

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Nánási Péter

**A kromatin doxorubicin által előidézett globális változásai
és topológiai heterogenitása**

**DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2021.

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A kromatin doxorubicin által előidézett globális változásai és topológiai heterogenitása

Dr. Nánási Péter

Témavezető: Prof. Dr. Szabó Gábor



**DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2021.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	6
1. Bevezetés és irodalmi áttekintés	9
1.1. Az antraciklinek kemoterápiás jelentősége	9
1.2. Az antraciklinek mellékhatásai	10
1.3. Az antraciklinek hatásmechanizmusa és a DNS szuperhelicitása.....	12
1.4. Antraciklinek sejtmagi kölcsönhatásai.....	16
1.4.1. Interkaláció a DNS kettős spirálba	16
1.4.2. Addukt képzés	17
1.4.3. Hisztonokhoz való kötődés.....	18
1.4.4. Az interkaláció okozta nukleoszóma destabilizáció.....	19
1.4.5. Az antraciklin interkaláció és a következtében kialakuló nukleoszóma destabilizáció összefüggése a DNS topológiájával	20
1.4.6. A szuperhelicitás-függő antraciklin interkaláció kapcsolata TopII eredetű endogén DNS-törésekkel	21
1.4.7. Antraciklin okozta kromatin aggregáció	24
1.5. A H1, H2A és H2B hisztonok nukleo-citoplazmatikus transzportja	25
1.6. Extranukleáris és extracelluláris hisztonok	28
2. Célkitűzések	31
3. Eredmények	33
3.1. A Dox kromatinra gyakorolt hatásának vizsgálatai	33
3.1.1. Dox hatására megjelenő, kiterjedt H2A hiszton aggregáció a sejtmagon belül	33
3.1.2. A Dox hatása H2A és H2B hiszton mobilitására minimális	36
3.1.3. A H2B hiszton nukleo-citoplazmatikus transzlokációja	38
3.1.3.1. A Dox kezelés az endogén H2B hisztonok masszív nukleo-citoplazmatikus transzlokációját okozza Jurkat sejteken.....	38
3.1.3.2. A különböző gátlószerek eltérő mértékben hatnak a H2B nukleo-citoplazmatikus transzlokációjára.....	40
3.1.3.3. A Dox kezelés az endogén H2B hisztonok masszív nukleo-citoplazmatikus transzlokációját okozta hPBMC sejtekben.....	43
3.1.3.4. A Dox és PYR-41 együttes kezelés hatása monocita eredetű dendritikus sejtek (DC) citoplazmatikus H2B szintjének csökkenését okozza	45
3.1.3.5. GFP-vel jelölt H2B hiszton nem mutat Dox függő nukleo-citoplazmatikus transzlokációt.....	46

3.1.3.6. A Dox által indukált H2B nukleo-citoplazmatikus transzlokációjának megerősítése tömegspektrometriás módszerrel.....	47
3.1.4. Dox kezelés hatása a Jurkat sejtek életképességére	50
3.2. A Dox kromatinra gyakorolt hatásának vizsgálatai	52
3.2.1. DNS szálfolytonosság-hiányok detektálása DNS combing technika alkalmazásával ..52	
3.2.1.1. A DNS molekula törékenysége megnő az egyszál folytonosság-hiányok következtében DNS combing kísérletek során.....	52
3.2.1.2. 3' OH csoportot tartalmazó DNS egyszál folytonosság-hiányok enzimatikus jelölése élesztő XII. kromozómán.....	53
3.2.1.3. DNS szálfolytonosság-hiányok jelölhetőek terminális transzferázzal	57
3.2.1.4. A hPBMC sejtekből származó DNS-en detektált szálfolytonosság-hiányok TopII eredetűek.....	59
3.2.2. DNS szálfolytonosság-hiányok halmozódnak az aktív gének promoterein	60
3.2.3. A DNS szálfolytonosság-hiányok kolokalizálnak az iniciáló és elongáló RNS polimerázzal: szuperrezolúciós mikroszkópiával végzett vizsgálatok	63
3.2.4. A DNS szálfolytonosság-hiányok a nukleáris laminához közel detektálhatók halo preparátumon	66
3.2.5. Az interkaláció következtében megváltozik a szuperhelikális DNS-t tartalmazó halo mérete	67
4. Diskusszió.....	69
4.1.1. Hiszton aggregáció	69
4.1.2. Nukleo-citoplazmatikus transzlokáció	70
4.1.3. A Dox kezelés hatása a sejtek életképességére és az észlelt jelenségek potenciális élettani jelentősége	74
4.2.1. A relaxált kromatin környezet hatása a DNS interkalációra	75
4.2.2. DNS egyszál szálfolytonosság-hiányok specifikusan jelölhetők és vizualizálhatók molekuláris combing rendszeren.....	76
4.2.3. A TopII asszociált promoter-proximális egyszál folytonosság-hiányok lehetséges szerepe a kromatin hurokméret kialakításában és a transzkripció szabályozásában.....	78
4.2.4. A genomi DNS topológiai dichotómiája	79
5. Anyagok és Módszerek.....	81
5.1. Sejttenyésztés	81
5.2. hPBMC és monocita eredetű DC sejttenyészetek	81
5.3. Élő sejtek alacsony olvadáspontú agarózba (LMP) történő beágyazása.....	82
5.4. Minták készítése tömegspektrometriás kísérletekhez	82

5.5. LC-MS analízis	83
5.6. Tömegspektrometriás adatok analízise	83
5.7. Sejtek kezelése	84
5.8. Sejtmag preparátumok készítése	84
5.9. Immunofluoreszcenciás jelölés	85
5.10. Konfokális mikroszkópia	86
5.11. Automata pásztázó lézer mikroszkóp (LSC).....	86
5.12. Életképesség vizsgálat.....	87
5.13. Élesztő tenyésztése és szinkronizációja G ₁ fázisban.....	87
5.14. Agaróz blokkok készítése élesztő és hPBMC sejtekből, DNS izolálás	87
5.15. A <i>S. cerevisiae</i> XII. kromoszóma preparátum készítése	88
5.16. DNS szálfolytonosság-hiányok enzimátikus jelölése <i>E. coli</i> DNS Polimeráz I enzimmel	88
5.17. DNS szálfolytonosság-hiányok jelölése Terminális Transzferázzal (TdT)	89
5.18. Kombinált RNáz kezelés (RNáz A, HI, H2)	89
5.19. DNS combing.....	89
5.20. DNS interkalátor relaxációs koncentrációjának meghatározása halo tekerési kísérleti rendszerben.....	91
5.21. Dox és Dox + PYR-41 együttes jelenlétének hatása fluoreszcensen jelölt, rekombináns hisztonok mobilitására FCS módszerrel.....	92
5.22. STED (Stimulált Emisszió Depléció) mikroszkópia, dekonvolúció és kolokalizáció számolás	93
5.23. DNS immunoprecipitáció-szekvenálás (DIP-seq) és DIP-qPCR kísérletek	93
5.24. DIP-seq kísérletek analízise	94
6. Összefoglalás.....	96
6.1. Összefoglalás.....	96
6.2. Summary	98
7. Tárgyszavak.....	99
8. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	99
9. Köszönetnyilvánítás	103
10. Irodalomjegyzék.....	104
11. Függelék	118

Rövidítések jegyzéke

A488	Alexa Fluor 488
A647	Alexa Fluor 647
AMD	aktinomicin-D
ATM	ataxia telangiectasia mutált protein kináz
ATP	adenozin trifoszfát
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility fehérje
BSA	Marha szérum albumin (Bovine serum albumin)
bTDP2	biotinilált TDP2
CHEF	homogén elektromos mezős elektroforézis (Contour-clamped homogeneous electric field)
CHX	Cikloheximid
CRM1	chromosomal maintenance 1 fehérje
CTCF	CCCTC-kötő faktor
CTD	C-terminális domén (C-terminal domain)
Dau	daunorubicin
DC	dendritikus sejt (Dendritic cell)
ddNTP	dideoxi-nukleotid trifoszfátok
DIP-seq	DNS Immuno-precipitáció - szekvenálás
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA-PK	DNS protein kináz
dNTP	deoxi-nukleotid trifoszfátok
Dox	doxorubicin
DTT	Dithiotreitol
DUB	deubiquitináció
dUTP	Deoxiuridin-5'-trifoszfát
EBr	etídium bromid
EDTA	etilén diamin tetraacetát
EGTA	etilén-glikol-tetraacetsav (egtazin sav)
FBS	magzati marhaszérum (Fetal bovine serum)
FCS	fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (Fluorescence correlation spectroscopy)
FITC	fluoreszcein izotiocianát
FPKM	Fragments Per Kilobase Million (Fragmentek száma millió kilobázisonként)
FRAP	fluoreszcencia helyreállítás fotokioltság után (Fluorescence recovery after photobleaching)
gDNS	genomi DNS
GFP	zöld fluoreszkáló fehérje (Green fluorescent protein)
gH2A.X	gamma foszforilált H2A.X

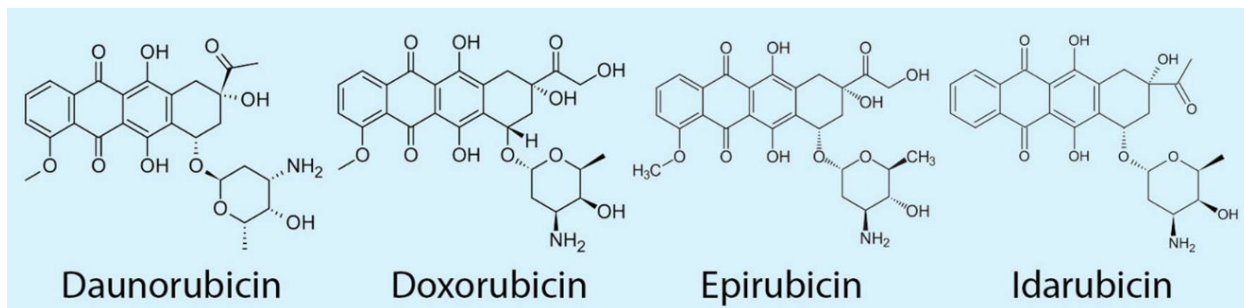
GM-CSF	granulocita-monocita kolónia stimuláló faktor
H3K27ac	H3 hiszton 27 lizin trimetilációja
H3K4me3	H3 hiszton K4 lizin trimetilációja
HMG1	high mobility group 1 fehérje
hPBMC	humán perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek
HPLC	magasnyomású folyadékkromatográfia (High pressure liquid chromatography)
kb	kilobázis
LC-MS	folyadékkromatográfia-tömegspektrometria
LepB	leptomycin B
LFQ	jelölésmentes kvantifikáció (Label-free quantification)
Lk	linking number
LMP agaróz	alacsony olvadáspontú agaróz (Low melting point)
LPS	lipopoliszacharid
LSC	pásztázó lézer mikroszkóp (Laser Scanning Microscope)
MES	2-(N-morpholino) etánszulfon sav
MLL	kevertsejtes leukémia (Mixed lineage leukemia)
MS	Tömegspektrometria (Mass spectrometry)
NaCl	nátrium klorid
Nap1	nukleosóma összeszerelő fehérje 1 (Nucleosome assembly protein 1)
NGS	újgenerációs szekvenálás (Next generation sequencing)
NLS	nukleáris lokalizációs szignál
NTF2	nukleáris transzport faktor 2
NXF1	nukleáris RNS export faktor 1
OD	optikai denzitás
PARP1	poli-ADP ribozil transzferáz 1
PBS	foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldat (Phosphate buffered saline)
PI	propidium jodid
PMSF	fenilmetilszulfonil-fluorid
Pol I	<i>E. coli</i> DNS polimeráz 1
Puro	puromycin
qPCR	kvantitatív polimeráz lánreakció (quantitative polymerase chain reaction)
RFP	vörös fluoreszkáló fehérje (Red fluorescent protein)
RNS-seq	RNS immunoprecipitáció-szekvenálás
SDS	nátrium dodecil szulfát (Sodium dodecyl sulphate)
SEM	középérték közepes hibája (Standard Error of the Mean)
STED	stimulált emisszió-depléción
SUMO	kis ubiquitin-szerű módosító fehérje (Small ubiquitin-like modifier)
SV40	simian vírus 40

TBE	tris-borát-EDTA
TDP2	tirozil-DNS foszfodiészteráz
TdT	terminális deoxinukleotidil transzferáz
TE	tris-EDTA
TES	transzkripció végének helye (Transcription end site)
TNF	tumor nekrozis faktor
TopI	topoizomeráz I
TopII	topoizomeráz II
TopIIcc	topoizomeráz II cleavage complex
TSS	transzkripciós start hely (Transcription start site)
Tw	twist (tekercs)
Wr	writhe (haránt tekercs)
XPO1	exportin 1
YPD	élesztő-pepton-dextróz

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1. Az antraciklinek kemoterápiás jelentősége

Az antraciklinek a kemoterápiás szerek egyik jelentős csoportját képezik, a mai napig széles körben használják őket a tumorelles terápiaiban (1. ábra). A csoport első tagját a daunorubicint (Dau) 1939-ben fedezték fel, majd az 1950-es években a *Streptomyces purpurascens* nevű gombából sikeresen izoláltak. 1960 óta alkalmazzák rák ellenes terápiaiban, bár eleinte kis hatékonysággal tudták használni jelentős toxicitása miatt [1]. Később egy újabb antraciklint izoláltak a *S. peucetius var. caesius* nevű gombából, mely a Dau-hoz nagyon hasonló szerkezettel rendelkezik, mindössze egy OH csoportban különbözik tőle, mely a 14. szénatomon található. Ezt adriamycinnek nevezték el, és később a doxorubicin (Dox) generikus nevet kapta. A toxicitása a Dau-hoz képest kisebb, így sikeresebben tudták terápiaiban célokra felhasználni. A Dau-t elsősorban leukémiák és limfómák, a Dox-ot többnyire szolid tumorok kezelésére használják [1].



1. ábra. Az orvosi gyakorlatban használt 4 leggyakoribb antraciklin kémiai szerkezete [2].

A gyógyszer család további két tagja az epirubicin és az idarubicin szintetikus molekulák, melyeket szintén az egész világon széles körben használnak, és a Dau-hoz hasonló kémiai szerkezettel rendelkeznek. Az epirubicinnek a Dox-hoz hasonló a terápia spektruma, de kevésbé kardiotoxikus [3], így mell-, petefészek-, gyomor-, tüdőrák és különböző limfómák kezelésére használják. Az idarubicin a Dau-nál lipofílebb tulajdonságú molekula, és jobb biológiai hasznosíthatósága révén *per os* bevitelre is alkalmas [3]. Ez az egyetlen, terápiaiban használatos antraciklin, mely átmegy a vér-agy gáton.

A Dox a legszélesebb körben alkalmazott antraciklin gyógyszer, melyet önmagában vagy más kemoterápiás szerekkel kombinációban is használnak, így csökkentve a toxicitást és növelve

a terápiás hatékonyságot. A Dox beadása általában intravénás injekció formájában történik, mivel szájon át adva alacsony a biológiai hasznosíthatósága. A vérplazmában hosszú felezési idővel rendelkezik (>24h) [1]. Bevitel után a szervezet vizeitereiben gyorsan megoszlik, a csontvelőben, májban, lépben és tüdőben halmozódik fel. Többnyire (60%-ban) epén keresztül metabolizálódik, illetve 20%-ban a vizelettel távozik a szervezetből.

A Dox jelenleg a szolid tumorok közül a mell-, petefészek-, hólyagrák, Kaposi szarkóma, kissejtes tüdőrák és mielóma multiplex terápiás protokolljában található meg (<https://www.drugs.com/monograph/doxorubicin-hydrochloride.html>). Dox-ot használnak még gyomor-, pajzsmirigy- és különböző limfómák (Hodgkin és non-Hodgkin), leukémiák (pl. akut limfoblasztos leukémia, akut myeloid leukemia) kezelésére. Jelenleg a mellrákos betegek 32%-át, a krónikus limfoid leukémiás betegek 57-70%-át és a gyermekkori leukémiák 50-60%-át kezelik antraciklinekkel [4]. Intenzív kutatások folynak azzal a céllal, hogy a gyógyszert pontosabban célba lehessen juttatni, így csökkentve a dózist, és következésképpen a toxicitást. Újabban előtérbe került a pegylált (polietilén glikol) liposzómákba csomagolt Dox alkalmazása, melyet petefészekrák esetében már sikeresen alkalmaznak [5]. Antitesthez, illetve egyéb fehérjékhez konjugált Dox segítségével még pontosabb célba juttatás lenne elérhető, így növelve a specificitást. Jelenleg ezek a kísérletek még sejtvonalakon folynak [6]. Az antraciklinek egyéb, nem tumor ellenes hatása is dokumentált. Dox-hoz konjugált burokfehérje ellenes antitest segítségével HIV-1 vírus fertőzést sikeresen meggyógyítottak egérben [7]. Legújabban az antraciklinek antimaláriás hatását is leírták [8].

1.2. Az antraciklinek mellékhatásai

Az antraciklinek – a többi citosztatikumhoz hasonlóan – számos mellékhatással rendelkeznek és legerősebben a gyorsan osztódó sejtekre fejtik ki a hatásukat. A citosztatikumokra jellemző aspecifikus mellékhatások közül gyakran előfordul a fáradékonyság, fejfájás, hányinger, hányás, illetve a szőrtüszőben lévő sejtek osztódásának gátlása következtében fellépő hajhullás. A bélhámsejtek is igen gyorsan osztódó sejtek, így az antraciklinek adása hasmenést is okozhat, továbbá a megnövekedett sejtpusztulás miatt felléphet láz is. A csontvelői vérképző őssejtek osztódásának gátlása mieloszuppressziót okoz, melynek tünete a vérképzés csökkenése miatt kialakuló anémia, a trombocitopénia révén fellépő vérzés, illetve a fehérvérsejtek számának

csökkenése következtében megnövekszik a fogékonyság a fertőzésekre. A mieloszuppresszió citokinek adásával részben ellensúlyozható [9, 10].

Az eddig felsoroltakon túl számos antraciklin-specifikus mellékhatás is ismert, melyek erősen korlátozzák a kemoterápia alkalmazhatóságát. Az antraciklinek sok esetben okoznak szekunder malignus megbetegedéseket, azaz a primer tumoros betegség gyógyulása után kialakulhatnak különböző leukémiák (például gyakori a szekunder akut mieloid leukémia vagy egyéb terápiára refrakter leukémia), valamint a prekancerózisnak tekinthető mielodiszpláziás szindróma [11]. Ezek közül az MLL gén (mixed lineage leukémia) szekunder leukémiákban kimutatott transzlokációjának hátterében az antraciklinek TopII enzimgátló hatása áll [2]. A Dox szabadgyök képzés révén a májsejtek károsodását okozza, mely E-vitamin és egyéb szabadgyökfogó gyógyszer együttes adásával csökkenthető [12]. Fontos megemlíteni az extravazációs nekrozis [13] nevű jelenséget, mely akkor lép fel, amikor az intravénás injekció formájában beadott Dox a vénából a szövetközi térbe kikerül és ennek következtében kiterjedt szövetkárosodást okoz.

