbe.[1]

1910-ben Thomas Hunt Morgan bebizonyította, hogy a kromoszómák géneket hordoznak, 1933-ban pedig rájött, hogy a kromoszómák fontos szerepet játszanak az öröklődés folyamatában.[2] Az 1960-as években kezdődött a kromoszómák elektronmikroszkópos szerkezetvizsgálata, ami a hetvenes években biokémiai módszerekkel gazdagodva, a kromoszómaváz („scaffold”) modelljének megszületését eredményezte. Eszerint a kromoszómákon belül egy fehérjékből álló folytonos váz szervezi a DNS-t a kromatidák mentén hatalmas, körkörös hurkokba. A későbbi, részletes vizsgálatok eredményei azonban kérdésessé teszik az ilyen folytonos fehérjeváz létét. Sokkal valószínűbb, hogy a kromoszómák „vázát” fehérje–DNS-részecskék halmaza adja, azaz a kromoszómális DNS bizonyos szakaszai szerkezetépítő

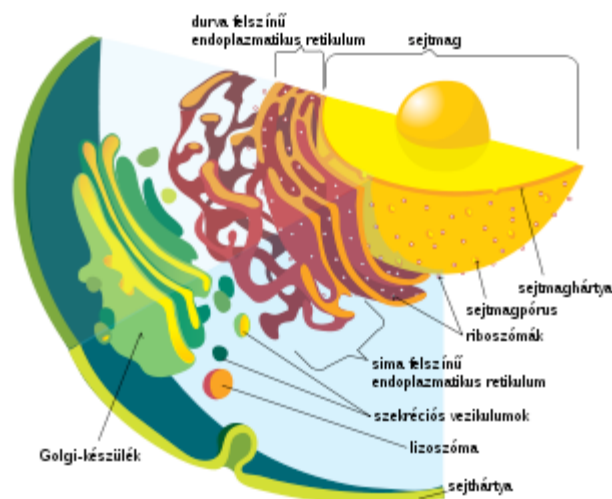
szerepet töltenek be. Ugyanezen vizsgálatok tanúsága szerint a kromoszómák szerkezetileg legellenállóbb szakasza a centromer.

1.2 Sejtciklus

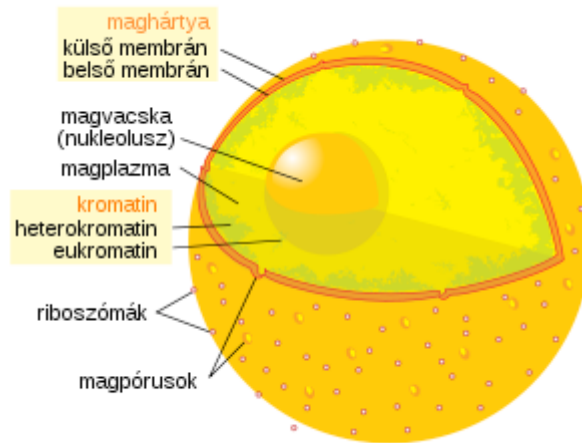
Az osztódóképes eukarióta sejtek élete, a sejtciklus két részre, a nyugalmi szakaszra és az azt követő sejtosztódásra tagolható. A nyugalmi szakasz elején a sejt növekszik, tömege, térfogata gyarapodik, mert benne intenzív anyagcsere-folyamatok zajlanak. Amikor eléri a megfelelő méretet, DNS-állománya megkettőződik. A nyugalmi szakasz végén a sejt felkészül a hamarosan bekövetkező sejtosztódásra. A sejtciklus alatt jellegzetes változások történnek a sejtmag DNS-állományában. A nyugalmi fázisban a magplazma csaknem egynemű, ekkor a kromoszómák, laza kinyúlt állapotban vannak. Bázissorrendjük ebben az állapotban íródhat át RNS-re, vagy szolgálhat mintaként a megkettőződéshez. Ezt a kromoszómaszerkezetet funkciós formának nevezzük. A DNS-állomány megkettőződése után az utódmolekulák kettős hélicei az ún. befűződési pontban együtt maradnak. A funkciós formájú kromoszómák fehérjemolekulák segítségével, illetve strukturális változások következményeként kialakulnak a szállításra alkalmas transzportkromoszómák. Ezek a típusú kromoszómák két, egy-egy kettős hélixből és fehérjékből álló kromatidából épülnek fel, amelyek a befűződési pontban kapcsolódnak egymáshoz. Egy kromoszómán belül a két kromatida DNS-e teljes mértékben azonos bázissorrendű. A sejtciklus nyugalmi szakaszát követően az eukarióta sejtek kétféleképpen osztódhatnak, mitózissal vagy meiózissal. A mitózis számtartó osztódás, ami azt jelenti, hogy a folyamat alatt nem változik a sejtek kromoszómaszáma. A meiózis számfelező osztódás, az osztódás végén kialakult utódsejtek kromoszómaszáma pontosan fele a kiindulási sejtekének.

1.3 Sejtmag

A nukleusz az eukariota sejtekben megtalálható sejtszervecske mely a sejt genetikai anyagának legnagyobb részét tartalmazza (1. ábra). Fő funkciója, hogy irányítsa a citoplazmában zajló kémiai reakciókat. A nukleusz átmérője átlagosan 6 mikrométer, ami a sejttérfogat körülbelül 10%-át teszi ki.[3] Dupla rétegű membrán veszi körül, melynek két rétege egymással helyenként összeér, ezzel pórusokat hozva létre. A pórusokon keresztül zajlik a magi transzport, melynek fontos szerepe van a sejt működésében.[4] A két membrán közötti teret perinukleáris térnek nevezzük, ami a DER terével folytonos. A magmembrán belső oldalán számos filamentum látható, ezek hozzák létre a nukleáris laminát, ami többnyire fehérjékből áll.[5][6] A laminák a citoplazmában szintetizálódnak és csak később szállítódnak a sejtmag belsejébe. A sejtmagban többnyire elszórtan egy vagy néhány nukleolusz található (2. ábra). A nukleolusz erősen festődő sejtalkotó, melynek szerkezete és tömege a sejt életciklusai során változik, osztódáskor eltűnik, anyaga szétoszlik, majd az osztódást követően újraképződik. Egy finoman szálas, egy szemcsés és egy halványan festődő szerkezeti elemeket magába foglaló összetevőkből áll. A nukleoluszt a nukleoplazma veszi körül, mely folyékony, gélszerű állaggal rendelkezik.[7] Anyagai közé soroljuk nukleotid trifoszfátokat, enzimeket, fehérjéket, transzkripció faktorokat.



1. ábra A sejt felépítése



2. ábra A sejtmag felépítése

1.4 Kromoszóma morfológia

1.4.1 Általános szerkezet

A testi sejtek osztódása és az ivarsejtképződés során az örökítőanyagnak hajszálpontosan át kell kerülnie az utódsejtekbe, illetve a sejtmagi DNS-nek olyan szerkezeti rendben kell léteznie, amely lehetővé teszi az örökítőanyag hatékony működését. A kromoszómákban az osztódások során a sejtmag állományából kialakuló, kettős, fonalas szerkezetekben a DNS 10 000-szeresen felcsavarodott állapotban van, amelyet a DNS mennyiségének körülbelül kétszeresét kitevő fehérjék rögzítenek. A két hosszanti fél (kromatida) – DNS-tartalmát tekintve – egymás tökéletes másolata. A testi sejtek osztódásakor a szétvált kromatidák jutnak az utódsejtekbe, biztosítva az örökítőanyag molekuláris pontosságú átadását.

