

CHROMOSOMAL SUBFRACTION에서 BENZO(A)PYRENE 화합물의 생화학적 연구

고신대학 의학부 생화학 교실

조무연, 이송재, 정인철, 정인권, 노 준*

Biochemical Studies of Benzo(a)pyrene Compounds in Chromosomal Subfraction

Moo Youn Cho, Song Jae Lee, In Cheol Jeong, In Kwon Jung, Joon Rho*

Department of Biochemistry, Kosin Medical College,

Pusan 602-702, Korea

*Department of Biomedical Chemistry,**

School of Pharmacy, University of Southern California, U.S.A.

= Abstract =

The distribution of the carcinogen within the chromosomal subfractions of the transformable C3H/10T1/2 mouse fibroblast cell demonstrated a significant enrichment of benzo(a)pyrene(BP) in the portion of the chromatin which is complexed with the tightly bound nonhistone chromosomal proteins(DNA-P).

In the chromatin isolated from cells exposed to BP, BP metabolites were stimulated to ability of binding formed DNA-protein complex compared with control. In addition, fluorometry data treated BP in C3H/10T1/2 cells clearly indicates that the covalently bond adduct is BP-diol epoxide in guanidium chloride dissociation and proteinase K digests data indicate that the majority of the carcinogen is bound to protein rather than to DNA.

The data suggest that the binding of BP in this fraction may lead to change the replicative and transcribe activities.

Key Words : Benzo(a)pyrene, Chromosomal Subfraction, C3H/10T1/2 cell.

* This study was supported in part by a grant(1988) from the Ministry of Education

암을 일으키는 근원을 알기 위해 많은 연구가 있었으나 질병의 정확한 원인과 기전에 대해서 아직도 모른다. 발암물질로 coal tar가 알려진 이래 일부 화학물질이 암을 일으키는 것으로 크게 부각되었는데 그간 잘 알려진 것으로 polycyclic hydrocarbon, azo-dye, acetyl amino fluorene, nitrosamine, nitroamides와 ethionine 등이 있다¹²⁾.

일반적으로 화학적 발암물질이 암을 유발하는데는 DNA손상 및 돌연변이에 기인한다고 보기 때문에 박테리아 개체의 reversion을 관찰한다던가 여러가지 화합물에 의한 종양성 연구로 point mutation을 조정하는 것이 대부분이었다. 그리고 신생종양을 일으키는 기전에 대해서는 발암물질이 직접 DNA를 공격하던가 그의 대사산물이 DNA에 결합하여 돌연변이를 일으켜 암이 되는 것으로 말하여 왔다^{6, 7, 13, 14)}. 그렇기 때문에 많은 연구자들이 이를 DNA-carcinogen adduct라 하고 Estman과 Bresnick¹⁰⁾는 mice에서 DNA-methylcholanthrene adduct가 신생종양의 전이에 직접적인 원인이 된다 하였으며 Arrand와 Murracy¹¹⁾는 nontarget으로 작용하는 섬유아세포 보다는 target 조직으로 작용하는 human의 폐 상피세포의 DNA가 benzo(a)pyrene(BP) metabolite와 결합을 잘 한다고 하였다. 그러나 Jungmann과 Schweppe¹⁶⁾는 백서 간에서 분리한 chromosomal 단백질과 동위원소로 표지한 N-hydroxy-N-2-fluorenyl acetamide; p-dimethylamino benzene을 결합시켜 관찰한 결과 histone과 nonhistone에 상호 작용이 있음을 발견하였고, Vaught와 Bresnick³²⁾은 백서 간장 nuclei를 BP와 항온시켰을 때 결합 친화성이 DNA보다 histone에 2배, nonhistone에서는 4배가 증가함을 관찰하였으며, BP가 결합하는 active fraction을 측정했을 때 BP가 단백질에서는 94%, RNA 5%, DNA 1%가 결합되는 사실을 알았다³⁵⁾. 최근의 연구에서는 nucleus에 고농도의 염을 처리한 경우, 남아있는 단백질의 중요성을 지적하였으며^{18, 24, 27)}, antigen을 함유한 DNA와 응집

반응이 tissue specific하게 일어나고^{9, 26)} 복제능력²⁴⁾과 전사위치^{20, 233)}를 제공하며 steroid receptor complex^{28, 33)}를 형성한다고 하였다. 또 발암물질은 hormone처럼 cytosol에서 receptor 단백질과 결합하고 온도에 민감하게 nucleus로 전이되기도 한다³⁰⁾.

그래서 본 교실에서는 BP 대사산물이 DNA 보다는 chromosomal subfraction 단백질과 더욱 광범위하게 작용할 것이라는 가정하에 chromatin을 2M NaCl로 처리한 추출물의 fraction에서 전사과정을 조절할 가능성을 알아보기 위해 우선 화학적으로 형질전환을 잘 일으키는 C3H/10T1/2 mouse fibroblast cell을 사용하여 nucleus에서 BP의 binding capacity와 결합 분포도를 측정하였고, 형질전환에 관여하는 차이점을 밝힐 목적으로 agarose gel 전기영동을 실행하였다. 또한 BP를 투여한 cell에서 three dimensional fluorometric 분석과 guanidium chloride로 해리시킨 fraction에서 화학적 결합의 형태 및 밀도 구배 원침법으로 대사산물을 분리하여 그 특성을 규명하였다.

연구방법

A. 세포배양

세포는 USC-Cancer center(Los Angeles)에서 제공한 C3H/10T1/2(clone 8) cell을 사용하였다. 이 세포는 10% heat inactivated fetal calf serum, gentamycin(30 μ g/ml)이 함유된 Eagle's basal medium(MEM Gibco Lab. NY)을 75cm² 또는 15cm²의 조직 배양 flask에 넣어 5% CO₂와 37℃의 온도를 유지하는 배양기에서 배양하였다. flask에 부착 배양된 cell을 1% trypsin용액을 넣어 떼어낸 후 다시 850cm² polystyrene coming roller bottle에 밀도가 1~2×10⁶ cell이 되게 하여 150ml의 배양액을 넣어 5% CO₂로 gassing을 시켜 완전 밀폐시킨 후 37℃에서 약 1rpm 정도로 회전되는 배양기에서 배양하였다.