Az antraciklinek legfontosabb és legveszélyesebb specifikus mellékhatását a szívizom sejteire fejtik ki, kardiomiopátiát okoznak, melynek prognózisa rossz és hosszú távon vértolulósos szívelégtelenséghez és 50%-ban halálhoz vezethet [14]. Kialakulása dózis-függő és kumulatív jellegű, azaz a beteg életében beadott összes antraciklin mennyiségétől függ. A szérum Troponin [15] szintjének emelkedésével és szívultrahanggal detektálható a korai szakaszban. A Dox okozta kardiomiopátia létrejötte összefüggésben áll az életkorral, illetve a kórelőzményben található korábbi szívbetegségekkel is. Kialakulásának oka feltételezhetően az, hogy az antraciklinek kimutathatóan felhalmozódnak a szívizomsejtek mitokondriumaiban, és kölcsönhatásba lépnek a mitokondriumokban található kardiolipinnel [9], továbbá a szívizomsejtek mitokondriumában található TopII β -t is gátolják [16]. Szabadgyök képzésük következtében lipid peroxidációt okozva járulnak hozzá a kardiotoxicitás kialakulásához. Ilyenkor jellemző foltos intersticiális fibrózis mutatható ki szövettani metszeteken, mely egy gyógyult szívizomgyulladásra hasonlít. A fibrózis környezetében elszórtan vakuolákat tartalmazó kardiomiociták (ún. Adria sejtek) láthatók [14]. Ezen sejtek sejtmag szerkezete is megváltozik, elektron-mikroszkóppal a magon belül filamentáris szerkezetek és kromatin aggregáció figyelhető meg [17-19] mely eltérések feltűnően hasonlóak az általunk megfigyelt kromatin-szerkezeti változásokhoz. A klinikai gyakorlatban bevezettek egy

ajánlott maximális kumulatív dózist [15], mely a kardiotoxicitást hivatott megelőzni, de ez nagymértékben limitálja az antraciklin terápia alkalmazhatóságát. A kardiotoxicitás jelenleg nem gyógyítható, de intenzív kutatások folynak olyan kardioprotektív gyógyszerek irányában, melyek Dox-szal együtt adva kivédhetik a kialakulását. A Dextrazoxane egy olyan szintén TopII β -t gátló gyógyszer [13, 20], ami Dox-szal együtt adva kardioprotektív hatást fejt ki, s így 2017 óta a klinikumban is alkalmazzák.

A Dox alkalmazhatóságát csökkenti a multidrog rezisztencia jelensége. A tumorsejtek membránján megnövekedett számban jelennek meg különböző ABC transzporterek (P-glikoprotein, multidrog resistance protein 1), melyek a tumoros sejtekből ATP függő módon kipumpálják az antraciklineket [21, 22]. Intenzív kutatások folynak – többek közt a mi laboratóriumunkban is - abból a célból, hogy az antraciklin kemoterápiát kiegészítsék ABC transzportereket gátló gyógyszerekkel is [22]. A Dox pontos hatásmechanizmusának megértése elősegítheti a terápiát nagy mértékben limitáló mellékhatások kiküszöbölését.

1.3. Az antraciklinek hatásmechanizmusa és a DNS szuperhelicitása

Az antraciklinek pleiotróp gyógyszerek, több támadásponton fejtik ki a hatásukat. Legismertebb hatásuk a Topoizomeráz II (TopII) enzimek gátlása, mely enzim a DNS szuperhelicitásának szabályozásában vesz részt. A Dox komplex hatásainak megértéséhez röviden tárgyalni kell a DNS topológiai tulajdonságait.

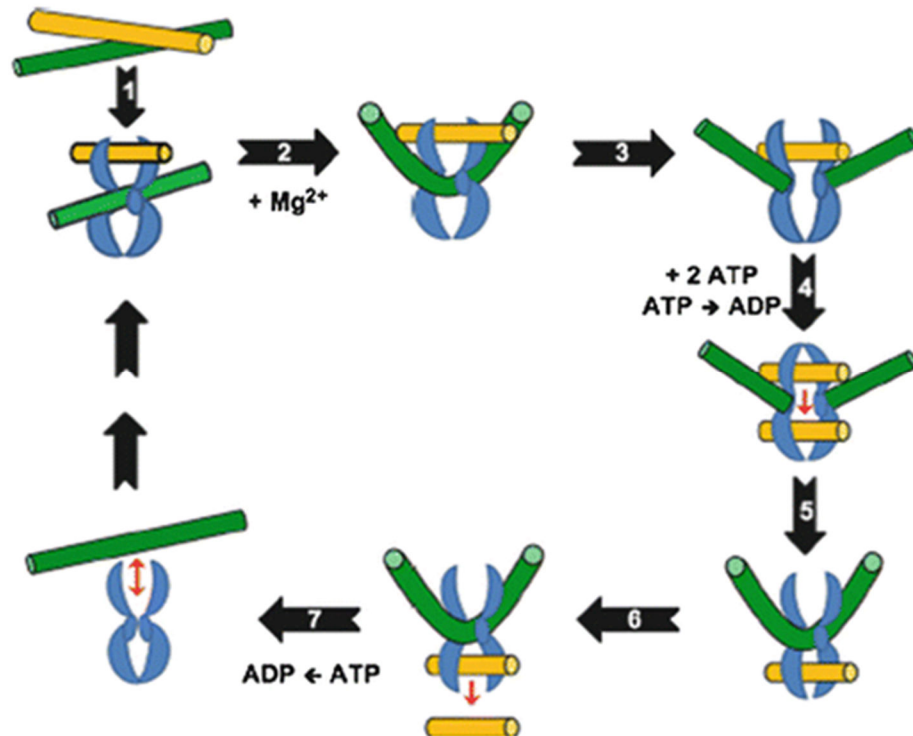
A relaxált B-DNS kettős hélix szerkezete úgy épül fel, hogy a DNS molekula 10.4-10.5 bázispáronként tekeredik meg a saját tengelye körül [23]. Ha a szálaban lévő torziós feszülés megváltozik, a DNS túl- vagy alultekertté válik. Amennyiben az egyik DNS szál csavarodása változik meg a másik szál körül, akkor a *twist* (Tw), ha pedig a kettős hélix tengelyének a csavarodása változik meg a térben, akkor a *writhe* (Wr) változásáról beszélünk. A *twist* és *writhe* összege a linking number (Lk), mely megadja, hogy a DNS egyik szála összesen hányszor keresztezte a másikat [24, 25]. Egy rögzített végekkel rendelkező vagy cirkuláris DNS esetén az Lk mindig ugyanannyi, vagyis ha a molekulán belül a Tw csökken, akkor ezzel egy időben a Wr megnő és fordítva [26].

Az eukarióta DNS nukleoszómális formában van jelen a sejtmagban, a DNS a hiszton oktamerre 1.7 fordulattal csavarodik fel [27]. A nukleoszómára történő feltekeredés során a T_w enyhén pozitív, a W_r kifejezetten negatív lesz (constrained, a nukleoszóma-DNS kötődés által fenntartott szuperhelicitás). Ha a hisztonok ledisszociálnak, a DNS molekulában a T_w és W_r újrendeződése következik be, melynek eredményeképpen a T_w negatív értéket vesz fel, alultekertté válik. Hasonlóképpen, a T_w lokális megváltozása kedvez a nukleoszóma destabilizációjának.

A DNS tekerttségét különböző sejtmagi folyamatok megváltoztathatják. Így a DNS replikáció, transzkripció, rekombináció, DNS hibajavítás és kromatin átrendeződés során helyben megváltozik a DNS tekerttsége. A replikáció során a DNS polimeráz, transzkripció során pedig az RNS polimeráz denaturálja a DNS-t és a szálon 3' irányban növeli a DNS rotációját, azaz túltekerttséget, 5' irányban pedig csökkenti azt, tehát alultekerttséget okoz. A felgyülemlett topológiai változások visszahatva gátolják ezeket a folyamatokat [28, 29], ezért mind a transzkripciót, mind a replikációt topoizomeráz enzimek aktivitása kíséri (twin supercoil model) [30-32]. Az eukarióta és a prokarióta DNS is összességében alultekert állapotban van [33], ez esetben a DNS szálainak szétválása könnyebben, kisebb energia befektetésével megtörténik a relaxált DNS-hez képest. Tehát az alultekerttség jelenléte elősegíti a transzkripciót prokariótákban [34, 35] és eukariótákban egyaránt [36-39], de az elongációs lépést gátolja [40].

Ahhoz, hogy ezek a létfontosságú sejtmagi folyamatok zavartalanul működjenek, a felhalmozódó túl- és alultekerttség megszüntetésére van szükség. A sejtmagi folyamatok során kialakuló topológiai változásokat a topoizomerázok relaxálják. Száلتöréseket létrehozva a DNS szabadon foroghat a saját tengelye körül, így a túl- illetve alultekerttség megszűnik, a DNS relaxálódik, mely folyamat a törések ligálásával zárul [41, 42]. A topoizomerázoknak 2 fő csoportja ismert, melyek a sejtmag topológiai viszonyait módosítják. A TopI egy monomer, ATP-t nem igénylő enzim. Miután a DNS-hez kapcsolódott, az egyik szálon törést hoz létre, a másik szál épen marad és az ép szál tengelye mentén a DNS szabadon foroghat, így a felhalmozódott túl- vagy alultekerttség spontán relaxálódik, végül a TopI megszünteti a folytonossághiányt és ledisszociál a DNS-ről. A TopII enzim hasonló módon működik, de a TopI-gyel ellentétben homodimer szerkezetű és ATP hidrolízisét is igényli [43-45]. A TopII enzimek bár képesek duplaszál törést létrehozni, egyszál törést is okozhatnak [46-48]. A TopII katalitikus ciklusa első lépésében kötődik a DNS-hez, amit az ATP hidrolízise követ, mely konformáció-változást okoz

és a DNS molekula egyik vagy mindkét szálának hasítását eredményezi. A következő lépés az inorganikus foszfát disszociációja és a DNS szál átbújtatása, melyet a száltörés megszüntetése, az ADP disszociációja és az enzim DNS-ről történő leválása követ [49] (2. ábra).



2. ábra. A TopII enzim katalitikus ciklusa. A TopII enzim az ábrán kék színnel van jelölve, zöld ill. sárga szín jelöli a DNS kettős hélix két szálát, melyeken a dekaténációs folyamat végbemegy [50].

Mivel a TopII típusú topoizomerázok dimer szerkezetű enzimek, ezért valószínűsíthető, hogy a dimer tagjai egymástól függetlenül is működhetnek. Így, ha csak a dimer egyik tagja lép működésbe, akkor egyszál törés, ha mindkét tagja, akkor pedig duplaszál törés keletkezik [51]. Ez utóbbi működésmód biológiai értelme a dekaténáció, amikor a keletkezett duplaszál törésen keresztül át tud engedni egy másik DNS szálát, így megszüntetve a DNS molekulán például a replikáció során keletkezett csomókat. A TopII-nek két izoformája létezik, a főként osztódó sejtekben expresszálandó TopII α , mely főleg a dekaténációban, a kromoszómák kondenzációjában és a kromatidák szeparációjában vesz részt, és a TopII β , mely a transzkripció során fellépő túl- és alultekertiséget relaxálja. A TopI [52] és a TopII [53] negatívan és pozitívan superhelikális DNS-

t is képesek relaxálni, de a TopII dekatenciós funkciója túl- és alultekert DNS esetében eltérő hatékonyságú [54].

A Dox TopII enzimgátlás következtében létrejövő hatására több kísérletes bizonyíték is létezik. A TopII β gén csendesítése sikeresen kivédte a Dox kardiotoxicitását egér állatmodellben [55], továbbá hasonló eredményeket kaptak, amikor más TopII enzimgátlókat adtak együtt Dox-szal [56], továbbá kimutatták, hogy a TopII β megtalálható a szívizomsejtek mitokondriumaiban is [16, 55, 57]. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a TopII β gátlása felelős a kardiális mellékhatások egy részéért.

A Dox TopII független hatását részben a reaktív oxigén intermedierek szintjének emelésén át fejt ki, fokozva az oxidatív stresszt [58]. Az antraciklinek kinon csoportja különböző oxidoreduktív enzimek (pl. cytochrome P450 reduktáz, NADH dehidrogenáz, xantin oxidáz) jelenlétében redox reakciókon mehet keresztül, mely szemikinin és szabadgyökök képződéséhez vezet. Utóbbiak reakcióba lépnek az oxigénnel, további reaktív molekulákat eredményezve. A keletkező szuperoxidok, peroxidok és hidroxil gyökök erősen toxikusak a sejtek számára [59], lipid peroxidációt váltanak ki, továbbá a DNS bázisaival reakcióba lépve DNS hibákat okoznak, mely folyamatok a sejtosztódás leállításához, majd apoptózishoz vezetnek. Ráadásul az antraciklinek vassal komplexet képeznek, így további redox reakciókon keresztül is növelhetik az oxidatív stresszt [9]. A megnövekedett koncentrációjú szabadgyökök a Ca²⁺ szint emelkedését váltják ki a citoplazmában, ami a kontraktilitás diszregulációját és a mitokondriális toxicitás növelését okozza, így hosszútávon szívelégtelenség kialakulásához vezet [59, 60].

A Dox a szabadgyök képzésén, illetve az oxidatív stressz emelésén túl növeli a sejten belüli ceramid szintet is [61-64]. A ceramid egy lipid molekula, mely szfingozinból és zsírsavból áll, több sejt folyamatban is fontos szerepet játszik (a kiváltott jelenségek lehetnek például apoptózis, szenescencia vagy növekedés leállás). Kimutatták, hogy a ceramid lebontásában résztvevő glükoszilceramid szintetáz enzim szintjének emelésével a sejtek Dox rezisztenciája nő, míg az enzim szintjének csökkentésével a Dox okozta sejthalál valószínűsége emelkedett meg [65]. A Dox nemcsak a ceramid szintézis növelése révén gátolja a rákos sejtek osztódását, hanem elősegíti a CREB3L1 membrán-kötött fehérje részleges proteolízisét is, ennek következtében ez a transzkripciós faktor a membránból szabaddá válva a sejtmagba jut, ott olyan gének átíródását indítja el (pl. a p21 fehérjét kódoló CDKN1A gén), mely a sejtciklus leállítását eredményezi [66].

Mindezeken túl, a Dox interferál az autofágia folyamatával is. Egyrészt autofágiát indukál [67], másrészt a lizoszómális savasodás gátlása következtében [68], valamint több különböző jelátviteli útvonallal interferálva [69] megzavarja annak szabályozását. Mivel az autofágia folyamata a sejt homeosztázisának fenntartásához elengedhetetlen, így a folyamatok megzavarása a kardiotoxicitáshoz nagymértékben hozzájárulhat.

A Dox a fent részletezett hatásmechanizmusokon túl hatást fejt ki a citoszkeletonra is, kimutatták, hogy a citoplazmában a fibrilláris aktin szálak szerveződésére is hatással van, mely együtt jár a sejtmagban az aktin fehérje megjelenésével [70].

1.4. Antraciklinek sejtmagi kölcsönhatásai

1.4.1. Interkaláció a DNS kettős spirálba

A Dox tulajdonságai közé tartozik az is, hogy a megfigyelések szerint a sejtmagban dúsul, 50-szer magasabb koncentrációt érhet el, mint a citoplazmában. A telítést 340 μM -os koncentrációban éri el, becslések szerint ez minden 5. bázispár közé egy interkalálódott Dox molekulát jelent [71-73]. A Dox és a többi antraciklin a kis árok felől ékelődik be a bázisok közé [74]. Az interkaláció hatékonysága függ a DNS szuperhelicitásától [75], ami magyarázatot ad az antraciklinek linker DNS kötési preferenciájára [76, 77]. Az antraciklinek interkalációja során GC bázispár preferenciát mutatnak [78, 79], így a citogenetikában a kromoszómák Q sávozására is használták [80].

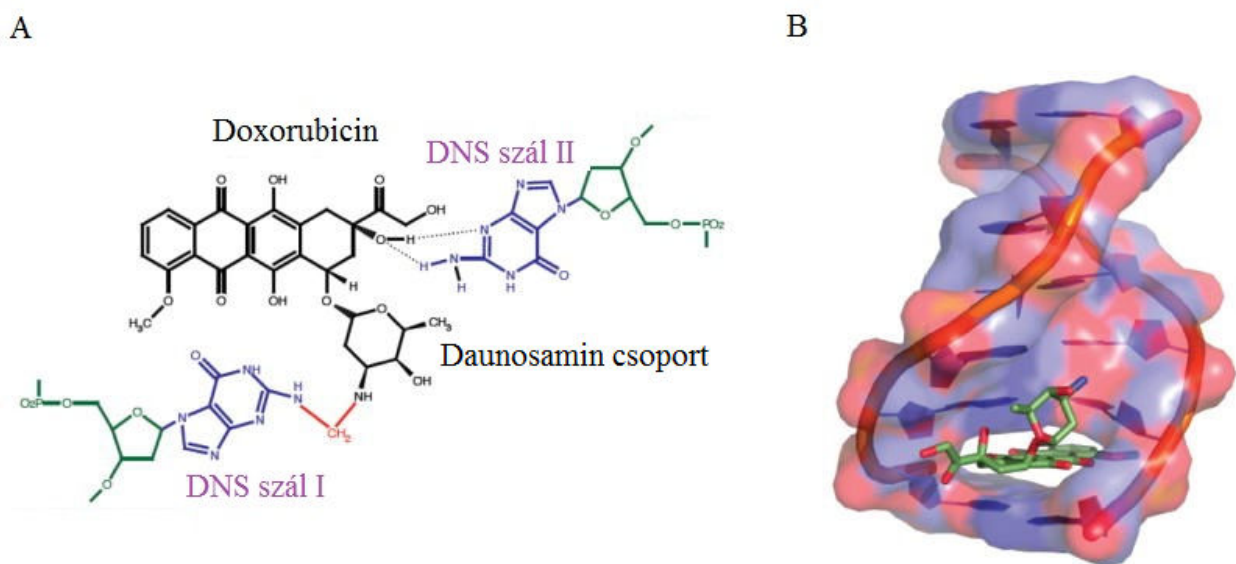
Az antraciklinek planáris szerkezetű molekulák, ahol egy többtagú gyűrűs szerkezetet egy glikozid kötés kapcsol össze egy daunosamin csoporttal (3. ábra) [76]. A DNS-sel kapcsolatba lépve a hidrofób aromás gyűrűk a bázisok közé, a DNS tengelyére merőlegesen ékelődnek be, az amino-cukor csoportja pedig a kis árokba kerül és guanin bázisokkal hidrogén-kötéseket alakít ki, s így stabilizálódik [81].