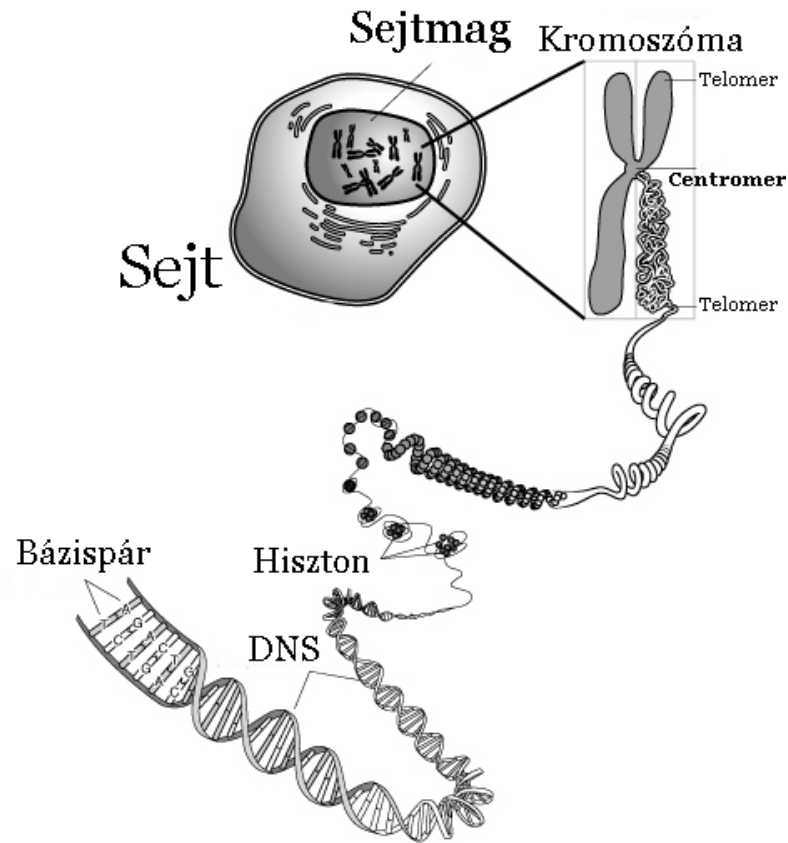
A fajra jellemző kromoszómaszám a sejtosztódás középszakaszában állapítható meg a legkönnyebben. Az ember szöveteit felépítő, úgynevezett testi sejtekben 46 kromoszóma található, amelyek nagyságuk és alakjuk szerint párokba rendezhetők. A kromoszómák között vannak olyanok, amelyek férfiakban és nőkben azonosak, ezek az úgynevezett autoszómák. Az ember szöveti sejtjeiben 22 pár, azaz 44 autoszóma van,

ezek mellett még két gonoszómát találunk, melyeknek alapvető szerepük van az ivar meghatározásában. A nők sejtjeiben két egyforma (XX) ivari kromoszóma van. A férfiak X és Y ivari kromoszómái alakjukban és méretükben is jelentősen eltérnek egymástól, azaz nem azonos tulajdonságokra vonatkozó génsorozatokból állnak.

A mitózis alatt a kromoszómák kondenzálódnak, ekkor kerülnek metafázisos állapotba. Ebben az állapotban figyelhetők csak meg egyenként fénymikroszkóppal.

A kromoszómák felépítése első ránézésre nagyon egyszerűnek tűnhet, mégis magasan szervezett szerkezettel rendelkeznek. Két testvér kromatidából állnak, melyeket a centromeron köt össze. A centromert és a körülötte levő részt a kinechtokort, az elsődleges befűződés helyének, a telomereket pedig citológiaiilag a karok végeinek tekintjük, nem jelennek meg semmilyen más morfológiai jellegzetességgként (3. ábra).

A centromeron helyzete szerint elkülöníthetünk meta-telo-és akrocentrikus kromoszómákat. A metacentrikusoknál, nevéből adódóan a centromeron a kromoszóma közepén van, tehát a karok egyforma hosszúak. Az ember esetében ilyen az 1, 3, 19, és a 20-as számú kromoszóma. A telocentrikusok esetében a centromer a kromoszóma végéhez van közel, tehát a két kar, különböző hosszúságú. A rövidebb kart a „p”, a hosszabb kart „q” betűvel jelzik. A karok arányát centromer index adja meg, ami a q (hosszú) és a p (rövid) kar %-ban kifejezett aránya. Az akrocentrikus kromoszómák egykarúak, melyeknek centromer melletti végeit is a telomer zárja le.



3. ábra Genetikai anyag hierarchikus szerveződése

1.4.2 A kromatin

Az eukarioták kromoszómaiban a nem kondenzált genetikai anyag, a kettős szálú DNS a sejtmagban hiszton fehérjékkel alkotott szerkezetben található, ezt a speciális szerveződést nevezzük kromatinnak, melynek a DNS megkettőződésében, a replikációban is fontos szerepe van.

A kromatin szerveződésének három fő szintje van:

1. nukleoszóma– „beads on a string”, azaz gyöngyfüzér-struktúra, melyben a két fordulatnyi 146 bázispárnyi DNS, hiszton oktamereket fog közre, gyöngyfüzérszerűen;
2. 30 nm átmérőjű kromatinfonal;
3. kromoszóma;

Két fajta kromatin létezik, az eukromatin és a heterokromatin.[8][9]

Az eukromatin a kromatin egy típusa, mely gazdag génekben, legalábbis a heterokromatin régióhoz viszonyítva. Mivel a génjeit körülvevő hiszton fehérjék nem szorosan kötődnek a DNS-hez, ezért a génexpresszió aktív, szinte folyamatosan íródnak át az mRNS-be a gének információi.[10] Ha a kromoszómát megfestjük GC-gazdag régiókat kimutatni képes festékkel, akkor kapjuk meg az eukromatin rajzolatait, melyeket R-sávoknak is nevezünk. Ez a festés a heterokromatinnál leírt quinacrin vagy Giemsa festések negatívjaként is felfogható.

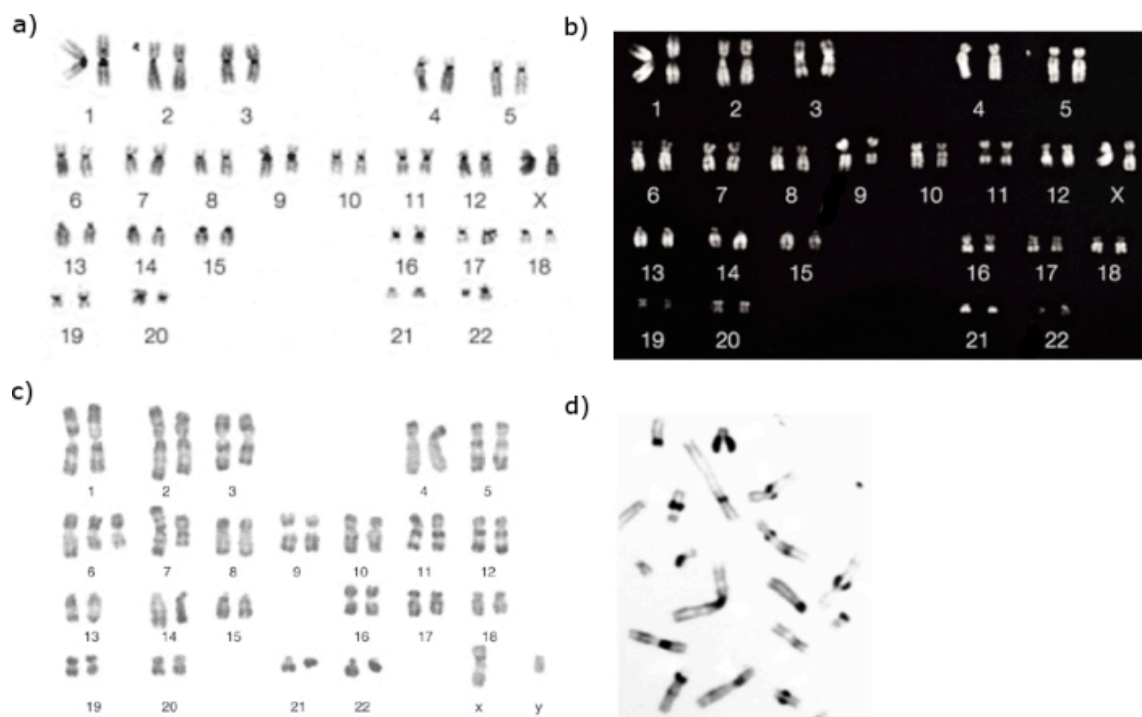
A heterokromatin a kromatin olyan típusa, mely a génexpresszió szempontjából nem aktív. A DNS-t körülvevő hiszton fehérjék szoros kapcsolata miatt a polimeráz enzim nem fér hozzá a DNS-hez. Két fő típusa van, a konstitutív és a fakultatív heterokromatin.