B. 동위원소 표시

발암물질을 표지하기 위하여 cell에 동위원소를 넣기 전에 48시간 동안 benzantrhace-ne($3 \mu\text{g/ml}$)을 넣고 항온시킨 후 $G-^3\text{H-benzo(a)pyrene}$ (specific activity $\cdot 18\text{Ci/m mol}$, Amersham) $50 \mu\text{Ci/ml}$ 와 unlabelled benzo(a)pyrene $2.5 \mu\text{g/ml}$ 을 첨가하여 약 85시간 배양하여 완전한 confluent cell이 되게 하였다.

C. 세포 회수

완전한 confluent cell이 되면 배양액을

버리고 차거운 wash buffer (10mM Tris-HCl pH 8.1, 1mM EDTA , 0.14M NaCl)를 넣고 rubber policeman으로 manual scraping에 의해 회수했다. 이의 조작은 4°C 에서 실행하였고 cell를 3번 wash buffer로 씻어냈다. 씻어진 세포용액을 한데모아 원침시켜 상층액을 버리고 pellet(세포)은 다음 실험을 진행시키기 위해 -70°C deep freezer에 동결 보관하였다.

D. Chromatin subfraction의 분리

동결시켜 보관한 cell을 4°C 에서 녹인 후 세포막을 5mM MgCl_2 와 2% Triton X-100이 함

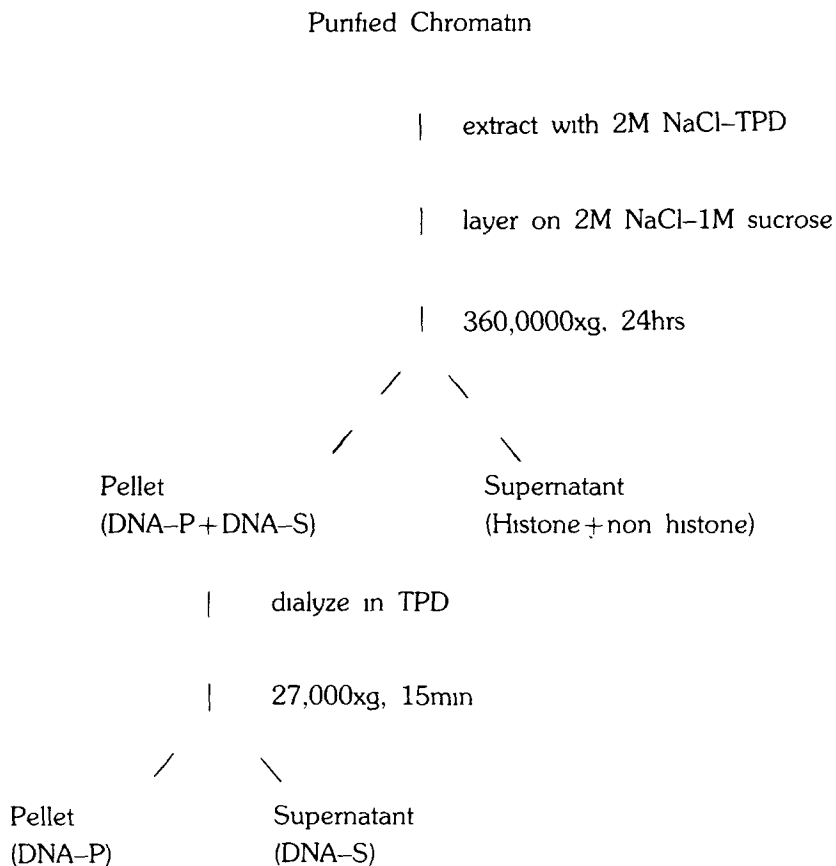


Fig. 1. Fractionation scheme for the separation of DNA-P and DNA-S from chromatin

유된 lysing buffer(TPD: Tris-HCl pH 8.3, 0.1mM PMSF, 0.2mM dithiothreitol)를 사용하여 깨뜨렸다. lysing buffer에 suspension 시킨 cell 을 pipette으로 힘차게 10번 정도 빨았다 불었다 하면서 교반시킨후 10분 정도 방치했으며 그후 몇번 더 교반시킨 후 저속 원침하였다.

nuclei에서 과량의 Triton X-100을 제거하기 위하여 TPD용액으로 반복적으로 씻어냈다. nuclei는 TPD용액을 넣고 Wheaton's hand held homogenizer로 대략 50 stroke 정도 균질화시키면 깨진다. 여기에 1.7M sucrose가 함유된 TPD용액을 2Vol 넣고 15분간 15,000rpm에서 원침하였으며 chromatin은 이전에 기술된 Bekhor와 Mirell²⁾의 방법을 사용하여 2M NaCl로 추출하였다.

E. 비공유결합으로 된 benzo(a)pyrene과 benzo(a)pyrene 산물의 제거

chromatin subfraction에서 비공유결합으로 된 BP 산물을 ethyl acetate에 녹여 제거하였다. 시료 1vol.에 2vol.의 ethyl acetate를 넣고 25℃에서 1분간 교반하고 저속원침시켜 aqueous phase를 옮기고 남아있는 미량의 ethyl acetate는 nitrogen gas주입으로 제거했다. 적어도 6번 정도 추출하면 녹아있는 BP 산물이 제거되고 남아있는 BP산물은 단백질, DNA혹은 RNA에 공유결합으로 존재하게 된다.