A Dox interkalációja és a DNS szálak keresztkötése gátolja a szálak szeparációját, a helikázok funkcióját [82, 83], a transzkripció faktorok és egyéb fehérjék DNS-kötését [83], továbbá a DNS replikációt és a transzkripciót is [84-89]. Az interkaláció és az azt követő DNS keresztkötés elsősorban a DNS templát funkciójával interferál. Kimutatták, hogy a Dox egyaránt

gátolja a virális, bakteriális és az emlős sejtekben található DNS függő DNS polimerázt [90-92], és a bakteriális RNS polimerázt is [92]. Ezen felül, a Dox közvetlenül kötődhet a DNS polimerázhoz is, így az interkalációtól független módon is gátolhatja a DNS replikációját [93]. A Dox DNS és RNS szintézisre gyakorolt gátló hatása sejtmag preparátumon is detektálható, de az élő sejtekhez képest eltérő mértékben, így feltételezhető, hogy a sejten belül metabolizált Dox származékok is hozzájárulnak a DNS és a mRNS szintézis gátlásához [94]. Továbbá kimutatták, hogy az antraciklinek a szomatikus rekombinációt is elősegítik [95], és stabilizálják a G-quadruplex DNS struktúrákat [96], így egyéb sejtmagi funkciók is megváltozhatnak. A linker DNS-be történő interkaláció miatti konformációváltozás a kromatin dekondenzációjához vezethet [97].

1.4.2. Addukt képzés

A Dox további hatásai közé tartozik a DNS-sel történő kovalens kötődés, az ún. addukt képzés. Az interkalálódott Dox az intracellulárisan jelenlévő formaldehid reaktív csoportjai segítségével a DNS egyik szálán található guaninnal kovalens kötést létesít és a DNS szálait keresztköti. A kötést tovább erősíti a DNS másik szálán lévő guaninnal kialakuló hidrogénkötés. (3. ábra).



3. ábra. A Dox-DNS komplex szerkezete. (A) A Dox az intracellulárisan jelenlévő formaldehid reaktív csoportjai segítségével kovalens kötést létesít (pirossal jelölve) a DNS egyik szálán lévő

guaninnal, a DNS másik szálán lévő guaninnal pedig hidrogén-kötéseket. (B) A Dox DNS-be történő interkalációja során a kis árokban elhelyezkedő daunosamin csoportja a két vele szomszédos bázispárt egymástól távolabb helyezi a DNS hossz tengelye mentén (az eredeti ábrák forrása: [84, 98].)

A Dox a DNS keresztkötésén túl reakcióba léphet lipidekkel és sperminnel is. Mindkét reakció végtermékeként szabad formaldehid keletkezik [99]. Kimutatták, hogy a sejten belül megnövekedett formaldehid szint kísérletesen fokozza a sejtek Dox toxicitását. [100, 101]. A DNS-sel történő addukt képzés aktiválja a DNS hibajavító mechanizmusait és TopII független módon vezet sejthalálhoz [102, 103]. Egyéb gyógyszerekkel a sejten belüli formaldehid szintjének emelése révén a toxicitás tovább fokozható [104, 105].

1.4.3. Hisztonokhoz való kötődés

Az antraciklinek pleiotrop hatásához hozzájárul, hogy a sejtmagon belüli hisztonokhoz is kötődnek [106], amit laboratóriumunkban mi is kimutattunk [107]. A Dau esetében ezt a jelenséget részletesen tanulmányozták. Konfokális mikroszkópia és áramlási citometria segítségével kimutatták a Dau H1-hez kötődését. A kapcsolódás hatására a hiszton a magvacskába transzlokálódott, melyet kromatin aggregáció követett. Feltételezhető, hogy a H1 hisztonokon két Dau kötőhely található, a kötődési helyek a H1 ún. tripszin rezisztens globuláris winged-helix részén találhatóak, és a kötődés kooperatív jellegű [108, 109]. Kimutatták továbbá azt is, hogy a Dau H1-hez történő kötődése *in vitro* növeli a hiszton hőstabilitását [109]. A Dau az oldatban lévő szabad linker és core hisztonokhoz egyaránt kötődik - az acetilált core hisztonokhoz nagyobb mértékben [110]. A kromatinhoz kötött hisztonok közül csak a linker hisztonhoz történő kötődését mutatták ki, a kromatinkötött core hisztonokhoz alig kötődik [106, 111]. Ezt azzal magyarázták, hogy a kromatinkötött hisztonok közül a linker hisztonok hozzáférhetősége nagyobb lehet a core hisztonokénál [106]. Az is lehetséges azonban, hogy a Dau kötőhelyek a nukleoszómán annak DNS-t kötő részein találhatóak, így nem hozzáférhetők a Dau számára. Az antraciklinek kromatinkötését több különböző módszerrel (equilibrium dialízis, hidrodinamikai és elektromos dikroizmus) részletesen vizsgálták [76]. A Dau a nukleoszómamentes DNS-hez kötődik

legnagyobb affinitással, melyet a H1 depletált kromatin követ [111-113]. A Dau hozzáadása H1 depletált kromatinhoz a nukleoszóma és a DNS közötti kötés gyengülését okozza [113].

A hisztonokon és topoizomerázokon kívül más magi fehérjékkel is interakcióba lépnek az antraciklinek. A Dox a DNS-hez kötött HMG1 fehérje DNS-kötését dóziszfüggő módon csökkentette, így destabilizálva a DNS-HMG1 fehérje komplexet [114], továbbá egyéb, nem hiszton sejtmagi fehérjékhez is kimutathatóan kötődik [115]. A DNS-be interkalálódó antraciklinek versengenek a DNS-kötő transzkripciós faktorokkal [116], melynek eredménye a sejtmagi szabályozó folyamatok megváltozása, ami hozzájárul a komplex hatás kialakulásához.

1.4.4. Az interkaláció okozta nukleoszóma destabilizáció

Az antraciklinek DNS interkalációjának topológiai következményei is vannak. Interkaláció során a DNS tekertsége (T_w) csökken, a DNS relaxálódik. Kimutatták, hogy interkalálódó molekulánként -27° -ot csökken a DNS dupla hélix természetes tekertsége [117]. Az interkaláció ezen túl megváltoztatja a DNS hosszát és rigiditását [118] és a kettős hélix olvadáspontját is [119]. Az antraciklinek interkalációja következtében kialakuló alultekertség a DNS relaxáció irányába hat, mely strukturális változásokat okoz a nukleoszóma szerkezetében. Ez a H2A/H2B dimerek kötődési erősségét csökkenti, így nő a dimer disszociációjának valószínűsége [120, 121], mely a nukleoszóma destabilizációját okozza. Tehát az interkaláció és a következtében kialakuló alultekertség végül a nukleoszómák destabilizációjához vezet [98, 122, 123]. Ezt a jelenséget laboratóriumunkban mi is részletesen tanulmányoztuk [124].

In vitro kísérletekben igazolták, hogy a DNS-en felhalmozódó túltekertség gátolja, az alultekertség pedig elősegíti a nukleoszómák összeállását [125, 126], tehát a nukleoszómális szerkezet érzékeny a szuperhelicitás megváltozására. Egy másik kísérletes rendszerben nukleoszómák áthelyeződését mutatták ki pozitívan szuperhelikális DNS-ről negatívan szuperhelikális DNS-re, ami egy olyan elongációs modellt látszik igazolni, melyben a polimeráz előtt szétszerelődik, mögötte ismét összeáll a nukleoszóma. Ebben a modellben a H2A-H2B dimerek leválását tételezik fel az elongáció során, melynek eredményeképpen ideiglenesen kialakuló tetraszóma szerkezete jobban megfelel a szuperhelikális DNS-nek [127].

A Dox nukleoszóma destabilizáló hatását terápiásan adott koncentrációk esetében is kifejti [122]. A Dox-hoz hasonlóan a Dau destabilizációs hatását a core hisztonokra 1-10 μM koncentrációban fejti ki [128]. Egy olyan kísérletben, ahol előzetesen a nukleoszómákat megjelölték, a Dox okozta relaxáció megnövelte a nukleoszómák lecserélődési valószínűségét (turnover-ét) az aktív gének promoterei mentén [129, 130]. Hasonló eredményt kaptak más antraciklinnel (aclarubicinnel) kezelt sejtek esetében, mely TopII gátló hatással nem rendelkezik [131], illetve TopII α depletált sejtekben is kimutatták a Dox nukleoszóma destabilizáló hatását [122]. Tehát az antraciklinek nukleoszóma destabilizáló hatása feltehetően az interkalációtól függ, nem pedig a TopII gátló hatásuktól [132]. Az antraciklinek által indukált nukleoszóma destabilizáció bizonyos gének aktivációját [122] okozhatja, továbbá a teketség megváltozása miatt megnövekedett nukleoszóma disszociáció és reasszociáció [133] DNS károsodáshoz, majd apoptózishoz vezethet. A disszociálódó nukleoszómák következtében megnövekedett nukleoszómamentes DNS terület könnyebben hozzáférhető a DNS károsító anyagok, szabadgyökök számára, ami DNS hibák létrejöttét okozhatja TopII gátlástól független módon. Más DNS interkalátor (pl. quinacrine) kezelés hatására is detektáltak génexpresszió változást [134], így feltételezhető, hogy ez a jelenség az antraciklinek interkalációs és a következtében létrejövő nukleoszóma disszociációs hatásával függ össze. Erre utal az is, hogy a DNS hozzáférhetőségét növelő enzimek expressziós szintje korrelál az antraciklin szenzitivitással [135].

1.4.5. Az antraciklin interkaláció és a következtében kialakuló nukleoszóma destabilizáció összefüggése a DNS topológiájával

A kromatinban zajló szintetikus folyamatok okán és a kromatin szerveződéséből fakadóan is, a teketség a genomban nem homogén eloszlású, és mivel az antraciklin interkaláció folyamata függ a DNS szuperhelicitásától [75], így az interkaláció nukleoszómákra gyakorolt destabilizációs hatása a különböző helyeken eltérő lehet. Korábban leírtuk, hogy az interkaláció hatására bekövetkező nukleoszóma destabilizáció a DNS relaxációjának a következménye [124]. Élő sejtekben a DNS károsodása során fellépő DNS-törések destabilizálják a nukleoszómákat. Munkánkban kimutattuk, hogy a gamma foszforilált H2A.X-t tartalmazó nukleoszómák stabilitása kisebb a gH2A.X-t nem tartalmazó nukleoszómák stabilitásához képest, melyet a nukleoszóma közvetlen közelében megtalálható, és feltételezhetően TopII eredetű száltörés magyarázhat [124].

Ezek alapján feltételezhető, hogy olyan kromatin területeken, ahol például a DNS teljesen relaxált állapotban van, a Dox nukleoszóma destabilizációs hatása erősebben érvényesül, ugyanis a relaxált állapot kedvez a Dox interkalációjának [75]. Azt is bizonyítottuk, hogy promóter-közeli nukleoszómák (H3K4me3 és H3K27ac poszttranszlációs módosítással) alacsonyabb Dox koncentrációk hatására disszociálnak a kromatinról [124]. Tehát az általunk detektált globális jelenségek a kromatin Dox által preferált részein lokálisan kisebb Dox koncentrációk esetén is létrejöhetnek. Az interkalátorok kromatinra kifejtett hatásának vizsgálata céljából tehát feltérképeztük az interkalátorok által preferált kromatin régiókat, melyek endogén szálfolytonosság-hiányokat és a következtükben kialakuló relaxált DNS-t tartalmazó topológiai doméneket tartalmaznak. A bevezetésben áttekintem az ebből a szempontból releváns irodalmi ismereteket is.

A DNS tekerttségének eloszlását a genom szintjén psoralen térképezéssel vizsgálják, ami egy olyan DNS interkalátor, mely az alultekert DNS szakaszokat részesíti előnyben az interkaláció során. A psoralen a DNS-t UVA besugárzás hatására keresztköti, így utólag feltérképezhető az alultekert DNS-t tartalmazó kromatin domének [41, 136-138]. Biotinnal jelölt psoralen segítségével [139] a kromatinba beépült és fotofixált psoralen fluoreszcens mikroszkópban láthatóvá tehető, melyet a laboratóriumunkban mi is kísérletesen tanulmányoztunk, és azt találtuk, hogy az a relaxációra érzékeny etidium bromiddal megegyezően viselkedik [75].

1.4.6. A szuperhelicitás-függő antraciklin interkaláció kapcsolata TopII eredetű endogén DNS-törésekkel

A kromatin topológiai szervezésében a TopI enzim a kromatinon belül mindenütt jelen lehet, a transzkripciós buborékban 3' irányban haladó RNS polimerázzal együtt haladva módosítja a DNS tekertségét. A TopII enzimek a gének promóter régióira lokalizálódnak és a transzkripció szabályozásában is részt vesznek. Mivel az antraciklinek a TopII enzimet gátolják, így a kromatinra gyakorolt hatásuk megértéséhez szükség van a TopII-t tartalmazó DNS régiók és a TopII gátlás következtében felhalmozódó száltörések feltérképezésére. A bevezetésben ezért áttekintem az erre vonatkozó irodalmi ismereteket is.

Az antraciklinek – az etopozidhoz hasonlóan - a topoizomeráz II katalitikus ciklusának religációnak nevezett lépését gátolják, így megnövekszik a DNS 5' végéhez kötött TopII enzimek (TopIIcc / cleavage complex) száma. A katalitikus ciklusba belépő újabb TopII enzimek is a DNS-hez kovalensen kötött állapotban csapdázódnak, ami szabad 3' OH csoportot tartalmazó DNS szál folytonosság-hiányok felhalmozódásához vezet. Ez a DNS hibát érzékelő útvonalak aktiválódásán át a sejtciklus leállítását és apoptózist eredményez [2, 140].

Jelentős mennyiségű irodalmi adat bizonyítja a TopII és az általa okozott száltörés kapcsolatát a transzkripcióval. Kimutatták, hogy a transzkripció elindulásához szükséges a TopII β és az általa okozott száltörés jelenléte a gén promoterén [141, 142], ez utóbbit laboratóriumunkban mi is sikeresen detektáltuk. A TopII és az általa okozott száltörés mennyisége a promoteren korrelál a gén expressziójával és a cohesin jelenlétével [142]. A cohesin az interfázisban a kromatin hurkok szerveződésében vesz részt [143-145]. Bizonyos élesztő gének szabályozásában kimutatták, hogy a TopII fontos szerepet játszik [146]. Neuronális korai válaszadó gének átíródásánál is jelen van a TopII β és az általa okozott száltörést is detektálták [147], továbbá a gyakran átíródó génekben több TopII α által létrehozott száltörést detektáltak [48]. A TopII β -val együtt a Poly(ADP-ribóz) polimeráz 1 [148] és a Ku70/86 [149] enzim jelenlétét is kimutatták a promoteren, mely (a TopI enzimmel együtt) a transzkripció és az enhancer transzkripció elindulásához is szükséges [150]. Megfigyelték azt is, hogy az inzulinra adott transzkripcionális válasz létrejötte során a DNA-PK és a TopII β általi időleges száltörés létrejötte szükséges [151]. Hasonlóan, a TopII függő PARP1 aktiváció a zsírsejtek funkciójához szükséges gének átíródásánál is jelen van [152]. A TopII β szerepét az ösztrogén, androgén [153] és a glükokortikoid [149] receptorral együtt a target gének aktivációjában is leírták. A DNS hibajavítási enzimek közül több (ATM, DNA-PK, PARP1) is jelen van a TopII β -val együtt a cél-gén promoterén a transzkripció iniciációja során [153], és az is ismert, hogy a transzkripció és a DNS hibajavítás fehérjéi szoros fizikai és funkcionális interakcióban vannak egymással [154]; a DNS hibajavítás fehérjéit a transzkripció ko-aktivátoraként is lehet tekinteni [155]. A DNS hibajavítás és a transzkripció folyamata egymással szoros kapcsolatban állnak és funkcionálisan összefonódnak. Ebbe a képbe illeszkedik, hogy a TopII által létrehozott szálfoltonosság-hiány és a DNA-PK által létrejövő H2A.X foszforiláció kapcsolatban áll a transzkripció elongációjával [156], továbbá az a megfigyelés is, hogy a topoizomerázok és a DNS hibajavítás enzimek a kromatin struktúra megváltoztatásával bizonyos gének átíródását fokozzák [141, 157, 158]. Ismert, hogy a

riboszómális géneken a TopII α a preiniciációs komplex létrejöttét, így az RNS polimeráz I aktivációját segíti elő [159].

A TopII β aktivációja a kettős száltörések mellett egyszál töréseket is generál, melyeket etopozid segítségével genomi szinten már feltérképeztek [46, 160]. Az egyszál és/vagy kettősszál folytonosság-hiányok azonosíthatók jelölt nukleotidok templátfüggő beépítésével *E. coli* DNS Polimeráz I enzim segítségével, amikor láncterminátor nukleotidok hozzáadásával pontosabb lokalizáció érhető el a jel erősségének terhére [161] (a disszertáció alapját képező II. cikk). Terminális transzferáz segítségével lehetőség van a szabad 3' OH csoporthoz egy jelölt nukleotidokból álló egyszálú nukleinsav szakaszt polimerizálni, mely szintén pontos lokalizációt tesz lehetővé. Az utóbbi módszer alkalmazhatóságát korlátozza, hogy az enzim aktivitása erősen függ a megjelölendő vég természetétől [162], továbbá hogy genomszintű analízis esetén alkalmazott szonikálás során a jelölt, egyszálú nukleinsav szakasz a nyíróerők hatására leszakadhat. Felmerül a lehetősége annak is, hogy a különböző 3' OH-t jelölő technikák során nem DNS hanem RNS végek 3' OH csoportjait jelöljük meg, például a transzkripció során keletkező RNS/DNS hibridek RNS-ét, tehát valójában TopII független jelet is kaphatunk. A DNS-hez kovalensen kötött TopII detektálására kifejlesztettek egy módszert, mely során egy enzimátikus kezelés (TDP2) hatására leemésztik a TopII-t, majd a DNS-t Exonukleáz VII és Exonukleáz T segítségével tovább emésztik, melyet jelölés követ [142]. Ennek az eljárásnak az enzimológiai hátterét azonban nem tárták fel kellő alaposítással, illetve nem publikálták. Egy másik olyan kísérletes rendszerben, ahol szintén a TopII töréseket térképezték, a fenol-kloroform segítségével végrehajtott DNS extrakció következtében elveszthették a fehérjékhez kötődő DNS frakciót, ami megmagyarázhatja, hogy miért kaptak az Exo VII/T eljárással nyert eredményektől teljesen eltérő képet [160]. Mindezeket összevetve azt gondolom, hogy az irodalmi adatok a TopII eredetű 3' OH csoporttal rendelkező szálfolytonosság-hiányok kísérletes jelölése és térképezése szempontjából nem teljesen meggyőzőek. Ebben a munkában bemutatom a TopII eredetű 3' OH csoportot tartalmazó szálfolytonosság-hiányok jelölési módszerének beállítását élesztő rendszer rDNS klaszterén [161] (a disszertáció alapját képező II. cikk), és a folytonosság-hiányok genomi eloszlását DIP-seq és combing módszer alkalmazásával (lásd Eredmények). Az utóbbi eredményeket tartalmazó kézirat készülöben van.