- Konstitutív heterokromatin, mely sohasem aktív, nagyrészt a centromer körül.
- Fakultatív heterokromatin, mely adott körülmények között kifejeződhet.

A konstitutív heterokromatin sohasem íródik át, funkciójában irreverzibilisen inaktív. Az emberi kromoszómák közül az 1-es, 9-es, 16-os és az Y kromoszóma tartalmaz ilyen régiókat. Az ilyen fajtájú inaktiválódásnak a génexpresszióban játszott szerepe fontos tényező a sejt differenciációjában. Ha a sejtet előkezeljük, eltüntetve a DNS 60%-át, és megfestjük Giemsa-festékkel, csak a konstitutív heterokromatin régiók festődnek meg, sötét sávokat eredményezve fénymikroszkóp alatt. Mivel ezen sávok

leginkább a centromereknél és az Y kromoszóma végénél jelentkeznek, C-sávoknak nevezték el őket.

A fakultatív heterokromatinnak megvan a képessége, hogy visszatérjen az eukromatikus állapotba, ezzel lehetővé téve génjeinek kifejeződését. A nőkben található inaktív X kromoszómájuk ilyen kromatinból áll. Valószínűleg ezen kromatin régiók metilációval és hiszton acetilációval tudnak ebben az állapotukban maradni, megakadályozva az enzimeket, hogy a DNS-hez férjenek. A Giemsa-festés fénymikroszkóp alatt, egy fluoreszcens eljárás (Quinacrin-festés) pedig fluoreszcens mikroszkópban egyaránt kimutatja a fakultatív heterokromatin régiókat. Ezeket nevezzük sötét Giemsa-sávoknak és erősebben fluoreszkáló Q-sávoknak (4. ábra) [11][12][13]



4. ábra a) Giemsa festés, b) Q-sáv festés, c) R-sáv festés, d) C-sáv festés

1.4.3 Hiszton fehérjék

A hisztonokat Albrecht Kossel fedezte fel 1884-ben. A hisztonok teszik lehetővé a humán sejtekben az 1,8 méter hosszúságú DNS molekula néhány mikrométerbe tömörítését. [14] Metilációja és acetilációja révén képesek befolyásolni a génexpressziót is. A hisztonok gazdagok lizinben és argininben. Az N-terminális és globuláris doménjükhöz kötődő enzimek miatt a poszttranszlációs modifikációkban van fontos szerepük.

Hat hiszton típus ismert:

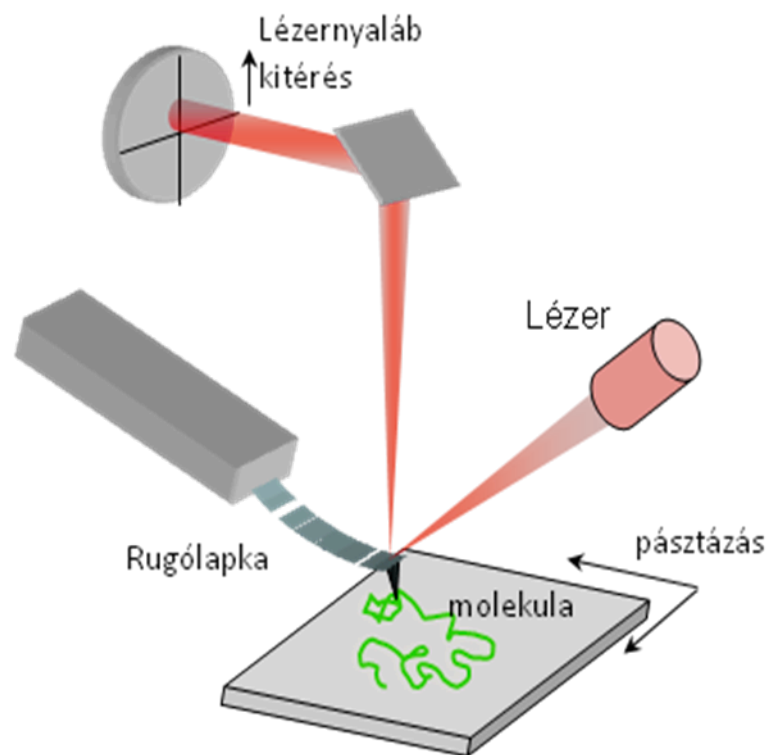
- H1 (ritkán kapcsoló hisztonnak vagy H5-nek is nevezik.)[15][16]
- H2A
- H2B
- H3
- H4
- Archaeális hisztonok

Két-két H2A, H2B, H3 és H4 hiszton alkot egy oktamert, a nukleosómát a 146 bázispárnyi, két fordulatban haladó DNS körül. [17][18][19] Az összekötő H1 hiszton pedig a nukleosómák között teremt kapcsolatot. A H1 hiszton fehérje egy az 5 eukariota sejtek kromatin szerveződésének kialakításában résztvevő hiszton fehérjék közül. Rendelkezik egy centrális globuláris doménnel, illetve hosszú N és C terminális végekkel. Ez a hiszton segíti elő az ún. 'beads on a string' szerkezet átalakulását a 30 nm átmérőjű szolenoid struktúrába. A legfontosabb magasabb rendű szerveződés a 10 nm átmérőjű beads-on-a-string, azaz gyöngyfüzér struktúra. A 100 nm átmérőjű kromatin fonál, majd a jelentik a kromoszóma legfőbb, egyben szabályozásra lehetőséget nyújtó formát. A H1 a többi hiszton fehérjék mennyiségének felét teszi ki, mivel nem alkotórésze a 'gyöngyöknek'. A nukleosómákon helyezkedik el, mintegy helyén tartva a DNS szálat. A H2A, H2B és H3 hisztonok szintén a kromatin szerveződésének kialakításában vesznek részt és rendelkeznek egy centrális globuláris doménnal, illetve egy hosszú N terminális véggel és elősegítik a 'beads on string' szerkezet átalakulását.

A H4 egy hiszton osztály, része a hiszton oktamernek. Az N-terminális vége játszik szerepet a nukleoszómában a TATA box felszabadításában. [20] Amikor aktiváló fehérjék kapcsolódnak az N-terminális vég specifikus pontjához, ez konformációs változást idéz elő a hisztonban, melynek eredményeként átmenetileg a H2A és H2B hisztonok nukleoszómából történő kilökődése megy végbe. E folyamat pedig a DNS bizonyos részeit szabaddá teszi a transzkripció gépezet számára. Az átíródás után az oktamer szerkezete helyreáll. [21][22][23]

1.5. Atomerőmikroszkóp (AFM)

Az atomerőmikroszkópot Gerd Binnig fedezte fel 1986-ban amiért Nobel-díjat is kapott. Az AFM a pásztázó tűszondás mikroszkópok családjába tartozó vizsgálati módszer. A Pauli-féle kizárási elv miatt a tű és a vizsgált anyag elektronfelhőinek taszítóereje az, ami a gyenge rugóállandó mellett nem engedi, hogy a tű behatoljon az anyagba, viszont a rugóállandója elég erős ahhoz, hogy a tűt a felszínhez nyomja. A detektálási rendszer feladata nem más, mint a rugólapka elmozdulásának érzékelése. Ennek leggyakoribb módja a fény-reflexió detektálási módszer, mellyel a mérőrugóra irányított és arról visszaverődő vékony fénynyaláb segítségével érzékelhető a rugólapka deformációja. A használt fényforrás a lézer. A lézernyaláb elmozdulását kvadráns pozícióérzékelő fotodióda érzékeli (5. ábra). A mérés elkezdése előtt a lézer-dióda, a tükör és a detektor mozgásával el kell érni, hogy a visszavert nyaláb éppen a detektor közepére essen. Ezzel azt érjük el, hogy a szegmensek áramainak összege maximális, a szemben lévő szegmensek áramainak különbsége pedig nulla. A lézernek a rugólapka végéről kell visszaverődnie, mert ott maximális a rugó kitérése. A leképezett felszíni topográfiát követő lézersugár-kitéréseket elektronikai úton vissza lehet csatolni a piezoelektromos transzducerek mozgására is, amely sok mérési változatot tesz lehetővé.