F. Benzo(a)pyrene과 그 대사산물의 검증

chromatin subfraction의 BP 및 BP 대사 산물을 구별하기 위해 2가지 방법을 사용하였다.

1. liquid scintillation법

chromatin subfraction의 상기 조작에 의한 분획을 Universal LCS cocktail에 녹여 Packard scintillation counter로 측정하였다.

2. 3-dimentional fluorometry법

polycyclic aromatic hydrocarbon의 구조적인 동질성을 알아내기 위한 방법으로 매우

sensitive한 fluorescence photometer를 사용하는데 이는 1.0 pmol/ml까지 측정할 수 있다. X-Y recorder로 감지하면 isointensity contour line이 뚜렷이 나타나기 때문에 spectrum상으로 구별할 수 있다. chromatin fraction에서 benzo(a)pyrene adduct의 측정범위는 excitation wavelegth가 250~500nm, emission wavelength가 300~600nm이었다.

3. agarose gel의 전기영동법

BP처리한 cell에서 얻은 nuclei를 사용하여 수정된 Thomas 등²⁹⁾의 방법으로 phenol을 가한 다음, 원심분리하여 단백질이 포함된 중간층과 유리 DNA가 존재하는 상층액을 얻어 각각에서 agarose gel 전기영동법으로 DNA를 측정하였다. BP 투여하지 않은 cell에서 얻어진 nuclei를 대조군으로 사용하였다.

G. Guanidium chloride로 분해시킨 시료의 밀도 구배 원침

DNA ml당 20μg의 DNA-P 시료를 8M guanidium hydrochloride(GuCl), 2% β-mercaptoethanol과 10mM EDTA가 들어있는 TPD용액에서 56℃의 수욕에 45분간 항온시켰다. 4M CsCl를 넣어 1.15~1.5의 기울기로 해주고 25℃에서 30,000rpm(Beckman SW 60Ti rotor)으로 48시간 동안 원침하였다. gradient는 일정한 간격으로 자른 후에 dialyze시키고 단백질, DNA와 BP를 분석하였다.

H. proteinase K로 분해시킨 시료의 밀도 구배 원침

대략 DNA ml당 30μg 함유한 DNA-P시료를 proteinase K(100μg/ml)가 들어있는 1% SDS와 10mM EDTA의 항온 완충 용액에 넣어 37℃ 수욕에서 2시간 동안 digest한 다음, 차게한 10% TCA를 동량 첨가하여 반응을 정지시켰다. 여기에 4M CsCl로 2배의 용량이 되게 하고 20℃에서 30,000rpm(Beckman SW 60T1 rotor)에서 원침하였다. gradient 시료를 fractionation시키고 각 fraction을 Scintillation cocktail 용액에 녹여 Packard scintilla-

tion spectrometer로 count하였다.

결 과

A. C3H/10T1/2 chromatin subfraction에서 단백질과 DNA 함량의 조사

발암물질의 결합장소를 측정하기 위해 사용된 분류도표(그림1)는 이전에 reticulocytes²⁾, liver²⁾, placenta²³⁾, oviduct²¹⁾ 조직에서 chromatin을 분리한 방법을 사용하였다. 2M salt extract로 90%이상의 nonhistone chromosomal (NHC)protein과 histone protein 전부를 제거시켰다.

Table 1. Distribution of Protein and DNA in Chromatin Subfractions.

	% Protein	% DNA
DNA-P	10~14	6~9
DNA-S	7~10	89~93
2M NaCl supernatant	80	1~4

표 1에서 보는 바와 같이 2M salt 상층액에 전체 nuclear protein의 80%가 함유되어 있으며 나머지는 DNA-S와 DNA-P fraction에 존재하였다. 반면에 전체 nuclear DNA는 salt 상층액에 소량(1~4%)만이 함유되어 있으며 DNA-S fraction에 89~93%의 많은 양의 DNA가 있으며 7~10%의 protein이 들어있었다. 그리고 DNA-P에는 단지 전체 nuclear DNA의 6~9%가 함유되어 있는 반면 상대적으로 단백질의 양은 전체 핵 단백질의 약 14%를 점유하고 있었다.

B. Nuclei내 chromatin에 BP결합의 친화성

nuclei 내에서 BP가 chromatin에 결합하는 친화력을 측정하기 위하여 C3H/10T1/2 cell을 BP투여군과 BP투여치 않은 대조군으로 나누어 배양한 후 nuclei를 분리하여 agarose gel에서 전기영동으로 DNA를 측정하였다. 그림2에 나타난 바와 같이 BP투여군이 대조군에 비해 DNA-단백질 결합능력이 월등히 높았다. 그러나 반대로 nuclei에서 유리되어 나온 soluble fraction의 유리DNA는 대조군이 높았다.

C. C3H/10T1/2 chromatin subfraction에서 BP분포도

C3H/10T1/2세포의 chromatin subfraction에서 BP 대사산물의 표적소가 어디인지 알기 위한 실험으로 nuclei를 2M NaCl을 사용하여 얻어진 추출물에서 DNA-P와 DNA-S fraction을 분류하여 DNA와 protein 및 BP를 정

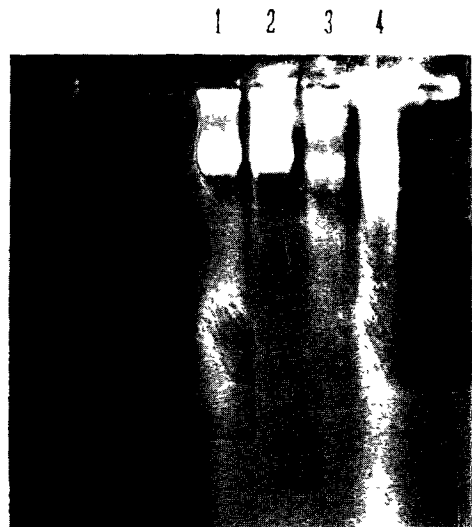


Fig. 2. Electrophoretic Patterns of Protein Bound DNA and Free DNA in Nuclei from C3H/10T1/2 cells

Lane 1. Free DNA without BP treatment

Lane 2. Free DNA with BP treatment

Lane 3: Protein bound DNA without BP treatment

Lane 4. Protein bound DNA with BP treatment

Table 2. Distribution of BP Metabolites in Chromatin Subfractions.