1.4.7. Antraciklin okozta kromatin aggregáció

Az antraciklinek amellet, hogy a DNS-be interkalálódnak, így destabilizálva a nukleoszómákat, a hisztonokhoz is kötődnek és a kromatin aggregációját is okozzák, már terápiás koncentrációban alkalmazva is. A Dau esetében ezt részletesen tanulmányozták [128]. A kromatin aggregáció először számos kisebb ponton egyszerre indul meg a perinukleáris heterokromatinban, mely együtt jár a H1 hiszton részleges disszociációjával és a magvacskába történő áthelyeződésével [128]. Az aggregált kromatinban maradt H1 hiszton megnövekedett mobilitását FRAP (fotokioltság utáni fluoreszcencia helyreállítás) módszerrel mutatták ki, GFP-vel kapcsolt hiszton esetében. A Dau okozta kromatinaggregáció már igen alacsony koncentrációban (5 nM) adva is detektálható, mind GFP-vel kapcsolt, mind antitesttel jelölt hisztonokkal.

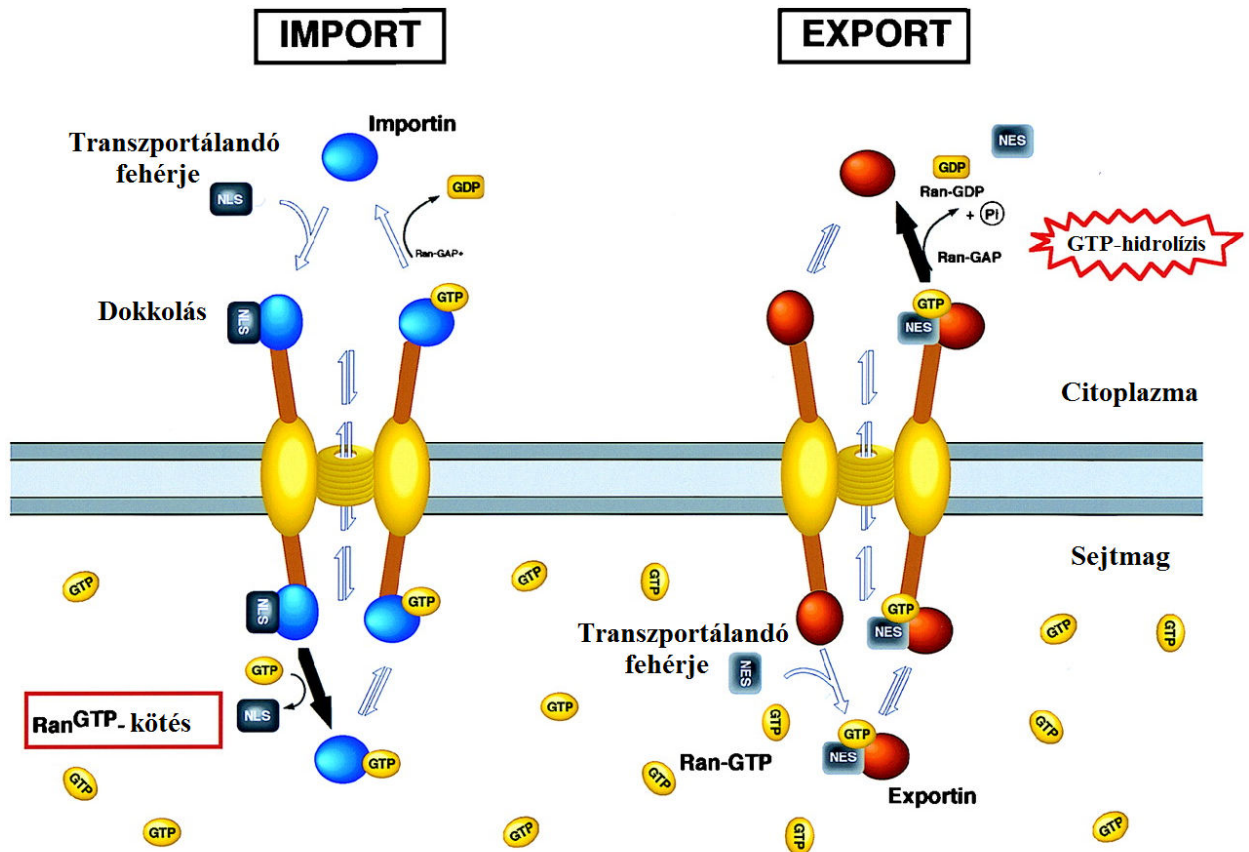
Kromatin aggregációt más interkalátorokkal történő kezelés esetén is dokumentáltak. A DRAQ5, egy sejtmembránon átjutó fluoreszcens DNS festék, mely az antraciklinekhez hasonló módon interkalálódik a DNS-be. Már μM -os koncentrációban adva különböző nagyságú területekre kiterjedő kromatin aggregációt okoz, mely ugyancsak a H1 hiszton megnövekedett mobilitásával, magvacskába történő transzlokációjával és a H2B hiszton DNS-hez történő kötődésének csökkenésével jár [163]. 1 μM DRAQ5 mellett a H1 disszociációja és kromatin aggregáció figyelhető meg; ennél a koncentrációnál a H2B még kromatinkötött állapotban van. 3-7 μM DRAQ5 esetében a H2B is destabilizálódik és a sejtmagon belül diffúz eloszlást mutat [163].

Az antraciklinek kromatint aggregáló hatását először analitikai ultracentrifugálással, egyensúlyi dialízissel és cirkuláris dikroizmussal vizsgálták [76]. A kísérletek alapján a kromatin aggregáció mechanizmusát a következő módon magyarázták. Az antraciklin kötődik a kromatinkötött H1 hisztonokhoz, mellyel elősegíti a disszociációjukat, továbbá interkalálódik a nukleoszómák közötti linker DNS-be – amit egy másik interkalátorral (EBr) mi is kimutattunk [75]. Ennek következtében a linker DNS merevebb lesz, a kromatin szupranukleoszomális tekeredése megváltozik, ami fokozatosan ráterjed a nukleoszomális DNS-re annak a nukleoszómába történő be- és kilépési pontjai irányából [76]. Így tehát megváltozik a kromatin szerkezete, mely végül újabb kapcsolatok létrejöttéhez vezet a hisztonok és a kromatinszálak között [164], továbbá a nukleoszómára tekert DNS mennyiségének csökkenésével a hiszton oktamer részlegesen destabilizálódik, így a folyamat végterméke az aggregált kromatin. A folyamathoz hozzájárul, hogy a nukleoszomális DNS szabaddá válásának következtében megnő a

súrlódás, ugyanis aggregáció során kísérletesen is detektálható a szedimentációs koefficiens csökkenése [76]. Mivel a kromatin szupranukleoszómális tekeredése alapvetően ionerősség függő [165, 166], így az elektrosztatikai interakciók igen fontos szerepet játszanak a kromatin aggregáció mechanizmusában. A core hisztonok N-terminális vége gátolhatja a nukleoszómális DNS-be történő interkalációt [167], így poszttranszlációs módosításuk befolyásolhatja lokálisan az aggregációt is. Ezt az is alátámasztja, hogy az acetilált core hisztonokkal rendelkező nukleoszómák Dau hatására megnövekedett mértékben disszociálnak a DNS-ről, ami a kromatin aggregációt ellen hat [110].

1.5. A H1, H2A és H2B hisztonok nukleo-citoplazmatikus transzportja

Kutatásaink szerint a Dox kezelés a H2B hiszton nukleo-citoplazmatikus transzlokációját eredményezi [168] (a disszertáció alapját képező I. cikk), így fontos beszélni a hisztonok nukleo-citoplazmatikus transzport folyamatairól. A nukleoszómákat alkotó hiszton oktamer nyolc, úgynevezett core hisztonból épül fel úgy, hogy minden core hisztonból (H2A, H2B, H3 és H4) kettőt tartalmaz [27]. A hisztonok a citoplazmában szintetizálódnak, többségükben sejtciklus-függő módon. A H2A és H2B hiszton fehérjék aminosav szekvenciájában az N-terminálison található egy nukleáris lokalizációs szekvencia (NLS), mely a sejtmagba történő bejutásért felelős. A H2A és H2B hisztonok nukleáris importjában és exportjában a karyopherin (importin, exportin) fehérjecsald több tagja is részt vesz. A karyopherinek evolúciósan konzervált, szerkezetileg hasonló transzport receptorok [169-171], melyek kötődnek a szállítandó fehérje NLS szekvenciájához. Az így kialakult szállítmány a nukleáris pórus komplex egy meghatározott részéhez kihorgonyozódik [172], majd a karyopherin GTP kötött Ran fehérjével kölcsönhatásba kerülve a transzportált fehérjéről leválik [173] 4. ábra. Tíz import karyopherint és összesen majdnem 2000 nukleo-citoplazmatikusan cirkuláló fehérjét mutattak ki élesztőben. Működésük és transzport mechanizmusuk azonban még nem teljesen ismert, tehát feltételezhető, hogy egy karyopherin többféle fehérjét képes transzportálni [174]. Három karyopherin (Kap114p, Kap121p és Kap95) direkt módon kötődik a H2A és H2B NLS-hez. A kötődést a Ran-GTP gátolja [174], így a sejtmagban található magas Ran-GTP következtében a karyopherin-hiszton kapcsolat megszűnik, a komplexről a szabad hiszton leválik. A Kap114p, Kap121p és Kap123p H2A-val és H2B-vel alkotott komplexét is izolálták a citoplazmából [174].



4. ábra. A nukleo-citoplazmatikus transzport sematikus bemutatása. Az importin molekulák kötődnek a magi lokalizációs szignált (NLS) hordozó transzportálandó fehérjékhez a citoplazmában és dokkolnak a magi pórus komplexhez, a sejtmagban a RAN fehérje GTP kötése következtében a szállítandó fehérje leválik az importinról, utóbbi visszajut a citoplazmába. Az exportin molekulák a magi export szignált (NES) ismerik fel a sejtmagban és Ran-GTP-hez kapcsolódva exportálják a megkötött fehérjét. A citoplazmában található Ran-GAP enzim a GTP hidrolízisét eredményezi, melynek végterméke a RAN-GDP. A RAN-GDP elősegíti a szállítandó fehérje leválását a citoplazmában, míg az exportin visszajut a sejtmagba. (Az eredeti ábrák forrása: [175].)

A H2A és H2B hisztonok sejtmagi import folyamata más fehérjékhez hasonlóan a magi pórus komplexen keresztül zajlik [176]. Az emlős importin $\beta 1$ /importin 7 heterodimer képes *in vitro* a H1 hisztont importálni [177]. A core hisztonok közül csak a H2B NLS-ét tanulmányozták részletesen [178, 179]. Az élesztő H2B fehérje 22-33 pozíciókban levő aminosavak jelenléte

elégleges a H2B magba jutásához [178]. Mivel ez a szekvencia pozitívan töltött aminosavakban gazdag és hasonlít az SV40 NLS-éhez, ezért úgy gondolták, hogy a H2B importja Kap α által történik [178]. Más kutatók szerint a H2B importja Kap α /Kap β 1 független [180, 181], megint mások adatai szerint importin 9 által mediált folyamat [182].

Az exportin 1 (XPO1, chromosomal maintenance 1, CRM1) a leggyakoribb magi exportban részt vevő karyopherin, melyre jellemző, hogy leptomycin B-vel gátolható. A sejtmagban a magas Ran-GTP szint következtében megköti a transzportálódó fehérjét [183] a fehérje leucin gazdag sejtmagi export szignál motívuma segítségével [184]. Ez a karyopherin felelős a legtöbb fehérje, rRNS, snRNS és mRNS exportjáért is [184-187], bár ismertek más specializált transzportfehérjék is, melyek az érett mRNS-eket exportálják. A tRNS-eket az ún. exportin-t transzportálja a citoplazmába bizonyos minőségellenőrzési lépések után [172].

Az mRNS-ek exportja nagyrészt CRM1 független, hiszen a leptomycin B-vel a mRNS-ek exportja nem szüntethető meg [188]. Az érett poly(A)+ mRNS-ek egy része az NXF1/TAP (nuclear RNA export factor 1) útvonalon jut ki a citoplazmába, majd az NTF2 related export proteinnel (NXT1) heterodimerizálódva kapcsolódik a magpórushoz. A folyamat során a transzport fehérje a sejtmagból a citoplazmába folyamatosan ki- és beáramlik [189-192]. Az mRNS-ek exportálódhatnak a sejtmagból más útvonalakon is, ismert Trn1 és Trn2 mediált mRNS export is [188], melynek azonban pontos mechanizmusa nem teljesen felderített [193].

A Nap1p nevű chaperon hiszton dimerekkel alkotott komplexét kimutatták, mely transzporter az mRNS-ek exportjához hasonlóan CRM1 független. Mivel a Nap1 nukleáris export szignált is tartalmaz, így a hisztonok exportjában is szerepet játszhat [194]. A Nap1p fehérje a sejtciklus S fázisában mutatható ki a citoplazmában [195], amikor a hisztonok szintézise is folyik.

Az RNS-eken kívül leírták bizonyos fehérjék CRM1 független magi exportját is. A UAP56 és URH49 helikázok mellett [196] a TDP-43 és FUS sejtmagból történő kijutása is exportin-1 független. E két fehérje az mRNS processzálsban vesz részt; az amiotrophiás lateral szklerózis és a fronto-temporális demencia nevű betegségek patogenezisében is szerepet játszanak. A betegség kialakulása során e két fehérje aggregációját mutatták ki a citoplazmában, miközben a fehérjék magi szintje csökkent idegsejtekben is és gliasejtekben egyaránt [197]. A TDP-43 citoplazmatikus transzlokációját, aggregációját és stressz granulum képzését örökletes genetikai betegségek patogenezisében is dokumentálták [198].

Akut stressz hatásra a karyopherinek egy részének a működése leállhat és a sejtmagban stressz granulomokat alkotva vagy a citoplazmában ribonukleoprotein komplexekben halmozódhatnak fel és aggregálódhatnak [199, 200], mely folyamat analóg lehet az általunk dokumentált H2A hiszton aggregációval [168] (a disszertáció alapját képező I. cikk).

1.6. Extranukleáris és extracelluláris hisztonok

Kutatásaink szerint a Dox kezelés hatására megnő a sejtek citoplazmájában a H2B hiszton szintje, továbbá dendritikus sejtek (DC) citoplazmájában Dox kezelés nélkül is magas H2B tartalmat mutattunk ki [168] (a disszertáció alapját képező I. cikk), így a bevezetés további részében áttekintem az extranukleáris hisztonokról rendelkezésre álló irodalmi adatokat is.

A hiszton fehérjék sejtmagon kívüli funkciói is ismertek, a természetes immunitásban fontos szerepet játszó antimikrobiális peptidek (pl. lizozim, defenzinek) által képviselt védelmi rendszer részeként [201]. Citoplazmatikus vagy extracelluláris hisztonok több helyen, többféle szövetben is megtalálhatóak, például a méhlepényben, a gastrointesztinális traktus különböző részein, a bőrben, sebváladékban, makrofágok lizoszómaiban, limfocitákban, sőt még a tehéntejben is kimutatták a jelenlétüket [202]. A méhlepény szinciciotrofoblaszt és amnion sejteinek citoplazmájában nagy koncentrációban mutatható ki a H2A és H2B hiszton, főleg a membránközeli részekben. Az amnion epitél sejtek folyamatosan H2B-t szekretálnak, mely az amnion folyadékban összegyűlve baktériumölő hatással rendelkezik [203]. A placenta az immunrendszerrel eleve nagyrészt elzárt, speciális immunológiai tulajdonságokkal rendelkező terület, így a kórokozók elleni védekezés szempontjából kitüntetett jelentőséggel bír. A gyomorban található mirigysejtek citoplazmájában H2A-t mutattak ki, melyet a sejtek a gyomor lumenébe szekretálnak [204], fokozva a gyomornedv antibakteriális hatását. Hasonlóan, a H1 hiszton az emberi bélrendszer epitél sejteinek mikrovillusaiban is megtalálható, ahonnan a lumenbe szekretálódik. H1 és H2B hisztonot mutattak ki halak hámsejteinek membránjában is, mely bizonyos kórokozók osztódását gátolta *in vitro* [205-207], illetve egér makrofágok lizoszómaiban is [208], ahol non-oxidatív antimikrobiális hatásért felelősek. Humán vízhólyag folyadékában és sebváladékban defenzin, lizozim és más antimikrobiális peptidek mellett a H2B hiszton N-terminális fragmentumát is megtalálták [209]. Humán perifériás vérből származó limfociták és *in vitro* tenyésztett T sejtek membránjában is kis mennyiségben jelen van a H2B és H3 hiszton [210].

Szintjüket a fitohemagglutinin kezelés erőteljesen megnöveli, extracelluláris szekréciójukat is kiváltva. Nem osztódó egér májsejtek és folyamatosan osztódó Friend eritroleukémia sejtek citoplazmájában H1 hisztont találtak [211], továbbá kimutatták a H1 hiszton nukleo-citoplazmatikus transzlokációját S- és korai M-fázisú HeLa sejtekben [212]. Az immunrendszer sejtjei tehát aktívan hisztonokat juttatnak az extracelluláris térbe, melyek antimikrobiális hatásaikon túl protrombotikusak, a gyulladás terjedését gátolják és elősegítik a gyulladt szövet regenerációját [213, 214]. Kimutatták, hogy a neutrofil granulocyták hálózatos struktúrákat, ún. extracelluláris csapdákat hoznak létre úgy, hogy a kromatinjukat bizonyos fehérjékkel együtt kijuttatják a sejtől az extracelluláris térbe [215, 216], mely jelenséget NETosisnak neveznek. Ez a struktúra gátolja a mikroorganizmusok terjedését és protrombotikus tulajdonságokkal rendelkezik [217]. Ismert, hogy állatkísérletek során injekcióban beadott hisztonok percekben belül a kísérleti állatok halálát okozzák [218], de mások szerint csak a HMGB1 fehérjével együtt fejtenek ki sejtkárosító hatást [219]. A szabad hisztonok aktiválják a komplement rendszert, ami a gyulladás során keletkezett sejtmaradványok eltakarítását segíti elő [220]. Az extracelluláris hisztonok hozzájárulnak a szepszis során fellépő endotél diszfunkció, sokszervi elégtelenség és halál kialakulásához, ugyanis gyulladás hatására szintjük emelkedik, ami hiszton ellenes antitestekkel (LPS, TNF és egyéb módon indukált szepszis esetében is) kivédhető egérben. Majom modellben *E. coli* által indukált szepszis során megemelkedett hiszton szinteket mértek a szérumban, mely a kialakuló veseelégtelenséggel korrelált [218].