5. ábra Az AFM működési elve

2. Célkitűzések

A kromoszómák az átörökítő anyag (DNS), a hiszton és non-hiszton fehérjékkel alkotott különleges komplexei, melyek biztosítják az örökítő anyag megfelelő szegregációját a sejtosztódás során. Kutatásunk célja a humán metafázisos kromoszómák szerkezetének, szerkezeti dinamikájának, strukturális változásainak megismerése. A különböző módusú rugalmas sajátosságainak, mechanikai erőkkel szembeni stabilitásának és erővezérelt folyamatainak jellemzése. Szerkezeti topográfiáját és kialakulásának, kondenzációs folyamatának molekuláris mechanizmusait, befolyásolhatja a környezet ionerőssége, pH-ja, a jelenlevő enzimek, illetve adott esetben a kromoszóma aberrációja. A kutatás során szeretnénk megismerni a kromoszómák fizikai tulajdonságait a befolyásoló tényezők változtatása mellett is.

Egyedi kromoszómák mechanikai manipulációjával bepillantást nyerhetünk azok szerkezeti hierarchiájába. Atomerő-mikroszkóppal tapogatjuk le a kromoszómák felületét, majd kitüntetett pontokon nanomechanikai perturbációk történnek.

A ma is elfogadott kromoszóma modell szerint, a kromoszómákat fizikailag egy kemény csőnek kell elképzelni, amit egy viszonylag vastag, de puha burok fog körül. Jelen és jövőbeli vizsgálataim célja, hogy ezt az elméletet igazoljam vagy kiegészítsem új mérési eredményekkel, melyek megváltoztathatják a kromoszómák fizikai tulajdonságairól kialakult nézeteket.

Vizsgálataim célja:

A humán metafázisos kromoszómák

- szerkezetének,
- strukturális hierarchiájának
- szerkezeti dinamikájának
- rugalmas tulajdonságainak vizsgálata

3. Anyagok és módszerek

3.1. Kromoszóma preparálás perifériás vérből

Anyagok: Ratiopharm - Heparibene Na 25000 injekció (5x5 ml)

Cytogen – Lymphogrow (100 ml) REF: LGM-100

Sigma – Colchicine 95% (HPLC)

0.075M KCl

Carnoy oldat: 3:1 metanol-ecetsav

60%-os ecetsav

A vérvétel és az izolálás saját perifériás vérből, az I.sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Genetikai laborjában történt. Az alábbi izolálási módszert rutinszerűen alkalmazzák a laborban.

1. Vérvétel-0.2 ml NaHeparin+1.8 ml perifériás vér 2 ml-es fecskendőbe
2. Sötét csavaros üvegbe, vagy centrifugacsőbe előre felengedett 10 ml Lymphogrow (Cytogen) táptalaj+13 csepp teljes vér
3. 72h inkubálás 37°C-s termosztátban
4. 72h múlva +300 µl kolhicin, majd 37°C-os termosztátba tesszük 1,5 órára
5. Centrifugálás 1200 G 10 perc
6. Felülúszót leöntöm, 10 ml (0.075M) KCl-t csepegtetek hozzá, ismét inkubálom 13 percig 37°C-on
7. Centrifugálás 1200 G 10 perc
8. Felülúszót leöntöm, közepes erősségű vortexes keverés közben 10 ml 3:1 metanol-ecetsavat adok hozzá (először csak cseppenként), majd 20-25 percig +4°C-on inkubálom
9. Centrifugálás 1200 G 10 perc
10. Felülúszót leöntöm, ismét 10 ml metanol-ecetsavat adok hozzá és 20-25 percig szobahőmérsékleten inkubálom

11. Centrifugálás 1200 G 10 perc
12. Felülúszót leöntöm, 7 ml metanol-ecetsavat adok hozzá és 20-25 percig szobahőmérsékleten inkubálom
13. Centrifugálás 1200 G 10 perc
14. Felülúszót leöntöm, majd 5-8 csepp 60%-os ecetsavat adok hozzá
15. Felhasználás előtt cseppentés szobahőmérsékletű (vagy desztillált vizes) etanollal zsírtalanított tárgylemezre

A nem azonnal felhasznált minták 4°C-on tárolandók.

3.2 Az atomerőmikroszkóp mérési eljárásai

a) Nem modulált vagy DC eljárás

Ez az eljárás az erőt a rugólapka elhajlásának detektálásával méri. A rugólapka függőleges kitérése a Hooke-törvény szerint arányos a rá ható erővel:

$$F = kz$$

1. egyenlet

Ha a rugólapka a felszín felett haladva a változó erő hatására elhajlik, a visszacsatoló elektronika úgy módosítja a piezo z irányú deformációját, hogy a rugólapka az eredeti állapotába visszatérjen. Ezáltal felvehető a z irányú piezo-feszültség $V_z(x,y)$ függvénye, ami megfelel a felület topográfiájának, feltéve, hogy a tűre ható erő csak a tű és a felszín közötti távolságtól függ.

b) Modulált vagy AC eljárás

Egy piezoelektromos kristály segítségével a rugólapka a rezonancia-frekvenciája környékén rezgésbe hozzuk, és a túre ható erő változására fellépő rezonancia-frekvencia eltolódást detektáljuk. Ez a technika az erő gradiensére érzékeny, ami az effektív rugóállandót változtatja. Megmutatható, hogy a tű és a minta közötti vonzó erő csökkenti, a taszító erő növeli a rezonancia-frekvencia értékét.

A mérési metodikák a tű és a minta egymáshoz viszonyított helyzete szerint is csoportosíthatók:

a) "Contact" mérési eljárás

A tű és a minta állandó kontaktusban vannak. [24] Ilyenkor a tű a taszító tartományban "dolgozik". A rugóállandót az érzékenység növelése érdekében kicsire célszerű venni, azaz lágy rugólapkát kell használni. A felszínen levő szennyeződés, lecsapódott pára miatt fellépő meniszkusz erő az egyik legzavaróbb effektus, de csökkenthető hegyesebb tű használatával, vagy megszüntethető folyadék alatt történő méréssel.

- Állandó erővel történő mérés

A visszacsatoló rendszer a DC eljárásnál leírtak szerint működve az erőt állandó értéken tartja, a piezo kristály z irányú feszültsége úgy módosul, hogy az "követi" a felszín topográfiáját. Az osztott fotodiódás detektoron a fényfolt helyzete így állandó marad. Ez a legelterjedtebb mérési eljárás.

- Változó erővel történő mérés

Itt a piezo kristály z irányú feszültsége állandó, a rugólapka a változó erő miatt történő elhajlását folyamatosan detektáljuk. A fotodetektor nem képes olyan mértékben követni a kitéréseket, mint az előző eljárásnál a piezo, ezért ez kevésbé elterjedt technika.

- Lokális erő spektroszkópia

A felület egy kiválasztott pontján felvesszük az erő - elmozdulás (piezo z irányú elmozdulása) függvényt, az erőt pedig a rugólapka elhajlásából kapjuk meg. [25]

b) "Noncontact" mérési eljárás

Itt az erő mérése az AC eljárásnál leírtaknak megfelelően történik. A visszacsatolást vagy konstans amplitúdó vagy konstans frekvencia mellett végzik. Ezzel nem érhető el akkora felbontás, mint a contact eljárással, viszont a mintát kevésbé rongálja. [26] - Nagy amplitúdójú rezonancia a merev rugólapka a rezonancia-frekvenciáján rezeg (50-500 kHz), nagy amplitúdóval (100-1000 Å). A tű főleg a vonzó tartományban működik, de "behatolhat" a taszító tartományba is. Nagyon lágy minták esetében használjuk. - Kis amplitúdójú rezonancia Ez is nagy rugóállandóval, de kis amplitúdóval (2-10 Å) működő technika. Érzékeny a felületet borító szennyeződésre. - DC Noncontact Ez esetben nem rezegtetjük a rugólapkát, de a taszító tartománynál jóval távolabb tartjuk annak tujét.