	BP (ng)	DNA (ug)	Protein (ug)	ng BP metabolite/ ug DNA	ng BP metabokite/ ug Protein
DNA-P	5800	29	532	200ng/ug	11ng/ug
DNA-S	400	80	46	5ng/ug	9ng/ug

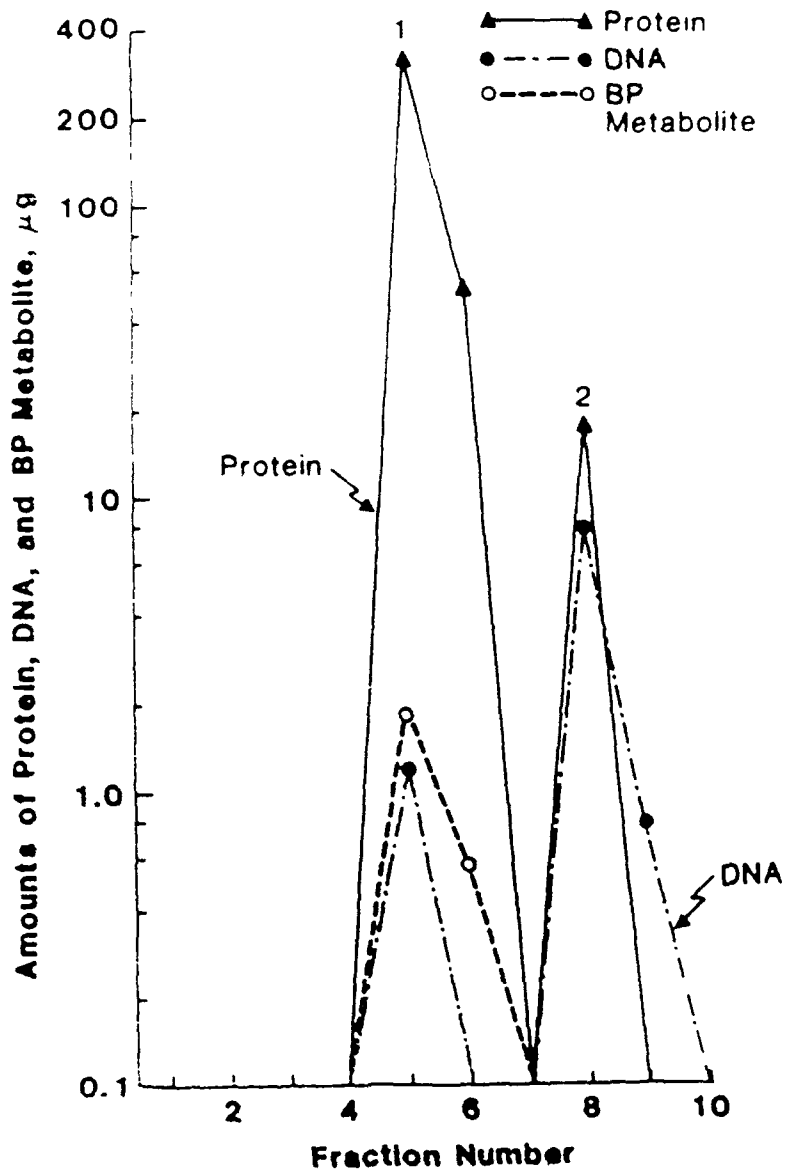


Fig. 3. Dissociation of DNA-P Labeled with BP by Guanidium Chloride.

량하였다. 표 2에서 보는 바와 같이 DNA-P와 DNA-S의 DNA, Protein 및 BP의 양은 각각 $29\mu\text{g}$, $532\mu\text{g}$, $5.8\mu\text{g}$ 과 $80\mu\text{g}$, $46\mu\text{g}$, $0.4\mu\text{g}$ 이었다. DNA-P와 DNA-S에서 BP산물이 DNA μg 당, 200ng 과 5ng 이고, protein μg 당, BP는 거의 같은 양이 존재하나(11ng , 9ng) 실제적으로 protein의 양은 DNA-P에서 훨씬 높았다.

D. 강한 결합의 nonhistone chromosomal protein의 분리

이 실험은 DNA-P 내에 단단히 결합한 NHC protein에서 DNA를 분리하여 BP대사산물의 binding target이 단백질인지, DNA 인지를 보고자 하였다.

DNA-P에서 DNA와 protein을 분리하기 위해 guanidium chloride용액에 DNA-P를 넣고 incubation 한후 CsCl 밀도구배 원침법에 의해 원침하였다.

(실험방법 참고)

그림 3에서 보는 바와 같이 완전하게 단백질, DNA가 분리되지 않고 peak 1에 전체 protein의 약 95%인 $330\mu\text{g}$ 의 protein이 함유되었고, DNA는 전체DNA의 13%인 $1.2\mu\text{g}$ 이 존재했다. peak 2에서는 $8\mu\text{g}$ 의 대부분의 DNA와 protein은 소량($20\mu\text{g}$) 존재하였다.

three-dimensional fluorometer를 사용하여 BP metabolites를 각peak에서 측정했을 때, peak 2에서는 검출되지 않았으나 peak 1에서 검출할 수 있었다. 그래서 DNA-P fraction에서 BP의 여러가지 대사산물이 소수성 결합인지 또는 공유결합인지를 알기 위해 ethyl acetate로 여러번 씻어 측정하였다. 그림 4와 5에서 보는 바와 같이 알고 있는 표준시료의 nonmetabolite 또는 metabolite와 비교 하였을 때 peak 1을 ethyl acetate로 씻기 전에는 대사산물이 복합 형태로 나타나지만 씻은 후에는 benzo(a)pyrene-7,8 diol-9,10 epoxide(BPDE)만이 두개의 excitation 320nm , emission 395nm 와 excitation 400nm , emission 400nm 와