Az extracelluláris térbe került hisztonok az előzőekben leírtakon kívül kemokinként is működhetnek [221], elősegíthetik más kemokinek felszabadulását [222, 223], Toll-like receptor ligandként is funkcionálhatnak több különböző receptoron hatva [224, 225], elősegíthetik bizonyos citokinek termelődését [226] és direkt citotoxicitásuk következtében a környező sejtek apoptózisát idézhetik elő [213]. A teljes méretű (H2A, H2B, H3 és H4) hisztonok endotoxin neutralizációs hatását figyelték meg *in vitro* [227], *in vivo* állatmodellben [228] és emberben egyaránt [203]. A H2A és H2B hisztonok a lipopoliszacharidok core és Lipid A részéhez kötődve dózisfüggő módon gátolják az endotoxinok aktivitását. A H2A-hoz és H2B-hez hasonlóan a H1 hiszton is képes a bakteriális LPS-hez kötődni [229], ezzel befolyásolva az immunválaszt. A hisztonok pozitív töltésűek, így kötődnek az anionos foszfolipidekhez, például a kardiolipinhez is [230], vörösvértestek membránján kimutatták a hisztonok foszfatidil szerin expozíciót fokozó hatását [231], mely a sejtek apoptózisát idézheti elő. Az extracelluláris hisztonok a sejtmembrán

permeabilitását megnövelik a kationok számára, így megváltoztatják a kalcium mediált jelátvitelt is [232].

Az extracelluláris hisztonok a véralvadást is befolyásolják, a kaszkádot trombólíz irányába tolják el [217, 233, 234], emiatt a klinikumban a hisztonok szérumszintje a disszeminált intravaszkuláris koagulációnak nevezett súlyos állapot jó prognosztikus markere [235]. Az extracelluláris hisztonok elősegítik a trombociták aggregációját, az V. véralvadási faktor expresszióját és annak trombolíz hasító aktivitását [236], és gátolják a trombolíz és a protein C aktivitását [237], mely szintén prokoaguláns hatású. Egyedül a H1 hisztonnak mutattak ki antitrombotikus hatását [238]. Amennyiben *in vitro* véralvadási kísérletben hisztonokat és DNS-t is adnak a kísérletes rendszerhez, a fibrinszálak vastagsága és a vérrög stabilitása megnő és a vérrög feloldódása is lassul [239].

Az extrakromozómális H2B-vel kapcsolatban mindezeket túl azt a meglepő megfigyelést is leírták, hogy a citoszolban duplaszálú DNS szenzorként működik, és így hozzájárul a DNS vírusok elleni immunválasz kialakulásához, a természetes és adaptív immunitás útvonalain egyaránt [240]. A citoplazmában kimutatták a H2B hisztonnak a Gamma-interferon-inducible protein 16-tal és BRCA1-gyel alkotott komplexeit, melyek a herpeszvírus fertőzésre adott interferon válasz útvonalaiban fontos feladatot látnak el [241]. A H2B az Interferon beta stimulator 1 nevű fehérjével is kölcsönhatásba lép, mely a természetes immunitás aktivációjában játszik szerepet, ami elindítja kettős szálú DNS-függő módon az I. típusú interferon termelődését [242]. Ez a folyamat jellegéből adódóan hozzájárulhat a sejt saját, duplaszálú DNS-e elleni immunválaszának kialakulásához, mely végül autoimmunitást indukálhat, s ezzel szerepet játszhat autoimmun betegségek (pl. autoimmun pajzsmirigy betegség [243], szisztémás lupus erithematosus [244]) patogenezisében.

2. Célkitűzések

A Dox egy pleiotróp gyógyszer, melynek szerteágazó hatásmechanizmusa jelenleg nem tisztázott teljes egészében. Célul tűztem ki a gyógyszer kromatinra gyakorolt hatásának pontosabb megismerését, melynek megértése fontos a gyógyszer kemoterápiás hatásai és mellékhatásai megelőzése szempontjából, és tanulságokkal szolgálhat a kromatinszerkezet egyes általános vonásairól.

A1. Pásztázó lézer mikroszkópos kísérleti rendszerrel *in situ* vizsgálni kívántam a Dox kromatin-aggregációs hatását a sejtmagon belül, az aggregáció magyarázatát keresve.

A2. Vizsgálni kívántam, hogy a H2B általam elsőként észlelt nukleo-citoplazmatikus transzlokációjában milyen biokémiai folyamatok játszhatnak szerepet.

A3. Tömegspektrometriás módszerrel tanulmányozni kívántam, hogy Dox kezelés hatására a H2B hisztonon túl mely sejtmagi fehérjék mutatnak PYR-41-re érzékeny, Dox-függő nukleo-citoplazmatikus transzlokációt.

Mivel az interkalátorok preferenciálisan kötődnek a relaxált (endogén töréseket tartalmazó) kromatin területekhez, így az antraciklinek hatása lokálisan már kisebb koncentrációk jelenlétében is jelentkezhet. Ennek megfelelően dolgozatom második részében az ilyen módon relaxált kromatin szakaszok feltérképezésére irányuló kísérleteim eredményeit mutatom be. Ezen munka keretében, melynek egy része még publikálatlan, a következő célkitűzéseim voltak.

B1. Célul tűztem, ki, hogy kidolgozzak egy olyan enzimatikus jelölési módszert, melynek segítségével specifikusan és hatékonyan jelölhetők a DNS egyszálú törések.

B2. Molekuláris combing alapú technika segítségével láthatóvá kívántam tenni a jelölt egyszál folytonosság-hiányokat élesztő és emlős sejtek DNS-én, hogy megállapítható legyen a kapcsolat a szálfolytonosság-hiányok és a TopII enzim aktivitása között.

B3. DIP-seq módszerrel tanulmányozni kívántam a szabad 3' OH-t tartalmazó folytonosság-hiányok eloszlását a humán genomban.

B4. Szuperfeloldású mikroszkópia segítségével vizsgálni kívántam a DNS szálfolytonosság-hiányok kapcsolatát a transzkripcióval.

B5. Nukleáris halo preparátumon szuperfeloldású mikroszkópiával tanulmányozni kívántam a DNS törések térbeli elhelyezkedését a sejttagon belül.

Fenti B1-5 célkitűzéseim nem csak a relaxáló hatású – így Dox-érzékeny – területek jellemzése keretében fogalmazódtak meg, hanem a fiziológias DNS szálszakadások biológiai szerepének tisztázásával kapcsolatos erőfeszítéseink sorába is illeszkedtek.

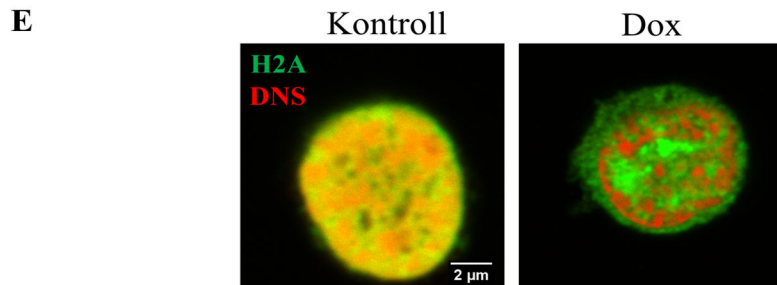
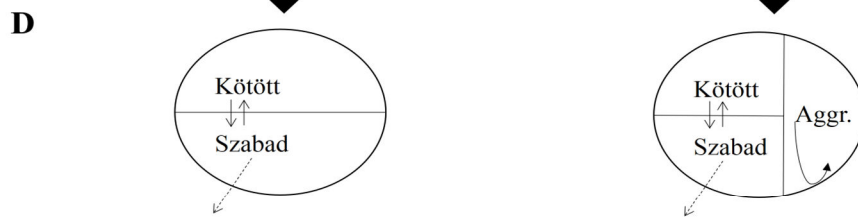
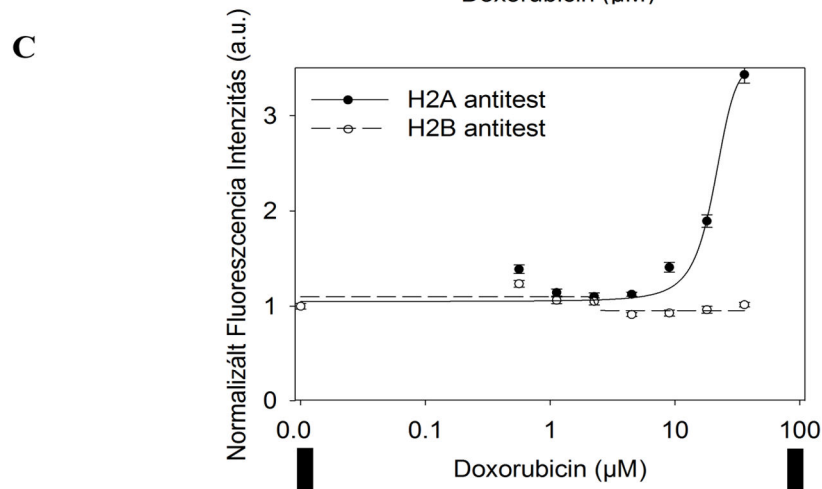
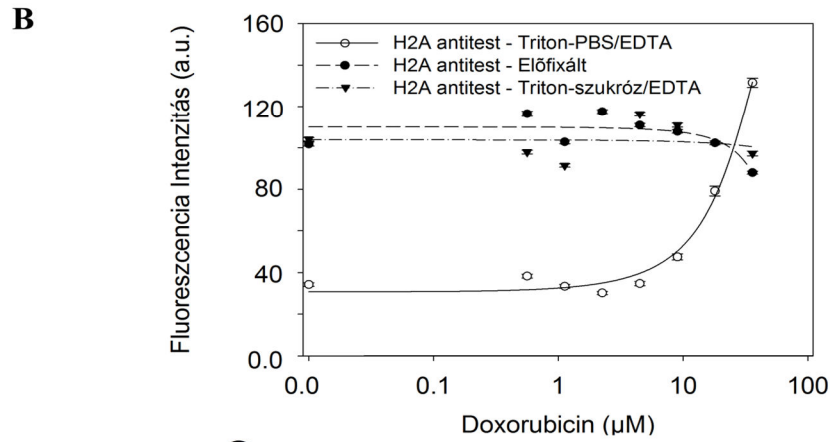
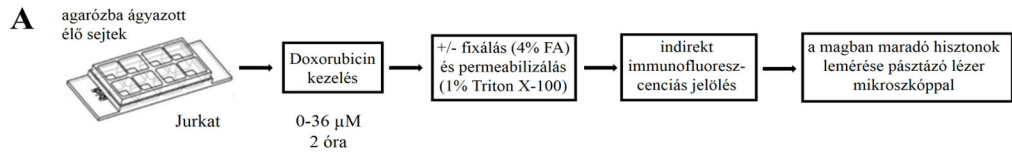
3. Eredmények

3.1. A Dox kromatinra gyakorolt hatásának vizsgálatai

3.1.1. Dox hatására megjelenő, kiterjedt H2A hiszton aggregáció a sejtmagon belül

Pásztázó lézer mikroszkópos kísérleti rendszerünkben Jurkat sejteket Dox-szal kezelve a sejtmagon belül a H2A hiszton aggregációját észleltem, melyhez nem társult a H2B aggregációja. Agarózba ágyazott élő Jurkat sejteket 0-36 μM Dox-szal kezeltem 2 órán keresztül, ezután előzetes fixálás (előfixálás) után vagy anélkül Triton X-100 tartalmú lízis oldattal permeabilizáltam (5.A ábra) (lásd Anyagok és Módszerek). A Dox kezelés hatására bekövetkező H2A hiszton aggregációja és sejtmagon belüli átrendeződése a 5.D ábrán látható modell szerint értelmezhető. A szabad hisztonok – a Dox által disszociált hisztonokkal együtt – a magból kidiffundálnak, a rá következő kísérleti lépés során kimosódnak, míg az aggregált és DNS kötött hisztonok nem távoznak a sejtmagból, így indirekt immunfluoreszcens módszerrel megjelölhetők, majd pásztázó lézer mikroszkóppal kvantitálhatók. A kontroll sejtek esetében a magban maradt H2A mennyisége sokkal alacsonyabb volt, mint az előfixált sejtekben, mert az előfixált mintával ellentétben a kontroll minta sok szabad hisztont tartalmazott, melyek kiáramlottak a sejtmagból. Abban az esetben, amikor a lízis puffer ozmolaritását só helyett szukrózzal állítottam be (ami egy régi, bevált módszer, segít a sejtmag morfológiájának megőrzésében [245]), ezt a jelenséget nem tapasztaltam (5.B ábra). A szukróz növeli a viszkozitást, jelentősen csökkentve a diffúziót, így jelenléte kedvez a Dox kezelés következtében levált hisztonok kromatinba történő visszakötődésének, tehát így a szabad, magból kidiffundáló hisztonok aránya a DNS-kötött hisztonokéhoz képest csökken. Amennyiben a lízis Triton X-100/PBS EDTA oldattal történt, a növekvő Dox kezelés hatására nőtt a sejtmagban maradt H2A mennyisége, mely Dox koncentráció-függést mutatott. Körülbelül 9 μM -nál már detektálható volt, és nagyjából 36 μM -nál érte el azt a szintet, amit az előfixált minták esetében mértem. A H2A szint emelkedése valamelyest meghaladta az előfixált minták esetében mért H2A szintet, mivel feltételezhetően a H2A ellenes antitest valószínűleg kisebb mértékben kötődik a formaldehid által fixált epitópokhoz. Abban az esetben, amikor a H2A és H2B magi szinteket egyszerre mértem, a H2A-val ellentétben nem detektáltam H2B retenciót (5.C ábra). A 5.E ábra konfokális mikroszkóppal készült képekkel demonstrálja a H2A eloszlását a sejtmagban Dox kezelés után. Az aggregált hisztonok többnyire a trabekulált, aggregált kromatinterületeken kívül találhatóak a sejtmagban. Az aggregált H2A-t tartalmazó sejtmagi területeken nem mutatható

ki DNS még akkor sem, ha szoftveresen maximálisra erősítjük a propidium-jodid (PI) jelet (a disszertáció alapját képező I. cikk [168] kiegészítő S1 ábrája).

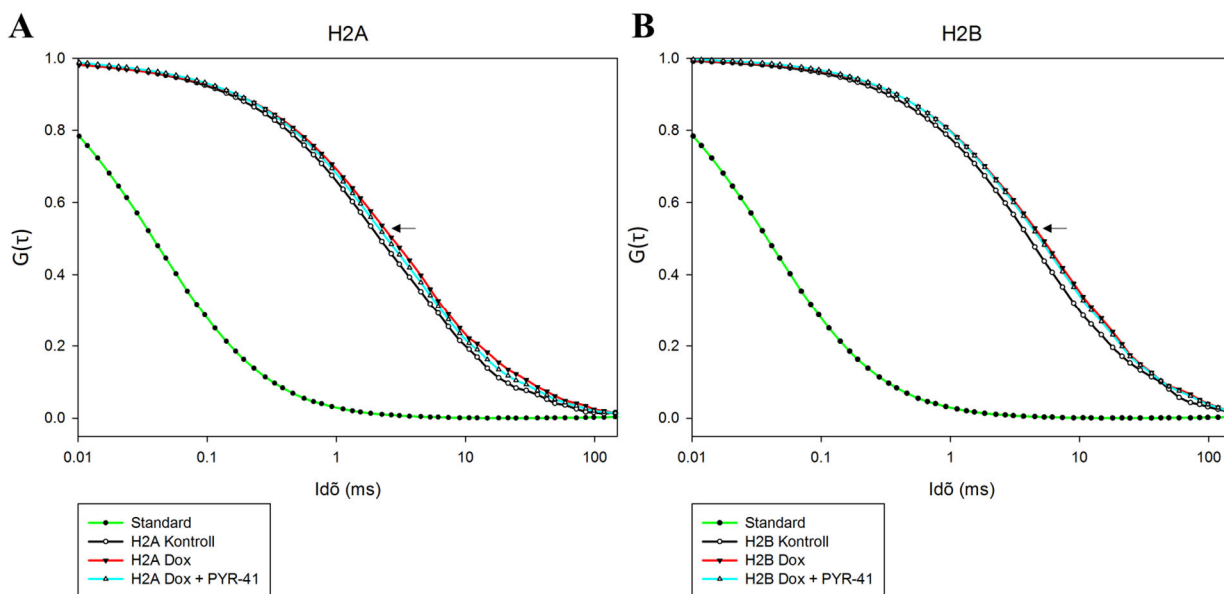


5. ábra. Dox hatására megjelenő kiterjedt H2A hiszton aggregáció detektálható (H2B aggregáció nélkül). (A) A hiszton aggregáció mérése pásztázó lézer mikroszkópos módszerrel. Agarózba ágyazott Jurkat sejteket Dox-szal kezeltem, a mintát ezután fixáltam és permeabilizáltam (előfixált) vagy csak permeabilizáltam. A H2A és H2B hisztonok szintjét indirekt immunofluoreszcenciás módon detektáltam pásztázó lézer mikroszkóppal és a képeket analizáltam. A PI eloszlási hisztogram alapján G_1 sejtekre kapuztam. (B) H2A szintek különböző koncentrációjú Dox-szal történő kezelésekre hatására. Dox kezelés után 1% Triton X-100/PBS-EDTA-ban lizált sejtek H2A szintjét folytonos vonal, az előfixált, majd ugyanezzel a lízis oldattal permeabilizált sejteket szaggatott vonal, végül az 1% Triton X-100/szukróz-EDTA-ban lizált sejteket szaggatott-pontozott vonal jelzi. A szimbólumok a mért pontokat, a vonalak pedig az Anyagok és Módszerek fejezetben leírt módon illesztett görbéket mutatják. A mikroszkóp beállításai (fotoelektron sokszorozó feszültsége, szoftveres erősítés, és offset) és a kép kiértékelés minden paramétere azonosak voltak az összehasonlított minták mérése során. (C) A sejtmagban detektálható H2A (folytonos vonal) és H2B (szaggatott vonal) szintek különböző koncentrációjú Dox kezelés után. A fluoreszcencia intenzitások a kezeletlen minták intenzitásaira vannak normalizálva. (B)-ben és (C)-ben a hibavonalak SEM értékeket jelölnek, melyek a G_1 sejtpopuláció heterogenitására utalnak. (D) A Dox indukált H2A hiszton retenció lehetséges/valószínű modellje. Permeabilizált sejtmagokból a szabad H2A hisztonok kidiffundálnak az immunofluoreszcenciás jelölés előtt, míg az aggregált hisztonok a magban maradnak. (E) Kontroll és $36\mu\text{M}$ Dox kezelt sejtek konfokális mikroszkópos képei. Fixálás után a H2A-t immunofluoreszcenciás módszerrel (zöld) detektáltam, míg a DNS-t PI-dal (piros).