3. "Tapping" eljárás

A nagy amplitúdójú rezonancia eljáráshoz hasonlóan itt is 50-100 nm amplitúdójú rezgéseket végez a z-piezo, de a visszacsatolás úgy van beállítva, hogy a tű minden rezgésnél érintse a felületet. Célszerű nagy rugóállandóval rendelkező rugólapkát használni. Ez az eljárás azért előnyös, mert a felületen ható erők nem károsítják a felszínt (nincs vízszintes irányú komponensük), ugyanakkor a felbontás megközelíti a contact eljárással elérhető felbontást.

A mérési eljárások csoportosíthatók aszerint is, hogy a mérés levegőn vagy folyadék közegben történik-e. A folyadékos eljárás speciális mérési elrendezést igényel (pl. folyadék-cellát). A folyadék lehet desztillált víz, vagy biológiai minták esetében a megfelelő puffer. Ezen mérési eljárás előnye, hogy nincs zavaró meniszkusz erő. [27]

A rugó-tű rendszer f_0 rezonancia-frekvenciájára és k rugóállandójára fennáll az

$$f_0 = \frac{\pi}{2} \sqrt{\frac{k}{m_0}}$$

2. egyenlet

összefüggés, tehát a két feltétel akkor teljesül egyszerre, ha az m_0 effektív tömeg kicsi. A rugólapkák tipikus hosszúsága 100 μm , vastagságuk 1 μm , felülnézetben téglalap vagy V-alakúak. A rugólapkán levő tűk alakjukat, elektrokémiai maratással kapják. A tűk elejénél körülbelül 5 μm átmérőjűek, míg a csúcsuknál kevesebb, mint 500 Å a görbületi sugaruk.

A tű és a rugó mechanikai tulajdonságai nagyban befolyásolják a mikroszkóp felbontóképességét. A mérőrugóknak két feltételnek kell megfelelniük:

1. A nagy érzékenység eléréséhez a rugóállandónak kicsinek kell lennie.
2. A környezetből érkező zavaró, viszonylag kis frekvenciájú rezgések és a visszacsatolási elektronika miatt fontos, hogy nagy legyen a rugó rezonancia frekvenciája.

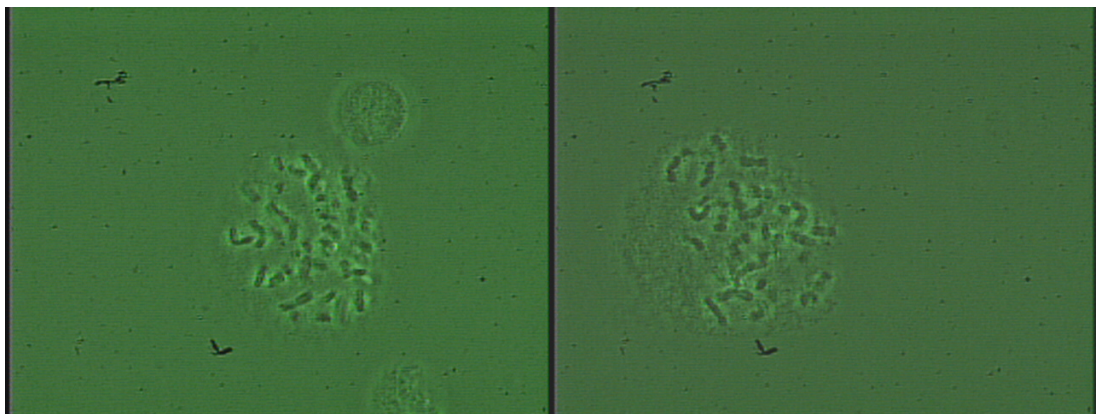
Az erőmérés feltétele a minta rehidratáltsága, tehát a méréseket pufferben végeztük. A használt oldat:

GIBCOBRL Buffer tablets "GURR" (Life technologies) 1097016, pH 6.8.

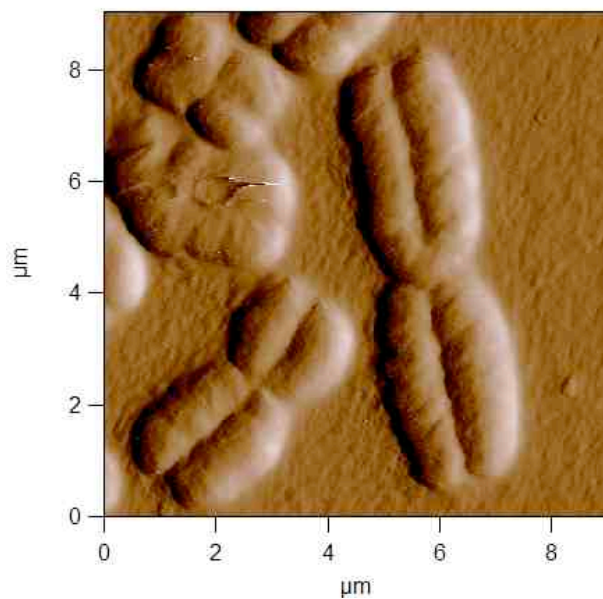
4. Eredmények és megvitatásuk

Méréseimet az Asylum Research MFP3D (Santa Barbara, CA) mikroszkóppal végeztem. A szerkezeti topográfia méréséhez szilikon-nitrid rugólapkát használtam (Olympus AC160, rezonancia-frekvencia levegőben ~350 kHz). A képek nagysága 5 x 5 - 40 x 40 μm -ig terjedt, felbontásuk minden esetben 512 x 512 pixel volt, a tipikus scannelési frekvencia pedig ~0.5 Hz, viszonylag magas set point értékkel (0.8-1V). Pufferben történő pásztázás során Az erőmérésekhez szintén szilikon-nitrid rugólapkát használtam (Olympus Biolever, rezonancia-frekvencia pufferben ~10 kHz). A képek nagysága 5 x 5 - 40 x 40 μm -ig terjedt, felbontásuk itt is minden esetben 512 x 512 pixel volt, a tipikus scannelési frekvencia ~0.3 Hz, 0.3-0.6 V-os set point értékeknél. A pásztázások AC módban történtek.

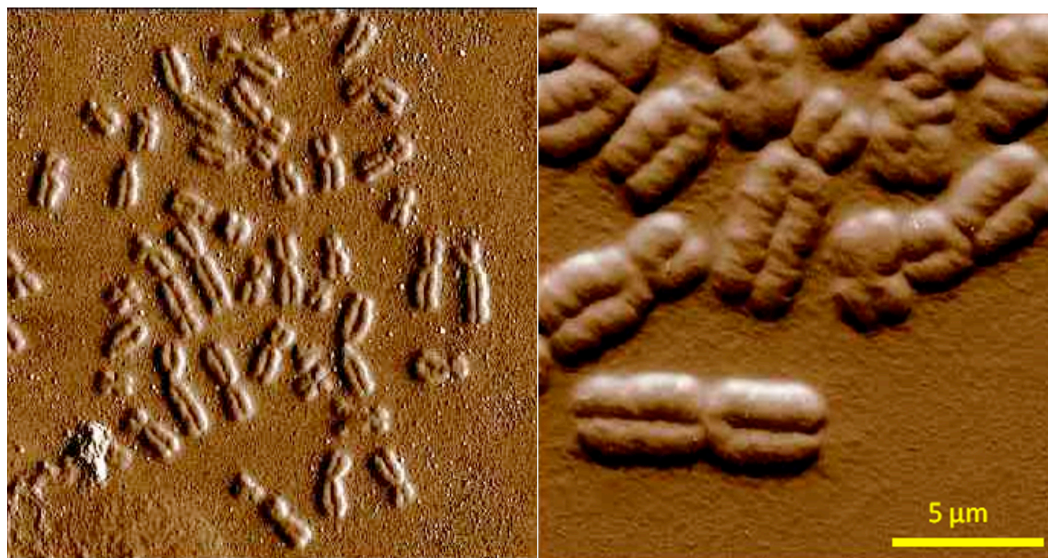
200 μl preparátumot cseppentettem ki mikroszkóp tárgylemezre, amit szobahőmérsékleten hagytam megszáradni. Ezután egy rutin vizsgálati módszerrel, a fázis-kontraszt mikroszkóppal bizonyosodtam meg arról, hogy a mintában valóban találhatók metafázisos kromoszómák (6. ábra). Ezután következtek az AFM-es mérések (7. ábra) (8-9. ábra).