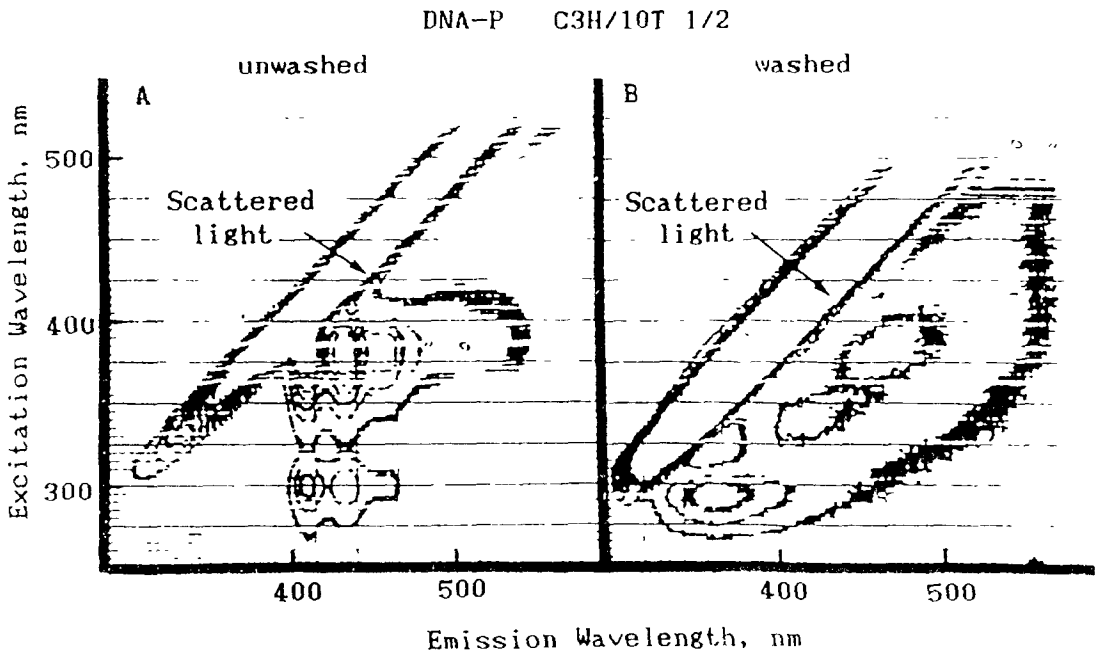


Fig. 4. DNA-P Analyzed by Fluorometry. Unwashed sample(A), Sample repeatedly extracted with ethyl acetate(B).

ssion 470nm의 파장에서 특징적인 강한 형광 스펙트럼을 나타내었다.

E. Labelled BP 처리한 DNA-P fraction의 proteinase K의 digestion

labelled BP를 처리한 세포에서 DNA-P를 분리하여 proteinase K로 digest 시킨 후 4M CsCl 밀도 구배 원침법에 의해 원침시켰다. 그림 6에서 보는 바와 같이 digest 안한 대조군에서는 분획 1번에서 2450cpm을 나타내었고 분획 6에서 1500cpm의 활성도를 보였고 DNA는 6번에서 0.18의 흡광도를 나타내었다. 반면 digest한 시료에서는 1번 분획에서 1800cpm이고 7번 분획에서 600cpm으로 BP의 활성도가 낮아졌으나 DNA 흡광도는 0.27로 많아졌다(그림7).

고 찰

화학적 발암물질의 분자수준에서의 표적소는 DNA, RNA 및 단백질이 대부분인 것으로 알려졌다. 그간의 연구에서 화학적 발암물질은 DNA의 여러 곳에 광범위하게 분포되어 있

으며²⁴⁾, nucleosome에 결합되어 있는 여러 부위에 가서 선택적으로 결합될 수 있으며^{15,19,34)}, 또는 high mobility group(HMG) protein이 함유된 nucleosome에 가서 실질적으로 결합하는 것이라 하였으며¹⁷⁾, genome의 활성부위^{1,22)}, histone^{6,25,32)} 혹은 nonhistone protein에 결합^{32,35)} 한다고 보고되었다. 이와같이 여러 곳에 작용할 것이라는 보고는 있지만 정확한 target이 어디인지 모른다. 암을 유발시키는 여러가지 과정이 있는데 유전자 전이에 의해 chromosome 상의 변화^{4,8)}를 초래하고 세포분열이 일어나야 할 때 가서 분열이 안 일어난다³³⁾던가 mismatch된 DNA를 교정하기 위한 repair enzyme의 활성을 방해하므로 DNA change가 일어나지 않은 결과로 전사과정을 옳게 판독하지 못하므로써 악성종양이 발생할 수 있다.