3.1.2. A Dox hatása H2A és H2B hiszton mobilitására minimális

Pásztázó lézer mikroszkópos kísérleti rendszerünkben a H2A sejtmagon belüli aggregációját mutattam ki, ami nem társult H2B aggregációval. A hisztonok Dox hatására bekövetkező aggregációjának *in vitro* vizsgálatára Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiás módszert (FCS) használtunk, mellyel vizsgáltuk a $36\mu\text{M}$ Dox (és Dox + PYR-41 együttes kezelés) hatását e két hiszton mobilitására PBS oldatban. A PYR-41 az E1 ubiquitin-aktiváló enzim sejtpermeabilis, irreverzibilis gátlószere. A két rekombináns hisztont a kísérlet előtt Dylight-650 fluoreszcens festékkel megjelöltem, és a kísérlet során az FCS méréshez szükséges 200 nM -os

koncentrációba hígítottam. A H2A hiszton diffúziós ideje (ami a diffúziós állandóval, így a molekula méretével is arányos) Dox hozzáadása után 2.25 ms-ról 3.07 ms-ra nőtt (36%-os változás), míg a H2B diffúziós ideje 3.69 ms-ról 4.51 ms-ra nőtt (22%-os változás). Dox + PYR-41 együttes jelenléte a kezeletlen mintához képest még kisebb mértékben növelte (2.25ms-ról 2.66ms-ra (18%-os változás)) a H2A molekulák diffúziós idejét, míg Dox jelenlétében a H2B molekulák diffúziós ideje megegyezett a Dox + PYR-41 együttes jelenlétében mért értékkel (4.51 ms). (6. ábra). A Dox jelenlétében mért kis fokú (22-18%-os) diffúziós idő csökkenése nem utal a hisztonok *in vitro* aggregációjára, ez utóbbi esetben a diffúziós idő jelentősebb csökkenése lenne várható a multimer jelenléte következtében [246].

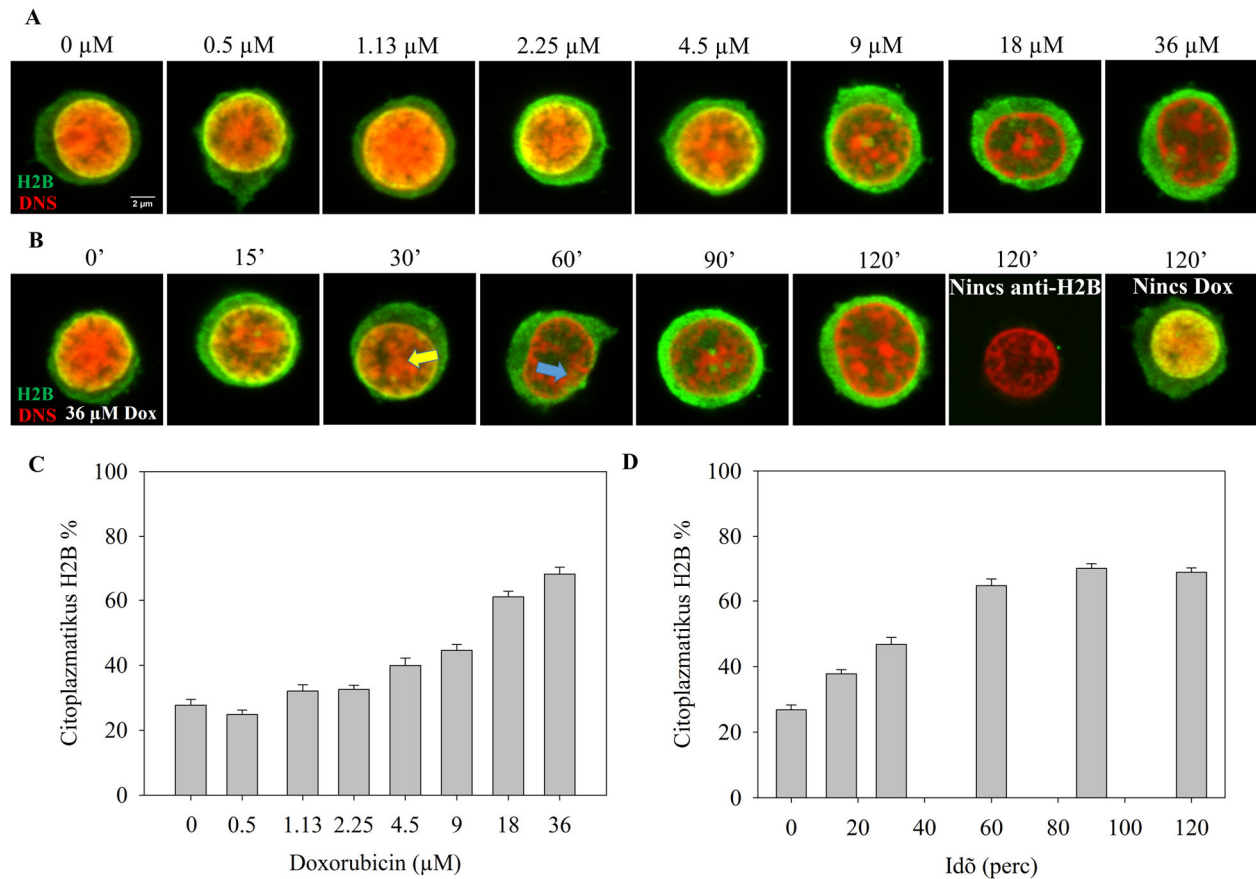


6. ábra. Dox hatása fluoreszcens festékkel jelölt H2A és H2B mobilitására oldatban Fluoreszcencia Korrelációs Spektroszkópia (FCS) módszerrel. *Fluoreszcens festékkel jelölt H2A (A) és H2B (B) hisztonok autokorrelációs görbéi kontroll mintákon (pontozott vonal), 36 μ M Dox (szaggatott vonal) és 36 μ M Dox + 50 μ M PYR-41 (szaggatott-pontozott vonal) jelenlétében. Folytonos vonal jelzi a szabad festék autokorrelációs görbét. Az ábrán mintánként 6 mérés átlagolt eredményét ábrázoltam, 1 mérés során a műszer 20 különböző adatsort rögzített 10 másodperces mérési idővel. A diffúziós időt a görbék inflexiós pontjánál (nyíl) olvastam le.*

3.1.3. A H2B hiszton nukleo-citoplazmatikus transzlokációja

3.1.3.1. A Dox kezelés az endogén H2B hisztonok masszív nukleo-citoplazmatikus transzlokációját okozza Jurkat sejteken

Dox hatására a H2B hiszton a H2A-tól teljesen eltérően viselkedik. Míg a H2A a sejtmagban aggregálódik (5.E ábra), nem észlelhető a H2B hiszton aggregációja a magon belül (7. ábra), viszont megváltozik a fehérje sejten belüli eloszlása. Ahogy az az 7. ábrán látszik, a H2B hiszton Dox koncentráció és időfüggő módon eltűnik a sejtmagból és felhalmozódik a citoplazmában. Gradiens alakul ki - körülbelül háromszor annyi H2B transzlokálódik a citoplazmába, mint amennyi a magban marad - így feltételezhető, hogy ez egy aktív folyamat, ami már kb. 1-2 μM Dox koncentrációnál észlelhető (7.C ábra). A kezelés 15-30. percében a sejtmag centrális részéről tűnik el a H2B hiszton, később egyre inkább a mag perifériájáról is, miközben a citoplazmában folyamatosan emelkedő hiszton szint mérhető (7.B és D ábrák). A 2 órás kezelés végére a H2B hiszton nagy része eltűnik a sejtmagból, és felhalmozódik a citoplazmában.



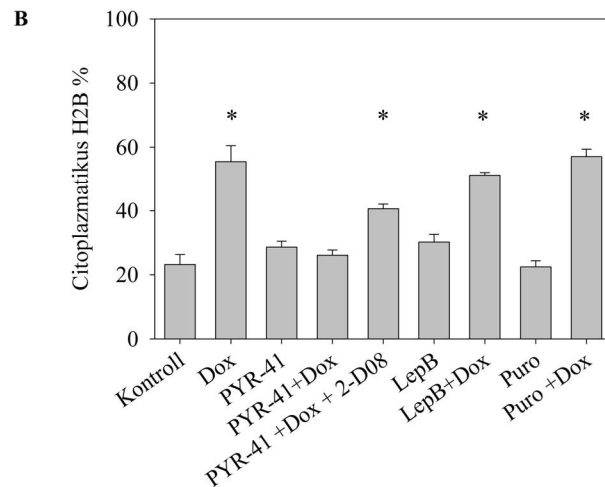
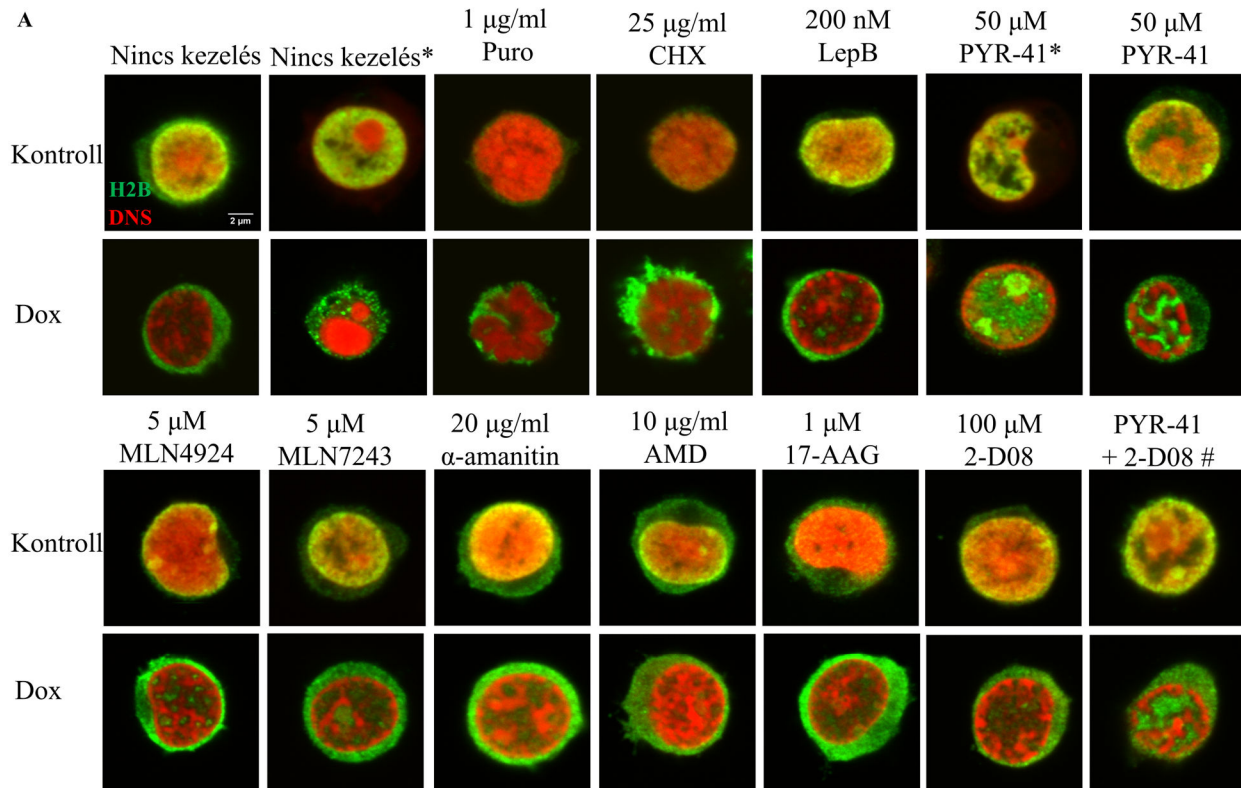
7. ábra. Dox okozta endogén H2B hiszton nukleo-citoplazmatikus transzlokáció Jurkat sejteken. (A) A H2B nukleo-citoplazmatikus transzlokációjának Dox koncentráció függése (egyedi képek felett, μM-ban jelölve). Fixált Jurkat sejtek esetében a H2B-t immunofluoreszcens jelöléssel detektáltam (zöld), a DNS-t PI-dal festettem (piros). Az ábrán konfokális mikroszkóppal készült, reprezentatív képek láthatók. (B) A Dox indukált H2B nukleo-citoplazmatikus transzlokációjának időfüggése. A sárga nyilak a H2B eltűnését jelzik a centrális, a kék nyilak pedig a perifériás kromatin régiókból. Az ábrán látható kontroll sejteket Dox nélkül („nincs Dox” felirat) inkubáltam, illetve olyan kontroll minta is látható, amelyhez Dox kezelés után csak másodlagos antitestet adtam („nincs anti-H2B” felirat). A H2B hiszton és a DNS jelölése hasonlóan történt, mint az (A) rész esetében. A műszer beállítása (lézer teljesítmény, fotoelektron sokszorozó feszültség, erősítés) és az ImageJ képkiértékelő program beállításai úgy lettek megadva, hogy a citoplazmatikus H2B detektálható legyen a kontroll sejtek esetében is. Ezek a beállítások minden összehasonlított minta esetében azonosak voltak az (A) és (B) rész esetében egyaránt. (C-D) Az (A) és (B) panel mikroszkópos képeinek számszerűsítése. Az összes H2B

immunofluoreszcenciát meghatároztam a citoplazmában és normalizáltam a teljes sejtben mért immunofluoreszcenciával az Anyagok és Módszerek fejezetben leírt módon. A hibavonalak SEM értékeket jelölnek, melyek a mintákon belül a sejtek heterogenitását jelzik.

3.1.3.2. A különböző gátlószerek eltérő mértékben hatnak a H2B nukleo-citoplazmatikus transzlokációjára

A munka következő részében megvizsgáltam, milyen mechanizmusok játszhatnak szerepet a H2B citoplazmatikus felhalmozódásában. Ehhez Jurkat sejteket olyan, különböző biokémiai folyamatokat gátló szerekkel kezeltem, melyek hozzájárulhatnak a H2B felhalmozódáshoz a citoplazmában (8. ábra). Azt a lehetőséget, hogy a megnövekedett citoplazmatikus H2B szint oka *de novo* fehérjeszintézis, kizártam, ugyanis a fehérjeszintézist puromycinnel vagy cikloheximiddel gátolva is magas H2B szinteket mértem a citoplazmában Dox kezelés hatására. A CRM1 mediált nukleáris exportot LepB-vel gátoltam (8. ábra), de a kezelés nem csökkentette a Dox indukált citoplazmatikus H2B transzlokációt. Így felmerült a lehetősége annak, hogy az antraciklinek hatására létrejövő hiszton aggregátumokat esetleg a sejt bizonyos biokémiai folyamatokon keresztül felismeri, exportálja a sejtmagból és lebontja [247]. Ahhoz, hogy pontosabban megérthessük a H2B megjelenését a citoplazmában, ezeket az útvonalakat is gátoltam. A H2B sejtmagi exportja erőteljesen gátolható PYR-41-gyel, mely több különböző biokémiai folyamatra hat egyszerre, köztük az E1-gátláson keresztül az ubiquitin aktivációját gátolja [248]. Ha a sejteket Dox-szal és PYR-41-gyel egyszerre kezeltem, a H2B hiszton nem jelent meg a citoplazmában, de egy karakterisztikus mintázatot adott a sejtmagban, továbbá a H2B és a DNS-t tartalmazó kromatin elkülönült egymástól (8.A ábra). Ez a mintázat hasonlít az 5.E ábrán látható H2A sejtmagi eloszláshoz, ami az önmagában adott Dox kezelés hatására jött létre. Felmerült a lehetősége annak, hogy Dox + PYR-41 együttes kezelés esetén a H2B a sejtmagban aggregálódik, így pásztázó lézer mikroszkópos rendszerünkben megvizsgáltam, hogy a Dox + PYR-41 együttes kezelés hatására kialakult trabekulált H2B mintázat létrejöttében szerepet játszik-e a H2B hisztonok aggregációja. Kimutattam, hogy Jurkat sejtek esetében a PYR-41 (mely a H2B nukleo-citoplazmatikus export gátlásáért felelős) jelenléte Dox kezelés során nem volt hatással a H2B sejtmagban mérhető mennyiségére Triton X-100-zal történő lízis után (a disszertáció alapját képező I. cikk [168] kiegészítő S6 ábrája).

A Dox hatására bekövetkező H2B export nem szüntethető meg sem más ubiquitinációt (MLN7342), sem NEDD-ilációt (MLN4924), sem SUMO-ilációt (2-D08) gátló szerekkel. A 2-D08-cal történő együttes kezelés azonban részben antagonizálta a PYR-41 hatását, így ebben az esetben kisebb mértékű volt a Dox hatására bekövetkező H2B felhalmozódás a citoplazmában. Ugyanakkor sem a transzkripció gátlószerei (α -amanitin vagy aktinomycin D), sem egy Hsp90 gátlószer (17-AAG) nem befolyásolták a Dox hatására bekövetkező H2B felhalmozódást a citoplazmában. Ezekben a kísérletekben két különböző H2B ellenes antitesttel (monoklonális és poliklonális) is ki tudtam mutatni a citoplazmában a megnövekedett H2B szintet. Mindkét kereskedelmi forgalomban kapható antitestet elterjedten használják H2B hiszton jelölésére, nagy érzékenységgel és specificitással [249-251]. A másodlagos antitest aspecifikus kötődését kizártam, ugyanis ha a sejteket elsődleges antitest adása nélkül csak másodlagos antitesttel inkubáltam, nem kaptam immunofluoreszcens jelet (8. ábra).