6. ábra Fázis-kontraszt mikroszkóp felvételek humán metafázisos kromoszómákról



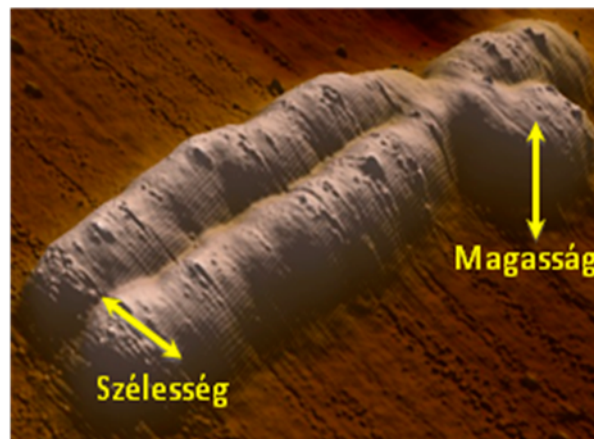
7. ábra Szárazon pásztázott human metafázisos kromoszómák



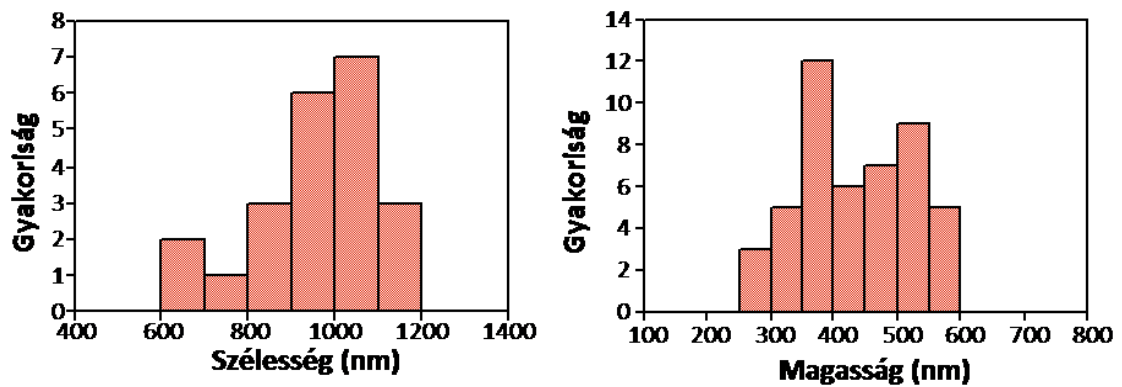
8-9. ábra Pufferben pásztázott kromoszómák AFM-mel készített képe

4.1 Topográfiai szerkezet analízise

Az analízis során felvettük a kromoszómák felületi topográfiáját (10. ábra), illetve megmértük a főbb geometriai paramétereket, a kromoszóma karok magasságait és szélességeit (11. ábra).



10. ábra Topográfiai analízis 3D képe

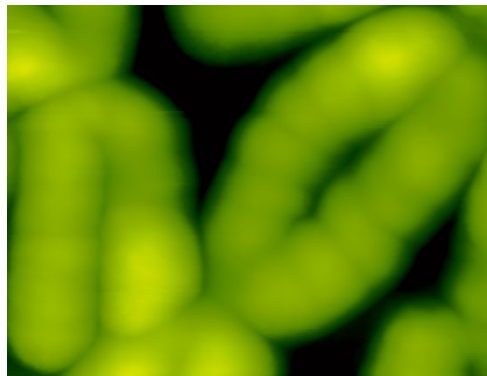


11. ábra A kromoszómák átlagos szélessége és magassága

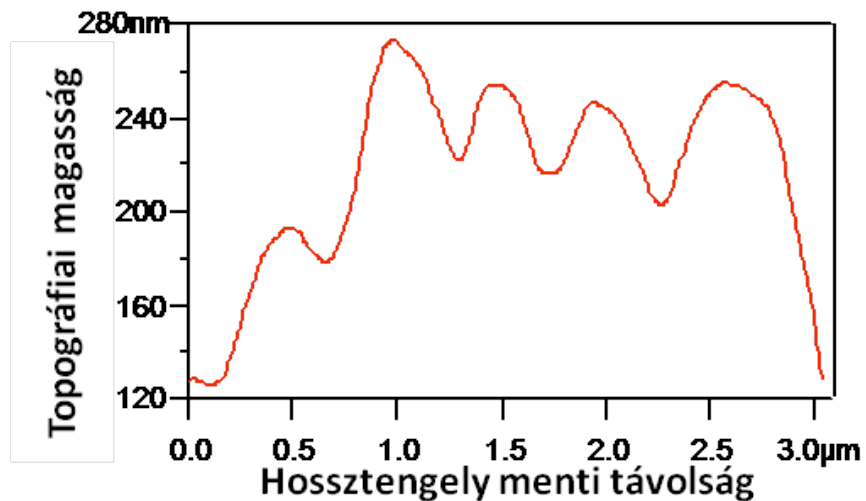
Az átlagos kromoszóma kar szélességekre 1014 nm-t, míg az átlagos kromoszóma kar magasságokra átlagosan 423 nm-t kaptunk. Ezen értékek alapján

látható, hogy a kromoszóma karok magassága messze elmaradnak azok szélességétől. Ezt a jelenséget ellaposodásnak nevezzük, mely azzal magyarázható, hogy a kromoszómák a felülethez való kitapadásakor különböző kölcsönhatások, illetve kötések alakulnak ki, így a kromoszómák bizonyos mértékű alakváltozást szenvednek. Az ellaposodás oka lehet továbbá a de-és rehidratálással kapcsolatos.

A felületi topográfia analíziséhez további méréseket végeztünk (12-13. ábra).



12. ábra Kromoszóma felületi topográfiája

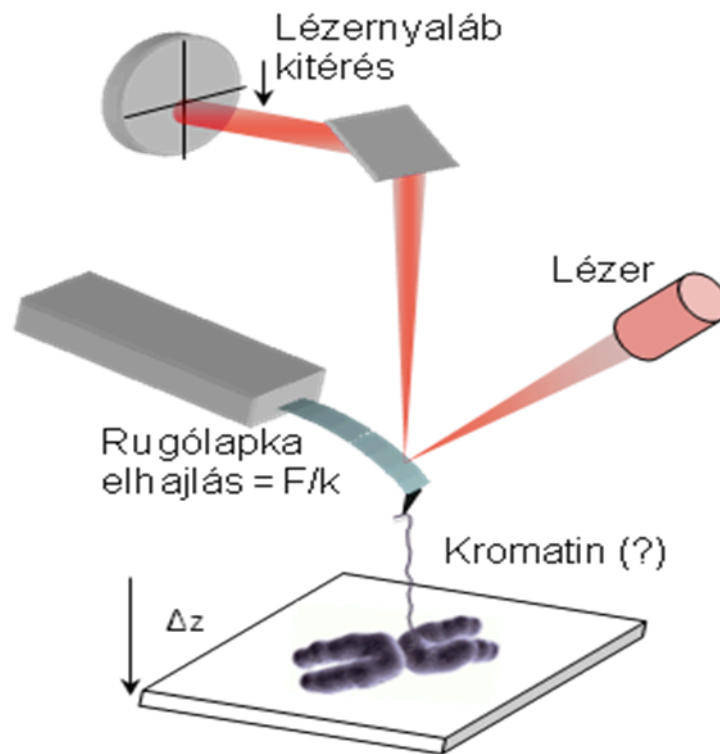


13. ábra Kromoszóma felületi topográfiájának analízise

A kar hossz tengelye mentén periodikusan változó topográfiát figyeltünk meg. A csúcsok közötti távolság körülbelül 400-600 nm-es, amplitúdójuk pedig 20-40 nm-es volt. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a kromoszóma karok periodikus sávzottságot mutatnak és valószínűleg ezek a sávok, kompakt és kevésbé kompakt részekből állnak.