본 연구에서는 이전에 기술한 2M salt extract에서 histone과 nonhistone을 90% 이상 제거²⁾ 시켰고 chromatin subfraction의 DNA-P와 DNA-S fraction에서 단백질과 DNA의 비율은 DNA-S에서는 0.34배인 반면 DNA-P에

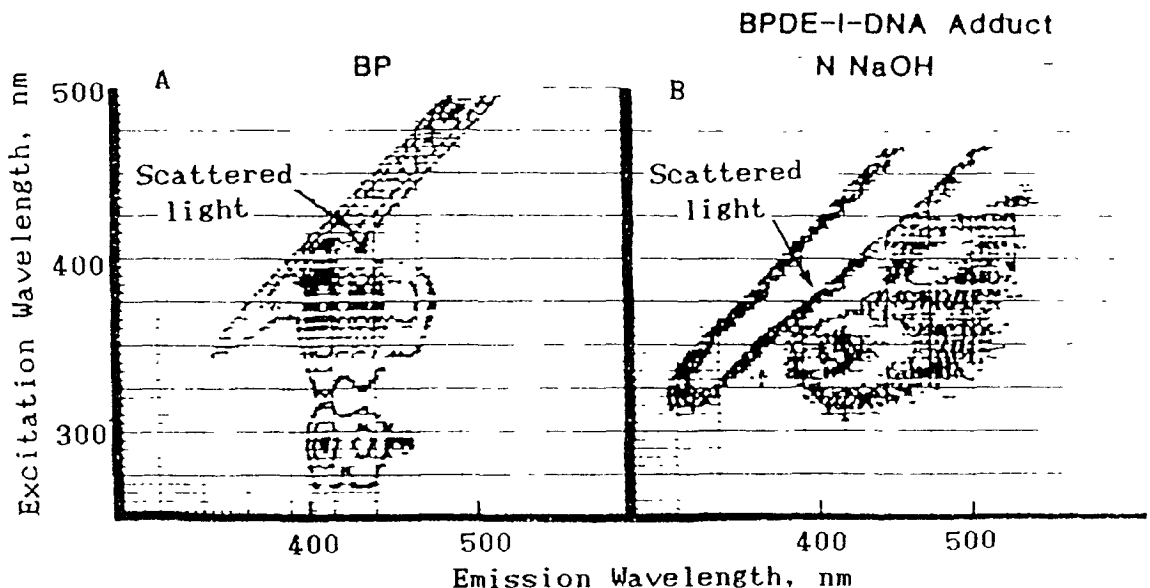


Fig. 5. Fluorometric Tracings of Standards. (A) Mixture of Benzo(a)pyrene and Its Metabolites. (B) Benzo(a)pyrene-7,8-diol-9, 10-epoxide, the covalently linked adduct.

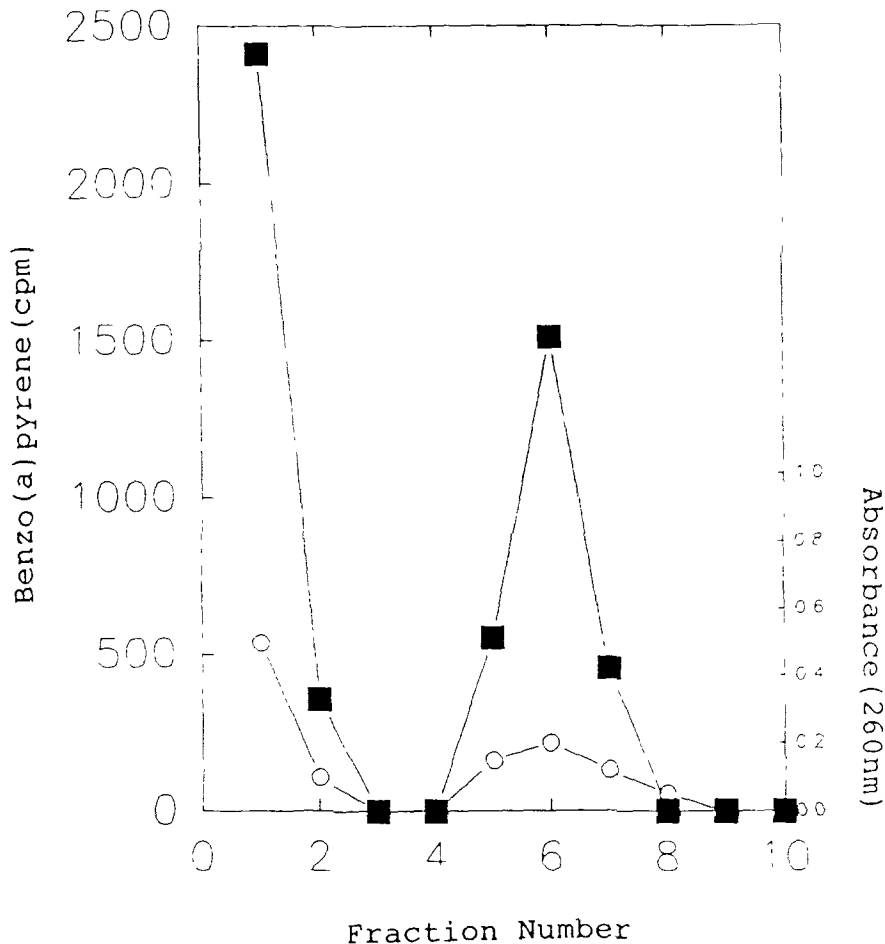


Fig. 6. Nondigest Sample of DNA-P Labelled with Benzo(a)pyrene
 ■ Benzo(a)pyrene, ○ Absorbance(260nm)

는 8~10배로 높았다. 그러나 BP metabolite의 분포를 보면(표2) DNA의 양은 DNA-S(80 μ g)가 DNA-P(29 μ g)보다 많은데도 불구하고 BP metabolites가 DNA-P에 많고(5800ng) 단백질은 DNA-S가 11배나 적다. 이는 BP metabolites가 DNA보다는 단백질에 더 친화성을 가지고, BP metabolites가 DNA보다는 단백질에 결합한다는 것을 암시하고 따라서 DNA-P fraction이 이전의 연구자에 의한 복제²⁴와 전사^{20, 33}과정에 관여하리라 본다. BP에 의한 binding target이 DNA 혹은 단백질인지 측정하기 위해 BP로 배양된 C3H/10T1/2

cell에서 DNA-P를 분리해서 guanidium chloride에 의해 해리된 DNA-P의 CsCl 밀도 구배 원침(그림3)은 peak 1에서 대부분의 단백질(95%)과 peak 2에서는 많은 양의 DNA(86%)가 함유되어있고 BP metabolite는 peak 1에만 존재하였다. BP metabolite를 ethyl acetate로 씻었을 때 BP-diol epoxide가 covalent로 결합한다는 사실을 알았다.