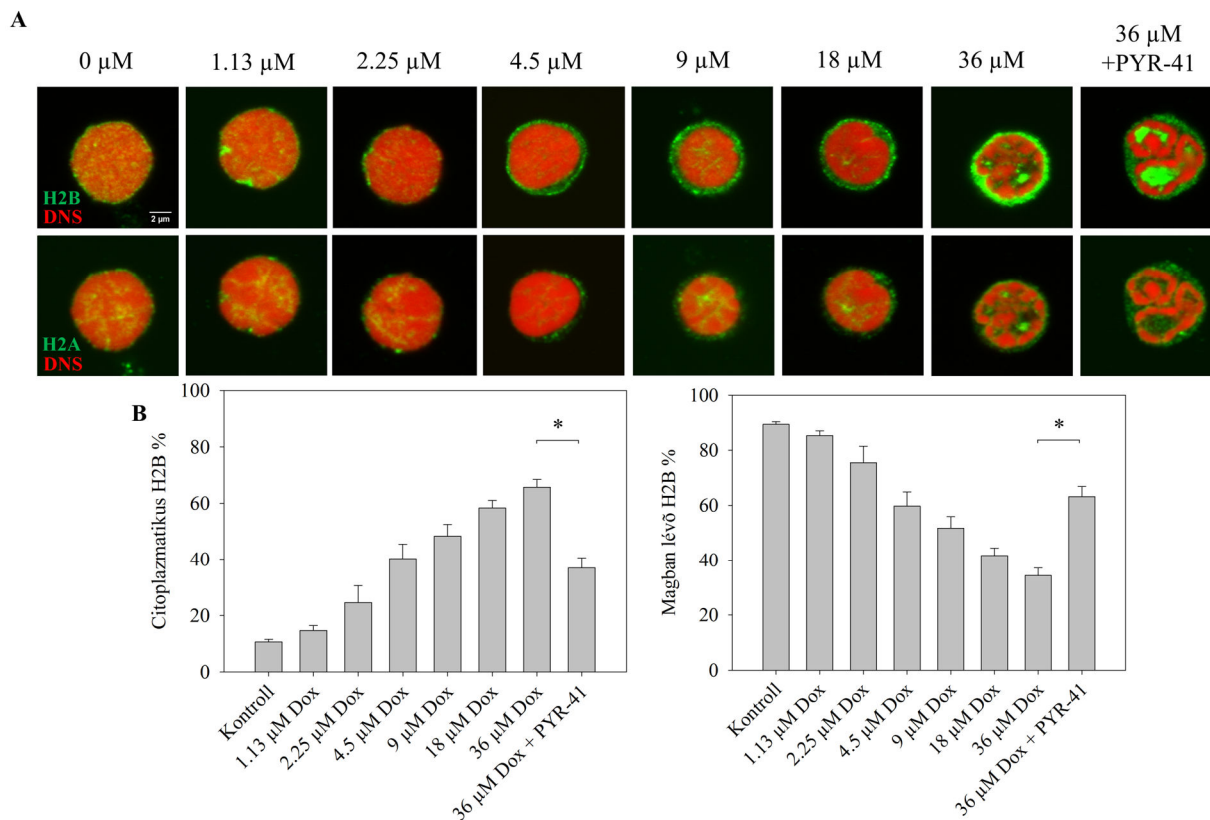
8. ábra. Különböző gátlók hatása a H2B nukleo-citoplazmatikus transzlokációjára.

(A) Jurkat sejteket 36 µM Dox-szal és az ábrán szereplő gátlószerekkel egyszerre kezeltem 2 órán keresztül, melyet fixálás és immunfluoreszcens jelölés követett, hasonlóan az 5.E ábrán bemutatott kísérlethez. A H2B hisztont monoklonális H2B ellenes antitesttel jelöltem, kivéve a csillaggal (*) jelölt minták esetében, ahol poliklonális H2B elleni antitestet használtam (lásd Anyagok és módszerek). # jelöli azt a mintát, ami 50 µM PYR-41-gyel és 100 µM 2-D08-cal egyszerre volt kezelve (felső kép), vagy a 2 gátlószerekkel és 36 µM Dox-szal voltak egyszerre kezelve

*(alsó kép). A DNS festése PI-dal (piros), a H2B jelölése immunofluoreszcens módon (zöld) történt. Az ábrán konfokális mikroszkóppal készült, reprezentatív képek láthatók. (B) A PYR-41, PYR-41 + 2-D08, LepB és Puro gátlószerekkel önmagában kezelt, illetve +Dox-szal együttesen kezelt minták fluoreszcens mikroszkópos képeinek kvantitatív analízise. A citoplazmatikus és összes H2B szint meghatározása azonos az előző ábrán leírtakkal. A hibavonalak SEM értékeket jelölnek, melyek a mintákon belül a sejtek heterogenitását jelzik. * jelöli a szignifikáns különbséget a kezeletlen kontroll mintához képest, melyet egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA) és Holm-Sidak post hoc teszttel számoltam ($p < 0.001$).*

3.1.3.3. A Dox kezelés az endogén H2B hisztonok masszív nukleo-citoplazmatikus transzlokációját okozta hPBMC sejtekben

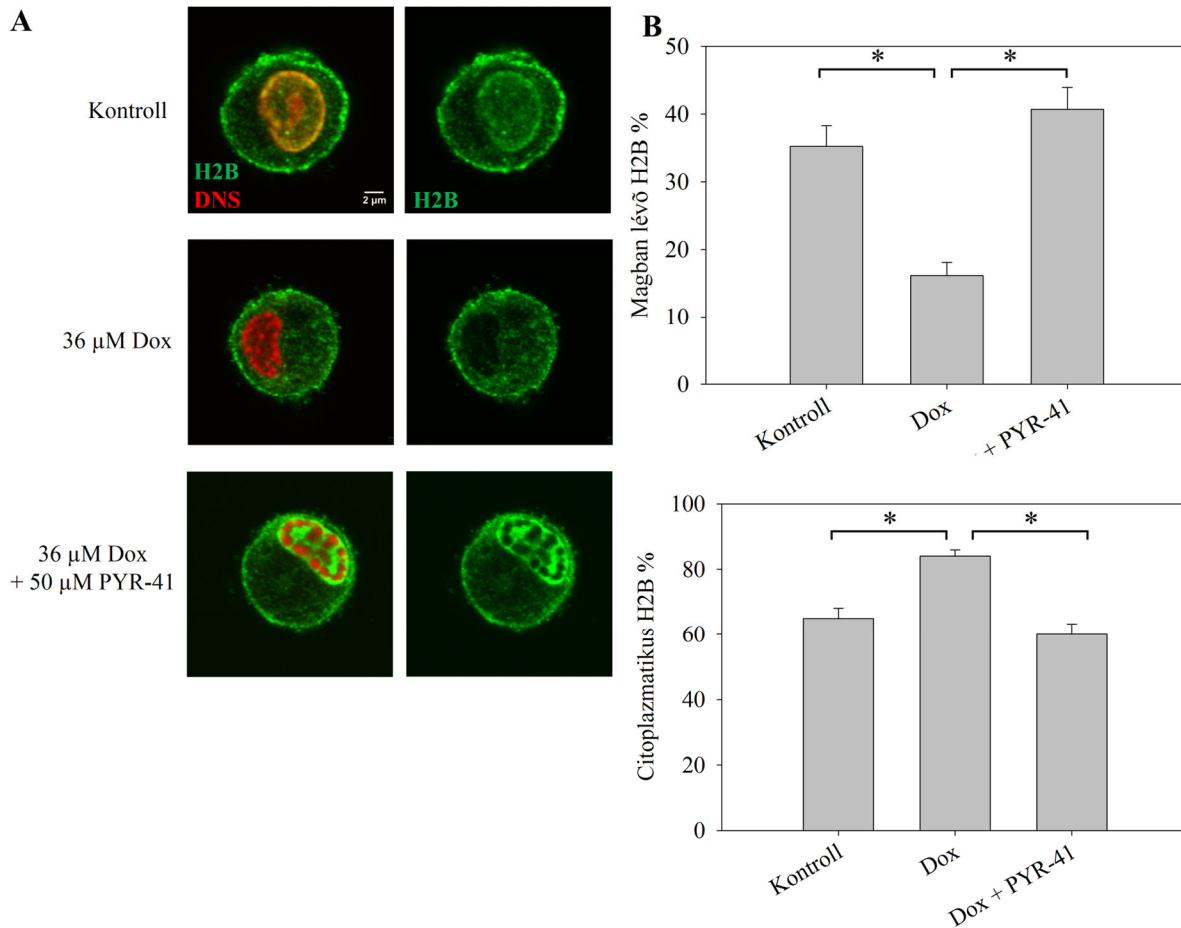
Primer humán limfoid sejtekben is kimutattam a H2B hiszton citoplazmatikus transzlokációját. Ahogy az a 9. ábrán látható, a Dox kezelés a H2B hiszton magi szintjének csökkenését és citoplazmatikus felhalmozódását eredményezte emberi perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek (hPBMC) esetében is. Hasonlóan a Jurkat sejtekben észlelt jelenségekhez, a Dox kezelés nem eredményezett H2A transzlokációt a hPBMC sejtek citoplazmájába, viszont a hiszton kromatinból történő kiválását idézte elő, amit a trabekulált immunofluoreszcens festődési mintázat mutat. A PYR-41 kezelés a Jurkat sejtek esetében észleltekhöz hasonlóan gátolta a H2B citoplazmatikus transzlokációját, a hisztonok a magon belül, de a kromatinon kívülre helyeződtek át.



9. ábra. Dox indukált masszív H2B hiszton nukleo-citoplazmatikus transzlokációja hPBMC sejteken (H2A transzlokációja nélkül). (A) Felső sor: H2B nukleo-citoplazmatikus transzlokációjának Dox koncentráció függése. Alsó sor: A felső sor sejteiben mért H2A immunofluoreszcencia (zöld). A sejteket 2 órán át vagy csak Dox-szal kezeltem vagy egyszerre Dox-szal + 50 μM PYR-41-gyel. A DNS-t PI-dal festettem. Az ábrán szereplő színek az előző ábrák esetében leírt molekulákat jelölik. Az ábrán konfokális mikroszkóppal készült, reprezentatív képek láthatók. (B) Az (A) rész fluoreszcens mikroszkópos képeinek kvantitatív analízise. A citoplazmatikus, sejtmagban lévő és összes H2B szint meghatározása azonos a korábbi ábrákon leírtakkal. A hibavonalak SEM értékeket jelölnek, melyek a mintákon belül a sejtek heterogenitását jelzik. * jelöli a szignifikáns különbséget a minták között, melyet Student-féle t-próbával számoltam ($p < 0.001$).

3.1.3.4. A Dox és PYR-41 együttes kezelés hatása monocita eredetű dendritikus sejtek (DC) citoplazmatikus H2B szintjének csökkenését okozza

Az extranukleáris H2B hiszton jelenléte fontos szerepet játszik a veleszületett immunitásban [213, 240-242], ezért megvizsgáltam a Dox hatását emberi monocita eredetű DC sejtek citoplazmatikus H2B eloszlására is. Érdekes módon a H2B a DC sejtek citoplazmájában kezelés nélkül is meglepően nagy mennyiségben jelen volt, Dox alkalmazásával azonban a korábbi kísérletekhez hasonló eredményeket kaptam. A kezelés hatására szinte teljesen eltűnt a H2B hiszton a sejtmagból, ami PYR-41 együttes adásával antagonizálható volt (10. ábra).

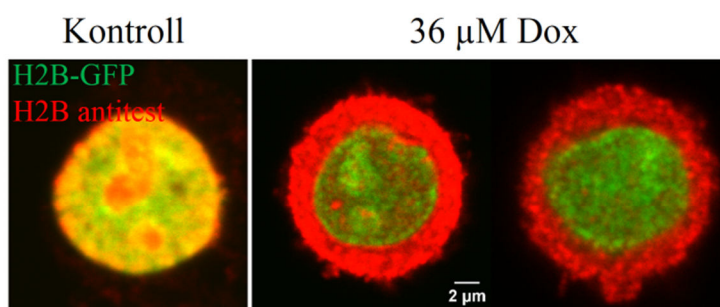


10. ábra. A Dox és PYR-41 kezelés hatása monocita eredetű DC sejtek citoplazmatikus H2B szintjére. (A) A dendritikus sejteket az ábrán látható anyagokkal 2 órán át kezeltem, fixáltam, majd monoklonális antitest segítségével immunofluoreszcensen megjelöltem a H2B-t (zöld) és PIdal festettem a DNS-t (piros). Az ábrán konfokális mikroszkóppal készült, reprezentatív képek láthatók. (B) Az (A) rész fluoreszcens mikroszkópos képeinek kvantitatív analízise. A citoplazmatikus, sejtmagban lévő és teljes H2B szint meghatározása azonos az előző ábrákon

leírtakkal. A hibavonalak SEM értékeket jelölnek, melyek a mintákon belül a sejtek heterogenitását jelzik. * jelöli a szignifikáns különbséget a minták között, melyet Student-féle t-próbával számoltam ($p < 0.001$).

3.1.3.5. GFP-vel jelölt H2B hiszton nem mutat Dox függő nukleo-citoplazmatikus transzlokációt

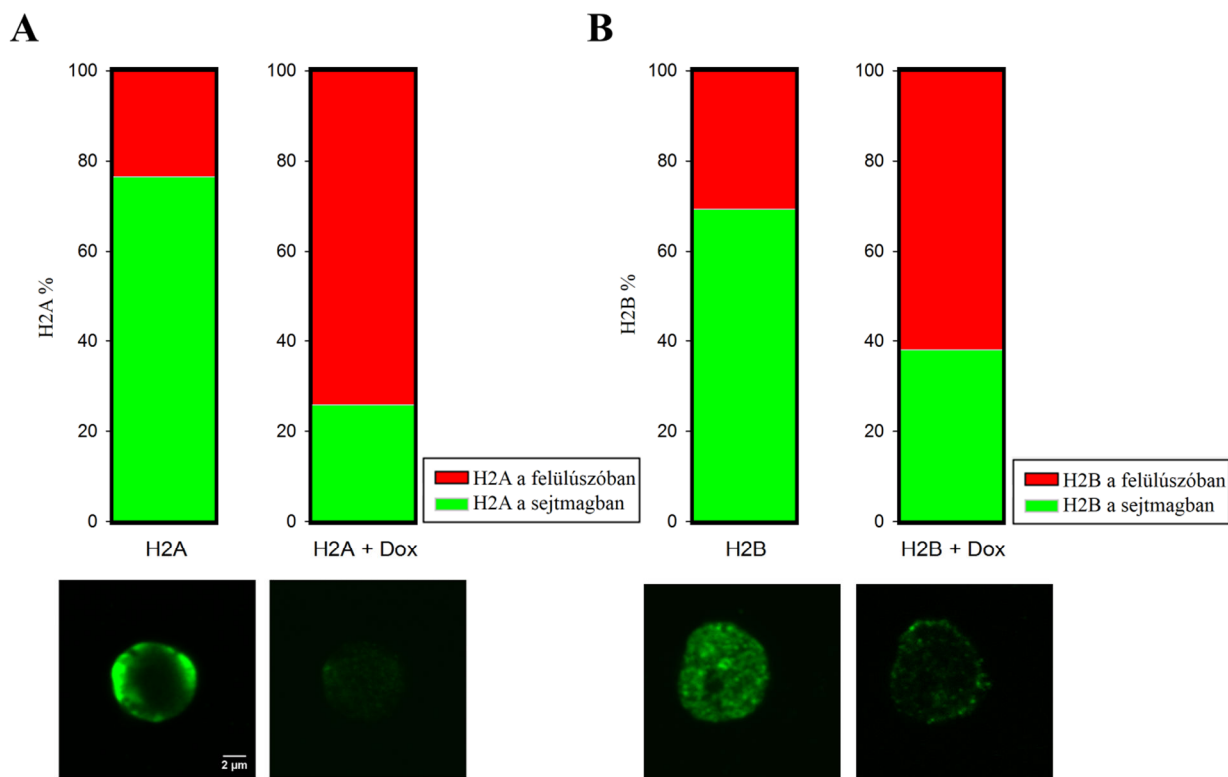
Többféle sejtvonalon (Jurkat, hPBMC és DC) kimutattam az endogén H2B Dox által indukált nukleo-citoplazmatikus transzlokációját. A következőkben megvizsgáltam a Dox kezelés hatását GFP-vel jelölt H2B hiszton expresszáló HeLa sejtekre is. Amennyiben a monoklonális antitesttel jelölt endogén H2B-t és a GFP-kapcsolt H2B-t egyszerre detektáltam konfokális mikroszkóp segítségével, Dox hatására az endogén H2B citoplazmába történő transzlokációja mellett nem mutattam ki a GFP-kapcsolt H2B transzlokációját. Lehetséges magyarázat erre, hogy a hisztonhoz kapcsolt GFP csoport mérete miatt nem képes a H2B a sejtmagból kidiffundálni. A kísérlet során a H2B-GFP fluoreszcencia intenzitása valamelyest csökkent, feltehetően a Dox fluoreszcenciát kioltó hatása miatt (11. ábra).



11. ábra. A Dox hatása endogén és GFP-kapcsolt H2B-re. Az ábrán konfokális mikroszkóppal készült, reprezentatív képek láthatók 2 órás 36 μM Dox kezelt és kezeletlen H2B-GFP-t (zöld) expresszáló sejteken; az endogén H2B-t immunofluoreszcensen jelöltem (piros).

3.1.3.6. A Dox által indukált H2B nukleo-citoplazmatikus transzlokációjának megerősítése tömegspektrometriás módszerrel

A sejtmagban maradt H2B immunfluoreszcens detektálásával párhuzamosan kvantitatív tömegspektrometriával mértük (Kalló Gergő és Csősz Éva közreműködésével a Proteomika Szolgáltató Laboratóriumban) a lízis során a felülúszóba kerülő citoplazmatikus frakció fehérjéit, megerősítve a nukleo-citoplazmatikus H2B exportot valószínűsítő immunfluoreszcenciás eredményeimet (12. ábra). A kísérlet során a kontroll mintához viszonyítva emelkedett H2B szintet mértünk a Dox kezelt sejtek lizátumában, miközben a magban maradt H2B mennyisége ezzel egy időben csökkent, utóbbit konfokális mikroszkóppal detektáltam.



12. ábra. Dox indukált H2A és H2B hiszton átrendeződés. *H2A (A panel) és H2B (B panel) hisztonok sejtmagban (zöld), valamint a felülúszóban (piros) mért megoszlása. A sejtek lizálása agarózba ágyazás nélkül történt, a lízis után a sejtmagban maradó hisztonokat pásztázó mikroszkópos módszerrel, a lizátum felülúszójából pedig tömegspektrometriás módszerrel*

detektáltuk. Az A és B részen látható arányokat az Anyagok és Módszerek fejezetben leírt módon számoltam. Az ábrán konfokális mikroszkóppal készült, reprezentatív képek láthatók a sejtmagokról a lízis után (a H2B hiszton zöld színnel van jelölve).

Tömegspektrometriás mérésekkel kimutattuk azt is, hogy Dox kezelés hatására sok egyéb hiszton (1. táblázat) és magi fehérje (2. táblázat) is megjelent a citoplazmatikus frakciót tartalmazó lizátumban. Ilyen kísérleti körülmények között (Triton X-100 általi lízis és az ezt követő centrifugálás, lásd Anyagok és Módszerek) kiemelkedően magas H1.2-t detektáltunk a Dox kezelt sejtek lizátumának felülúszójában, de a hisztonok közül csak a H2B lizátumban történő megjelenése volt PYR-41-re érzékeny. Számos egyéb (nem hiszton) magi fehérje is megjelent a citoplazmában ilyen körülmények között (2. táblázat). A nem-hiszton magi fehérjék Dox hatására bekövetkező citoplazmatikus megjelenésének foka és ennek PYR-41 érzékenysége is nagyban különbözött.