4.2 Nanomechanikai tulajdonságok vizsgálata

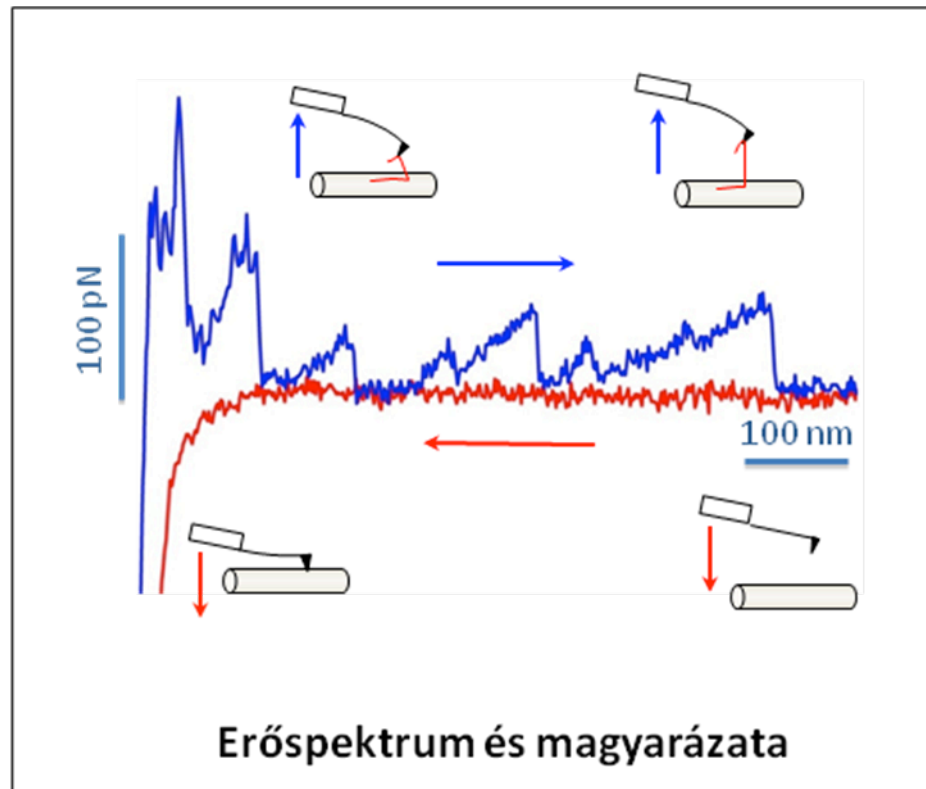
A nanomechanikai tulajdonságokat szintén atomerő mikroszkóppal vizsgáltuk. Az erőmérés elve, az hogy a rugólapka tűjével állandó sebességgel közelítünk a minta felé. Amikor a tű eléri a mintát, belenyomjuk és onnan ugyanazzal a konstans sebességgel elhúzzuk, a mintától vertikális irányban. Amennyiben a tűre rátapadt valamilyen struktúra, az ellent fog tartani a tűnek és ezzel együtt a rugólapkának is ami ennek hatására meghajlik. Ebből az elhajlásból, illetve a rugólapka rugóállandójából kiszámolható a szóban forgó erő nagysága (14. ábra). A nanomechanikai tulajdonságok mérésénél elengedhetetlen a minta rehidratáltsága.



14. ábra Erőmérés elve

A regisztrált erőkből egy olyan erőspektrumot tudunk felvenni, mint ami az alábbi ábrán látható (15. ábra). Jól megfigyelhető az erő változása a távolság függvényében. Az erőspektrumon, a kétféle szín, az adatgyűjtés irányát jellemzi. A piros szín azt a fázist jellemzi, ahol a rugólapka tűjével közeledünk a felszínhez, illetve ahol el is érjük azt, a kék színű pedig az a fázis amikor a rugólapka távolodik a kromoszóma felületétől.

Az alábbi ábrán a humán metafázisos kromoszómák tipikus "fűrészfog" alakú erőspektruma látható, melyen az erők periodicitása figyelhető meg. A felszálló ágban a megragadott szerkezetet folyamatosan feszítjük. A csúcson pedig olyan szerkezetváltozás jön létre, amely a feszített szerkezet hirtelen megnyúlásával jár.

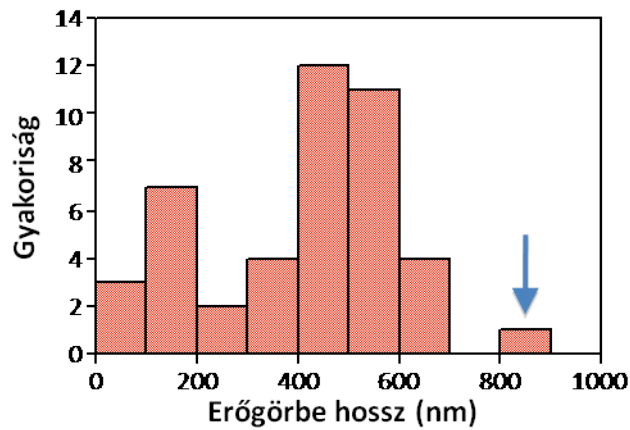


15. ábra A kromoszóma tipikus erőspektruma és magyarázata

4.3 Erőmérések analízise

Analízisünk során megmértük a kapott erőspektrumok teljes hosszát, az egymást követő erőcsúcsok közötti távolságokat és az erőcsúcsok magasságát, vagyis azon erők nagyságát, melyekkel a minta ellentart a rugólapkának.

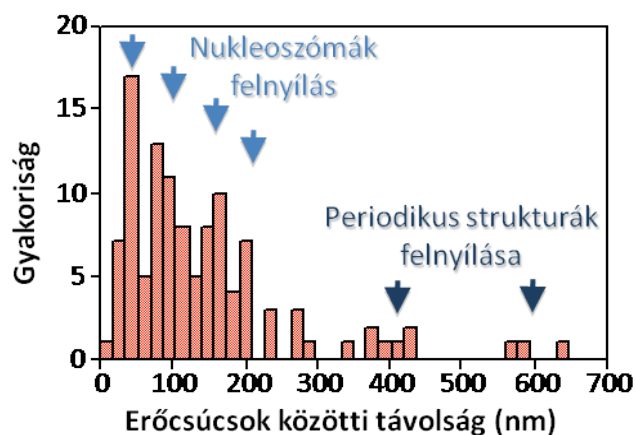
Az erőgörbék teljes hossza alapján elmondhatjuk, hogy jellemzőek voltak a 200 nm-es és a 400-600 nm-es hosszúságok. Ezek mellett pedig sikerült, több száz nanométeres, illetve közel 1 mikrométeres struktúrákat is kihúztunk a felszínből (16. ábra).



16. ábra Erőgörbék hossza

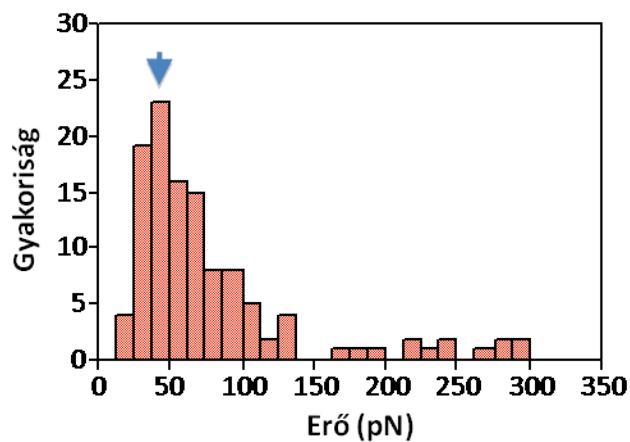
Az erőcsúcsok közötti távolságok mérésénél (17. ábra) leggyakrabban 50-200 nm, illetve 400-600 nm-es értékeket kaptunk. Az előbbiből a nukleoszómák felnyílására következtethetünk, mivel az 1. csúchoz rendelhető érték, vagyis az 50 nm-es távolság, előzetes irodalmak alapján körülbelül megegyezik annak a DNS szakasznak a hosszával, mely erő hatására letekeredik a nukleoszómáról.