DNA-P에서 단백질을 완전히 분리하기 위해 proteinase K digestion을 하였을 때, 같은 분획에서 BP metabolite 양은 줄어드는데도 불구하고 DNA의 양은 줄어들지 아니하였다.

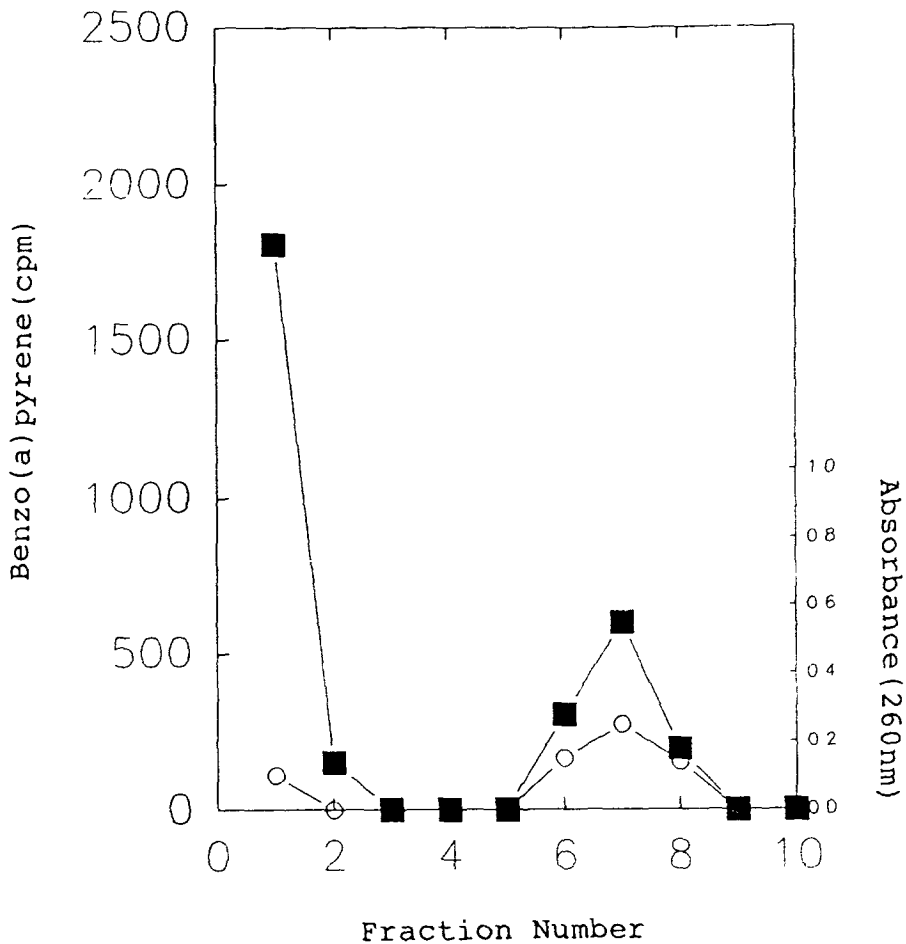


Fig. 7. Proteinase K Digested DNA-P Labelled with Benzo(a) pyrene.
 ■ : Benzo(a)pyrene, ○ : Absorbance(260nm)

오히려 DNA보다는 단백질에 비례한다고 볼 수 있기 때문에 DNA-P의 단백질이 발암물질의 결합 장소라 볼 수 있다. 본 연구에서 chromatin subfraction에서 BP metabolite의 결합은 DNA-P에는 활성적인 전사유전자^{11, 21, 23)}를 풍부히 가지고 있고 NHC protein 이외의 어떤 물질이 유전자를 조절^{3, 31)}할 가능성을 암시해 준다.

따라서 nuclear subfraction에서 분리한 이 분획에 발암물질의 결합이 형질전환을 일으켜 주고 궁극적으로 악성종양으로 이끌게 될 것으로 사료된다.

결론

chromosomal subfraction에서 발암물질의 분포와 결합되어 있는 양상을 측정하기 위해 형질 전환을 일으키기 쉬운 C3H/10T1/2 mouse fibroblast에서 NHC단백질에서 아주 단단히 결합되어 있는 chromatin portion (DNA-P)을 분리하였다.

BP 처리한 세포에서 분리한 chromatin에서, BP 투여군이 대조군에 비해 단백질과 결합된 DNA가 증가했음을 agarose gel 전기영동 상에서 확인했으며 DNA-P fraction이

DNA-S fraction보다 단백질 양이 14배 높은 반면 DNA양은 3배가 적었다. DNA-P fraction을 guanidium choroide와 proteinase K digestion 시켰을 때 BP metabolite의 결합은 DNA 양 보다 단백질 양에 비례하였고, ethyl acetate로 씻었을 때 BP-diol epoxide의 형이 공유결합을 이루고 있었다.

이상의 결과로 보아 BP metabolites가 결합하는데는 DNA보다는 단백질과 더 친화성을 가지며 DNA-P fraction이 유전자의 형질전환에 관여할 것으로 본다.