A nagyobb erőcsúcsok közötti távolságok (400-600 nm) összefüggésbe hozhatók az előbbieken, a kromoszóma szerkezeti topográfiáján látható 400-600 nm-es periodicitással.

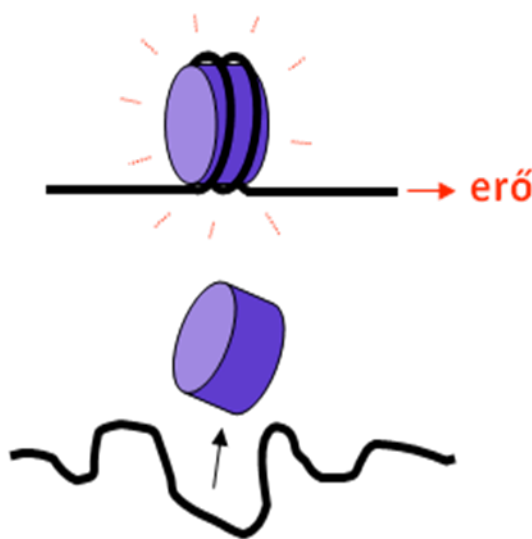


17. ábra Erőcsúcsok közötti távolságok

Az erőeloszlásban (18. ábra) látható egy ~ 50 pN-os maximum, amely jól összevethető az egyedi DNS illetve mesterséges kromoszómaszálon végzett erőmérésekkel, ahol körülbelül ekkora nagyságú erőnél zajlik a nukleoszóma disszociációja a DNS száltól. Az alsó ábra ezt a jelenséget modellezi (19. ábra). A modell szerint erő hatására, a DNS ráfeszült állapotban van a nukleoszómán, de egy, a szerkezetre ható másik erő hatására a DNS disszociált a nukleoszómától, tehát a DNS molekula szabadabbá válik.



18. ábra Az erők nagysága



19. ábra DNS disszociációja a nukleoszómától

5. Összefoglalás

Sikerrel vizualizáltunk és manipuláltunk egyedi humán metafázisos kromoszómákat. A kromatida karok hossztengelye mentén alternálóan elhelyezkedő barázdáltság volt megfigyelhető, melyek kompakt és fellazult struktúrákra utalnak és periodikusan váltakoznak. Ennek a periodicitásnak a mértéke a topográfiai analízisünk alapján körülbelül 400-600 nm között váltakozott, mely távolságok többször megjelentek az erőmérések során is.

Nanomechanikai manipulálás során viszkoelasztikus struktúrákat húztunk ki a kromoszómák felületéből. A maximális megnyúlás típusosan több száz nanométer volt, és bizonyos esetekben elérte az 1 mikrométert. A kihúzott struktúrákat sikerrel azonosítottuk.

A felvett erőspektrumokban repetitív fűrészfogak jelentek meg, amelyek a kromatinszálat rögzítő kölcsönhatások felszakadásával, illetve a kromatinban mechanikai erő hatására fellépő szerkezeti változásokkal kapcsolatosak. Ezek alapján a periodikus szerkezetek felszakadására következtettünk. A kisebb (~50 nm-es csúcsok közötti távolság) erőperiodicitás a nukleoszómák felnyílására, míg a nagyobb (~400-600 nm) a kompakt struktúrák erővezérelt felnyílásával hozható összefüggésbe. A rugalmas erőgörbéken megfigyelhető volt a nemlineáris erőválasz, amely a kromatin illetve DNS szál entrópiikus rugalmasságát jellemzi és az erő-plató, amely a kromatinszál polimer-gomolyagból való konstans erővel történő kihúzását jellemzi.

Összességében tehát elmondható hogy fizikai úton sikerült megbontanunk a humán metafázisos kromoszóma hierarchikus szerkezetét úgy, hogy közben minden egyes lépésnél regisztrálni tudtuk a szerkezeti elemek (nukleoszóma, DNS) közötti összetartó erőket.

6. Irodalmi hivatkozások

1. Wilson, E.B. (1925). *The Cell in Development and Heredity*, Ed. 3. Macmillan, New York. p. 923.
2. "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1933". Nobel Web AB. http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1933/index.html. Retrieved 2010-09-14.
3. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, ed (2002). *Molecular Biology of the Cell, Chapter 4, pages 191–234* (4th ed.). Garland Science.
4. Lodish, H; Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. (2004). *Molecular Cell Biology* (5th ed.). New York: WH Freeman. ISBN 0-7167-2672-6.
5. Stuurman N, Heins S, Aebersold U (1998). "Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions". *J Struct Biol* **122** (1–2): 42–66. PMID 9724605.
6. Goldman A, Moir R, Montag-Lowy M, Stewart M, Goldman R (1992). "Pathway of incorporation of microinjected lamin A into the nuclear envelope". *J Cell Biol* **119** (4): 725–735.
7. Clegg JS (February 1984). "Properties and metabolism of the aqueous cytoplasm and its boundaries". *Am. J. Physiol.* **246** (2 Pt 2): R133–51. <http://ajpregu.physiology.org/cgi/pmidlookup?view=reprint&pmid=6364846>.
8. "Chromatin Network Home Page.". <http://chromatin.net/>. Retrieved 2008-11-18.
9. Dame, R.T. (May 2005). "The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin". *Molecular Microbiology* **56** (4): 858–70.
10. Ehrenhofer-Murray A (2004). "Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair". *Eur J Biochem* **271** (12): 2335–2349.

11. Rowley, J. Chromosome translocations. *Nature Reviews Cancer* **1**, 246;
12. Stamatoullas, A. *et al.* Conventional cytogenetics of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* **21**, 2065;
13. Vega, H. *et al.* Roberts syndrome is caused by mutations in *ESCO2*, a human homolog of yeast *ECO1* that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. *Nature Genetics* **35**, 469.
14. Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W (April 2002). "Histone H2A variants H2AX and H2AZ". *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12** (2): 162–9.
15. Crane-Robinson C, Dancy SE, Bradbury EM, Garel A, Kovacs AM, Champagne M, Daune M (August 1976). "Structural studies of chicken erythrocyte histone H5". *Eur. J. Biochem.* **67** (2): 379–88.
16. Aviles FJ, Chapman GE, Kneale GG, Crane-Robinson C, Bradbury EM (August 1978). "The conformation of histone H5. Isolation and characterisation of the globular segment". *Eur. J. Biochem.* **88** (2): 363–71.
17. Youngson, Robert M. (2006). *Collins Dictionary of Human Biology*. Glasgow: HarperCollins. ISBN 0-00-722134-7.
18. Cox, Michael; Nelson, David R.; Lehninger, Albert L (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. San Francisco: W.H. Freeman. ISBN 0-7167-4339-6.
19. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (September 1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution". *Nature* **389** (6648): 251–60.
20. Lifton RP, Goldberg ML, Karp RW, Hogness DS (1978). "The organization of the histone genes in *Drosophila melanogaster*: functional and evolutionary implications". *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **42**: 1047–1051.
21. Cox, Michael; Nelson, David R.; Lehninger, Albert L (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. San Francisco: W.H. Freeman. ISBN 0-7167-4339-6.

22. Bhasin M, Reinherz EL, Reche PA (2006). "Recognition and classification of histones using support vector machine". *J. Comput. Biol.* **13** (1): 102–12.
23. Hartl, Daniel L.; Freifelder, David; Snyder, Leon A. (1988). *Basic Genetics*. Boston: Jones and Bartlett Publishers. ISBN 0-86720-090-1.
24. Hinterdorfer, P; Dufrêne, Yf (May 2006). "Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy". *Nature methods* **3** (5): 347–55. ISSN 1548-7091.
25. Butt, H; Cappella, B; Kappl, M (2005). "Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications". *Surface Science Reports* **59**: 1–152.
26. Roiter, Y; Minko, S (Nov 2005). "AFM single molecule experiments at the solid-liquid interface: in situ conformation of adsorbed flexible polyelectrolyte chains". *Journal of the American Chemical Society* **127** (45): 15688–9.
27. Zhong, Q; Inniss, D; Kjoller, K; Elings, V (1993). "Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy". *Surface Science Letters* **290**: L688.