REFERENCES

1. Arrand JE, Murray AM. Benzopyrene groups bind preferentially to the DNA of active chromatin in human lung cells, *Nucleic Acids Res*, 10 1547. 1982
2. Bekhor I, Mirell CJ. Simple isolation of DNA hydrophobically complexd with presumed gene regulatory proteins (M3). *Biochemistry*, 18 609 1979
3. Bekhor I, Samal B. Nonhistone chromosomal proteins interaction with DNA/ histone complexes, *Arch Biochem Biophys*, 179 537. 1977
4. Botchan M, Stringer J, Mitchison T, Sambrook J. Intergration and excision of SV40 DNA from the chromosome of a transformed cell *Cell*, 20 143 1980
5. Bresnick E, Vaught JB, Chuang AHL, Stroming TA, Bockman E, Mukhtar H. Nuclear aryl hydrocarbon hydroxylase and interaction of polycyclic hydrocarbons with nuclear components. *Arch Biochem Biophys*, 181 257. 1977
6. Brookes P. Covalent interactions of carcinogens with DNA. *Life Sci*, 16 331. 1975
7. Buty SG, Thompson S, Slaga TJ. The role of epidermal aryl hydrocarbon hydroxylase in the covalent binding of polycyclic hydrocarbons to DNA and its relationship to tumor initiation *Biochem Biophys Res Commun*, 70 1102. 1976
8. Cairns J. The origin of human cancers. *Nature(London)*, 289, 353, 1981
9. Chytil F, Spelsberg TC. Tissue differences in antigenic properties of non-histone protein-DNA complexes, *Nature (London)*, *New Biol*, 233 215. 1971
10. Eastman A, Bresnick E. Metabolism and DNA binding of 3-methylcholanthrene. *Cancer Res*, 39 4316. 1979
11. Gates DM, Bekhor I. Distribution of active gene sequences a subset associated with tightly bound chromosomal proteins *Science*, 207 661 1980
12. Gronow M. Nuclear proteins and chemical carcinogenesis, *Chem Biol Interact*, 29 1. 1980
13. Haddow A. Molecular repair, wound healing, and carcinogenesis. tumor production a possible overhealing?, *Adv Cancer Res* 16 181. 1972
14. Huberman E, Sachs L. DNA binding and its relationship to carcinogenesis by different polycyclic hydrocarbons. *Int J Cancer* 19 122. 1976
15. Jahn CL, Litman GW. Distribution of covalently bound benzo(a)pyrene in chromatin, *Biochem Biophys Res Commun* 76 534. 1977
16. Jungmann RA, Schweppe JS. Binding of chemical carcinogens to nuclear proteins of rat liver, *Cancer Res* 33 952 1972
17. Koostra A, Slaga TJ, Olins DE. Inter-

- ction of benzo(a)pyrene diol-epoxide with nuclei and isolated chromatin, *Chem Biol Interac* 28:225, 1979
18. Long BH, Huang CY, Pogo AO: Isolation and characterization of the nuclear matrix in friend erythroleukemia cells: Chromatin and hnRNA interactions in the nuclear matrix. *Cell* 18:1079, 1979
19. Metzger G, Wilhelm FX, Wilhelm ML: Non-random binding of a chemical carcinogen to the DNA in chromatin, *Biochem Biophys Res Commun* 75:703, 1977
20. Miller TE, Huang CY, Pogo AO: Rat liver nuclear skeleton and nonnucleoprotein complexes containing hnRNA, *J Cell Biol* 76:675, 1978
21. Mirell CJ, Bekhor I: The effect of estrogen on the concentration of ovalbumin gene sequence in the 2M NaCl residual fraction of oviduct chromatin, *FEBS Lett* 150:117, 1982
22. Moses HL, Webster RA, Martin GD, Spelsberg TC: Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons to transcriptionally active nuclear subfractions of AKR mouse embryo cells, *Cancer Res* 36:2905, 1976
23. Norman GL, Bekhor I: Enrichment of selected active human gene sequences in the placental deoxyribonucleic acid fraction associated with tightly bound nonhistone chromosomal proteins *Biochemistry* 20:3568, 1981
24. Pardoll DM, Vogelstein B, Coffey DS: A fixed site of DNA replication in eucaryotic cells, *Cell* 19:527, 1980
25. Przzuto JM, Lea MA, Yang CS: Binding of metabolically activated benzo(a)pyrene to DNA and histones of rat liver, lung and regenerating liver. *Life Sci* 22:105, 1978
26. Pumo DE, Wierzbicki R, Chiu JE: chicken reticulocyte nuclear antigen: its identification and relation to transcriptive activity in erythropoietic cells, *Biochemistry* 19:2362, 1980
27. Rackowicz-Sculczynska EM, Horst A: - Non-histone proteins in fractionated chromatin before and after DNase II treatment, *Biochem Biophys Acta* 653:69, 1981
28. Spelsberg TC, Webster R, Pikler G, Thrall C, Weiss D: Role of nuclear protein as high affinity sites(acceptors) for progesterone in the avian oviduct, *J Steroid Biochem* 7:1091, 1982
29. Thomas CR, Wang JC, Liu LF: In Vivo localization of DNA topoisomerase II cleavage sites on drosophila heat shock chromatin.
30. Tierny B, Weayer D, Heintz NH, Schaeffer WI, Bresnick E: The identity of nuclear uptake of a cytosolic binding protein for 3-Methylcholanthrene. *Arch Biochem Biophys* 200:53, 1980
31. Tsai S, Harris SE, Tsai MJ, Malley BW: Effects of estrogen on gene expression in chick oviduct: the role of chromatin proteins in regulating transcription of the ovalbumin gene. *J Bio Chem* 251:4713, 1976
32. Vaught J, Bresnick E: Binding of polycyclic hydrocarbons to nuclear components in vitro *Biochem Biophys Res Commun* 69:587, 1976.
33. Wang TY: The role of nonhistone chromosomal proteins in the interaction of protease chromatin with androgen-receptor complex *Biochim Biophys Acta*

- 518 81. 1978
34. Walker MS, Becker FF, Rodrigues LV In vivo binding of N-2-acetylaminofluorene and its n-hydroxy derivative to the DNA of fractionated rat liver chromatin Chem Biol Interact 27 177. 1979
35. Zytkevicz TH, Moses HL, Spelsberg TC : Covalent binding of benzo(a)pyrene metabolites to DNA, RNA and chromatin proteins in the AKR mouse embryo cell line Chem Biol Interact 35 39 1981
-