Hiszton	Fehérje neve	Kontroll	Dox	Dox + PYR-41	Dox /Kontroll	Dox + PYR-41 /Kontroll
H1.2	Histone H1.2	7,14E-04	5,24E-03	9,80E-03	7,34	13,73
H1.5	Histone H1.5	1,44E-03	3,00E-03	4,08E-03	2,09	2,84
H2A	Histone H2A type 1-J	1,39E-03	4,37E-03	2,63E-03	3,15	1,90
H2B	HIST1H2BC	2,06E-03	4,17E-03	2,44E-04	2,02	0,12
H4	HIST1H4A	1,64E-03	3,95E-03	1,98E-03	2,41	1,21

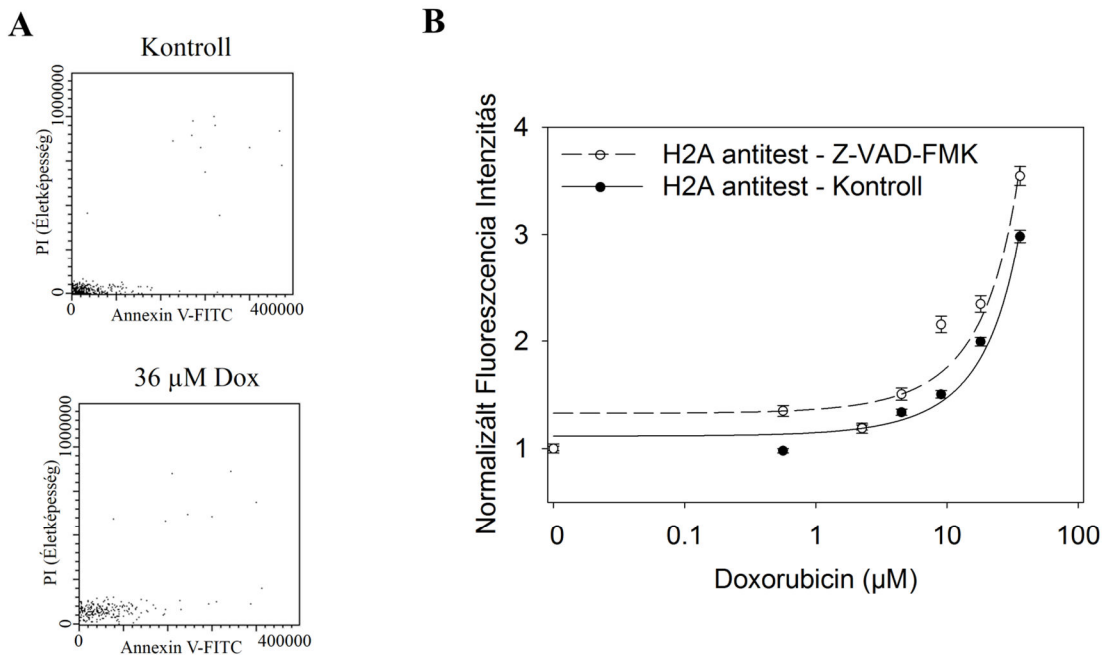
1. táblázat. Tömegspektrometriás módszerrel detektált hisztonok Dox, Dox + PYR-41 kezelt és kontroll sejtek lizátumaiban. A táblázatban szereplő értékek a hiszton-specifikus molekula fragmentumok arányai egy belső kontrollhoz viszonyítva. A Dox és Dox + PYR-41 kezelés által indukált változás arányát a kontrollhoz képest úgy számoltam ki, hogy a kezelt minták lizátumaiban detektált fehérjék mennyiségét elosztottam a kontroll mintákban lévő fehérjék mennyiségével: Dox; Dox + PYR-41 kezelt sejtek: Dox + PYR-41; Kezeletlen sejtek: Kontroll.

Fehérje funkciója	Megnőtt frakció	Példák	Változás aránya (Dox)	Változás aránya (Dox + PYR-41)
Kromatinszerkezet	9/9	<i>Isoform 2 of Nucleosome assembly protein 1-like 1</i>	6,70	2,81
		Regulator of chromosome condensation 2, isoform CRA_a	4,42	3,79
		Isoform 2 of Histone deacetylase 2	1,68	0,79
		Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	6,10	4,52
		Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma	2,80	2,60
Transzkripció / Ribonukleoproteinek/ Splicing	32/34	<i>U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa</i>	3,32	0,54
		Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, isoform CRA_d	2,39	1,87
		Pre-mRNA-processing factor 19	5,96	3,39
		RNA transcription, translation and transport factor protein	2,01	1,27
		Isoform 3 of 60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein	2,36	2,08
Replikáció/ DNS hibajavítás	20/20	<i>RuvB-like helicase (Fragment)</i>	3,11	1,23
		DNA helicase	2,28	2,42
		Poly (ADP-ribose) polymerase 1	2,70	2,07
		DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	2,83	1,41
		DNA replication licensing factor MCM6	2,72	2,84
Sejtmagi import/ export	8/8	<i>Importin-7</i>	2,78	0,52
		GTP-binding nuclear protein Ran	2,98	2,46
		Importin-5	2,35	2,24
		Importin subunit beta-1 OS	3,19	3,55
		Exportin-1	1,36	1,12
Ubiquitináció/ Proteaszóma/ SUMO-iláció	32/34	<i>Proteasome subunit alpha type</i>	2,72	0,63
		SUMO-activating enzyme subunit 2	2,52	2,40
		SUMO-activating enzyme subunit 1	1,60	2,26
		Polyubiquitin-B (Fragment)	3,54	4,25
		Proteasome activator complex subunit 2	2,00	2,11
Hősokk fehérjék	4/5	Heat shock 60kDa protein 1 (Chaperonin), isoform CRA_a	2,25	2,53
		Heat shock protein HSP 90-beta	2,51	2,58
		Heat shock 70 kDa protein 4	2,71	2,71
		Isoform Beta of Heat shock protein 105 kDa	2,34	2,16

2. táblázat. Példák tömegspektrometriával detektált sejtmagi, nem-hiszton fehérjékre Dox, Dox + PYR-41 kezelt és kontroll minták lizátumaiban. *A változás arányának számolása megegyezik az 1. táblázatban leírtakkal. A táblázat „megnőtt frakció” oszlopa jelzi a különböző funkcionális kategóriákban azoknak a fehérjéknek a számát, melyek mennyisége a lizátumban a kezelés hatására megnőtt. A PYR-41 + Dox kezelés hatására a Dox kezeléshez képest csökkent mennyiséget mutató fehérjék dőlt betűvel vannak jelölve.*

3.1.4. Dox kezelés hatása a Jurkat sejtek életképességére

A továbbiakban megvizsgáltam annak a lehetőségét, hogy a H2B jelenléte a citoplazmában a csökkent életképesség következtében alakul ki. Ahogy a 13.A ábra mutatja, 2 órás kezelés után a sejtek nem mutatnak megnövekedett PI felvételt, sem Annexin-V kötést. (A PI jel minimális növekedést mutatott a Dox kezelt sejtek esetében, ugyanis a Dox fluoreszcencia emissziója részben átfed a PI emissziós spektrumával, így ezt részlegesen detektáltam a kísérlet során használt szűrőkészlettel (lásd Anyagok és Módszerek)). Mivel a H2A Dox-indukálta aggregációja nem volt érzékeny kaspáz inhibitor (Z-VAD-FMK) kezelésre (13.B ábra), feltételezhető, hogy az észlelt aggregációs és transzlokációs jelenség oka nem a Dox toxicitása. A Dox koncentráció-függő toxicitását 24 órás Dox kezelést követően resazurinnal vizsgáltuk ([168] (a disszertáció alapját képező I. cikk 6.C ábrája; Erfaneh Firouzi Niaki munkája)). A normalizált izobologram alapján [168] (a disszertáció alapját képező I. cikk 6.D ábrája, Erfaneh Firouzi Niaki munkája) Dox + PYR-41 (ami a H2B nukleo-citoplazmatikus transzlokációját gátolta; lásd 8. ábra) kezelés szinergisztikusan fejtette ki a hatását, mely arra utal, hogy a citoplazmában felhalmozódó H2B nem járul jelentősen hozzá hosszú távon a toxicitáshoz. Ezt az is alátámasztja, hogy 2 órás Dox kezelés és Dox + PYR-41 együttes kezelés a sejtosztódást hasonlóan gátolta [168] (a disszertáció alapját képező I. cikk 6.B ábrája, Erfaneh Firouzi Niaki munkája), melyet CellVue festék-hígításos kísérleti rendszerben mértünk 2 nap után.



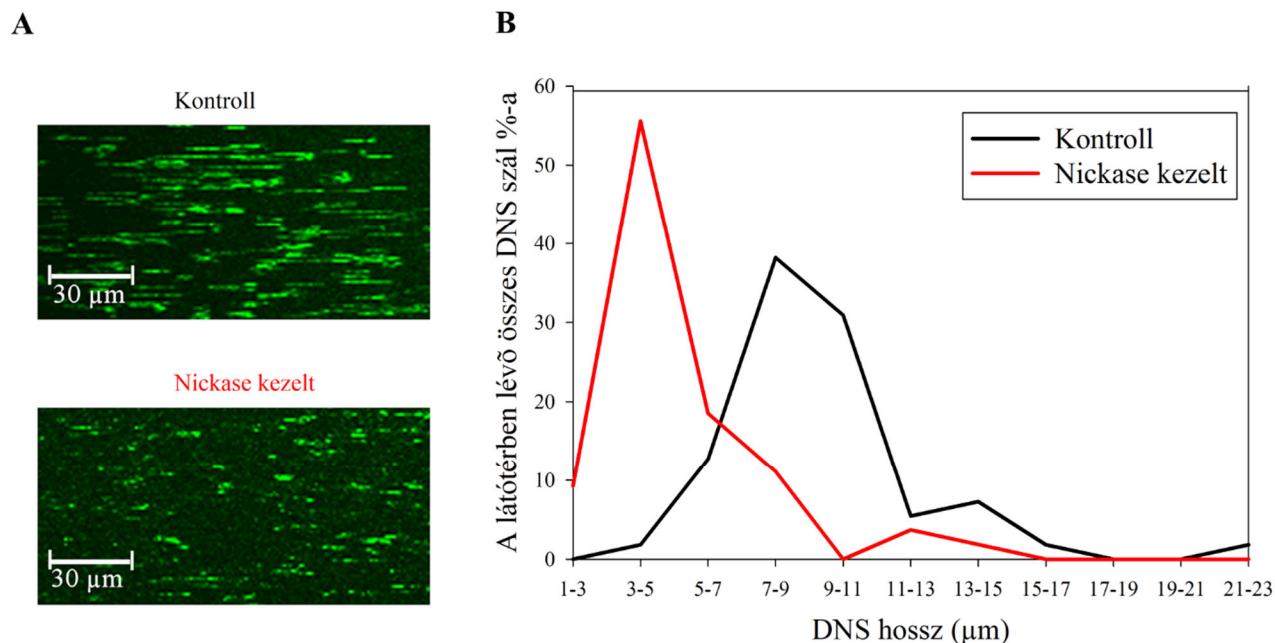
13. ábra. Dox kezelés hatása a Jurkat sejtek életképességére. (A) Az életképességet kontroll sejteknél és 36 μ M Dox kezelés után azonnal megmértem. Az ábrák az Annexin-V-FITC és PI festés fluoreszcencia értékeit mutatják G_1 kapuzott sejtek esetében. (B) Élő sejteket 2 órán át különböző koncentrációjú Dox-szal kezeltem 10 μ M Z-VAD-FMK jelenlétében (szaggatott vonal) vagy anélkül (folytonos vonal). A fluoreszcencia intenzitásokat normalizáltam a kezeletlen sejtek fluoreszcencia intenzitására. A hibavonalak SEM értékeket jelölnek.

3.2. A kromatin topológiai heterogenitása

3.2.1. DNS szálfolytonosság-hiányok detektálása DNS combing technika alkalmazásával

3.2.1.1. A DNS molekula törékenysége megnő az egyszál folytonosság-hiányok következtében DNS combing kísérletek során

A kísérleteim következő részéhez először optimalizáltam egy DNS „molecular combing” alapú kísérleti rendszert, mellyel üveg fedőlemezekre rögzített, egymás mellett párhuzamosan kitapadt egyedi DNS szálak külön-külön, fluoreszcens módon láthatóvá tehetőek. A rendszer segítségével megvizsgáltam a szálfolytonosság-hiányokat tartalmazó DNS szálak viselkedését. Az eljárás során a Lambda fág DNS bizonyos helyein nickase enzimmel egyszál folytonosság-hiányokat hoztam létre. A nickase-zal kezelt és kezeletlen kontroll mintákat minimális pipettázást alkalmazva a DNS combing módszer segítségével fedőlemezekre rögzítettem, és a kitapadt DNS molekulákat fluoreszcensen megjelöltem (lásd Anyagok és Módszerek). A mintákról konfokális mikroszkóppal készült képeket analizálva megmértem a kitapadt DNS szálak átlagos méretét a nickase kezelt és a kontroll minta esetében. Tapasztalataink alapján a nickase kezelés hatására a mintában létrejött szálfolytonosság-hiányok következtében a Lambda fág DNS kisebb darabokra tört a kezeletlen kontrollhoz képest (14. ábra), tehát a combing kísérleti rendszerben az egyszál folytonosság-hiányok helyén a DNS molekulákban duplaszál törés keletkezhet. Ezen jelenség a további combing adatok értékelése szempontjából bizonyult lényegesnek.



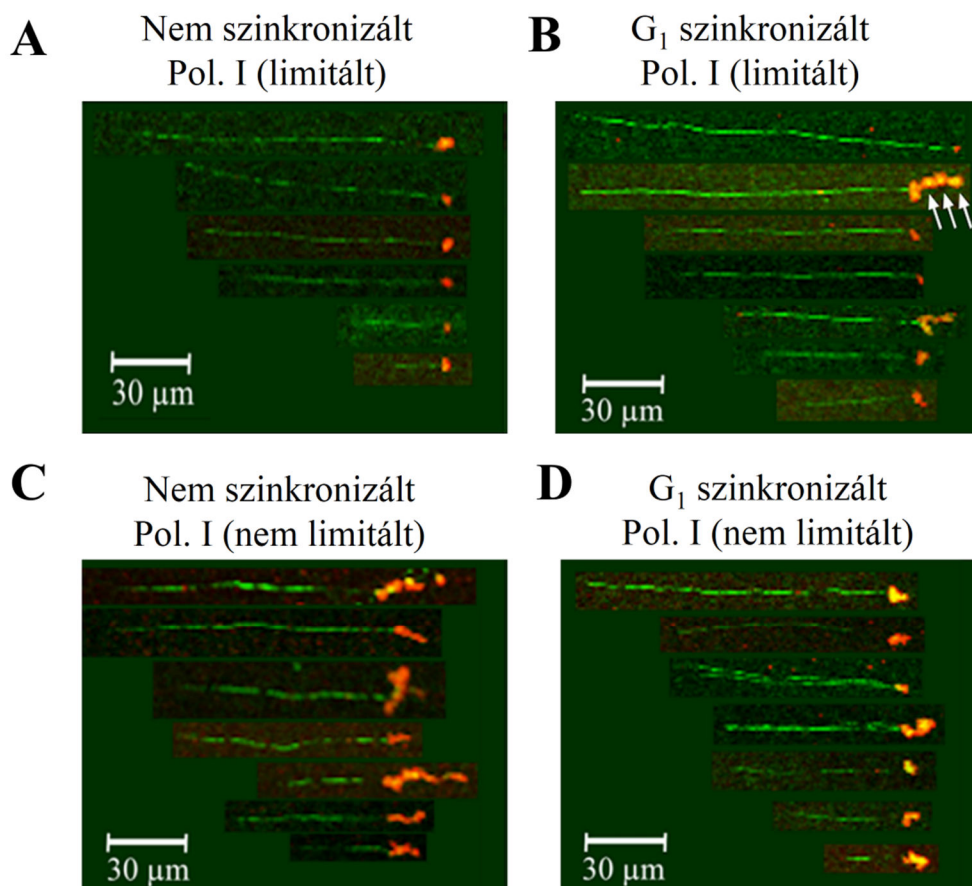
14. ábra. Egyszál folytonosság-hiányok hatása a DNS szálak méretére Lambda fág DNS modellen. *A Lambda fág DNS molekuláris combingja. (A) Reprezentatív konfokális mikroszkópos képek a YOYO-1 festékkal festett (zöld) kezeletlen kontroll és *Nt.BbvCI* nickase enzimmel kezelt mintákról. (B) A combing eljárással kezelt DNS-ek méretének eloszlási hisztogramja nickase kezelés előtt (fekete) és után (piros). A duplaszálú Lambda fág DNS teljes hossza (48,5 kb) 16,2 μm-nek felel meg a képeken. (3 bp/nm helikális ismétlődési hosszúsággal számolva), tehát a Lambda fág DNS nagy része pusztán a combing folyamat hatására már fragmentálódik, melynek mértéke nickase hatására jelentősen fokozódik.*

3.2.1.2. 3' OH csoportot tartalmazó DNS egyszál folytonosság-hiányok enzimátikus jelölése élesztő XII. kromozómán

Az emberi genomi DNS vizsgálatát megelőzően a szálszakadások jellemzésére alkalmazott módszeremet egy modell-rendszerben is validáltam. A sörélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) XII. kromozómája tartalmazza az ún. rDNS klasztert, mely a kromoszóma jobb karján, az RDN1 lókuszon helyezkedik el. Az ~1-2 Mb méretű rDNS klaszter 100-200 tagú transzkripcionális egységekből épül fel, amik természetes módon megsokszorozódott DNS szakaszokból állnak. Az

rDNS szerepet játszik a magvacska szerkezetének kialakításában és a riboszómális RNS átírásában [252, 253]. Megvizsgáltam CHEF módszerrel izolált (Hegedüs Éva segítségével, lásd Anyagok és Módszerek) élesztő XII. kromoszómán az enzimatikusan jelölhető 3' OH csoportot tartalmazó egyszál folytonosság-hiányok eloszlását, melyeket *E. coli* DNS Polimeráz I (Pol I) enzimmel jelöltem meg (lásd Anyagok és Módszerek) (lásd 15. ábra). Ez az enzim templát-függő módon épít be biotinnal jelölt nukleotidokat a DNS folytonosság-hiány helyén lévő szálvégek szabad 3' OH csoportjához. Az ún. limitált jelölés során a biotinilált nukleotidokat tartalmazó keverékhez terminátor (ddNTP) nukleotidokat is adtam (15. A és B ábrák), amelyekhez enzimatikusan nem kapcsolható további jelölt nukleotid. A terminátor nukleotidok használata megakadályozza a jelölés tovaterjedését a DNS szakasz mentén, mely pontosabb lokalizációt eredményez. A kísérletek során gyakran a kitapadt DNS szálak végein detektáltam a jelölt egyszál folytonosság-hiányt, annak ellenére, hogy a combing kísérletben minimalizáltam a pipettázás okozta nyíróerők kialakulását, ami a DNS fragmentumok törését okozhatná a kísérlet során.

Mivel a szálfolytonosság-hiányok jelenléte elősegíti a combing kísérletek során a DNS molekulák törését (14. ábra), így az általam enzimátikus módon megjelölt endogén szálfolytonosság-hiányok mentén is törhet a DNS, amely megmagyarázza a combing kísérletek során a DNS szálak végeinek jelölődését. Érdekes módon csak nagyon kevés DNS szakasz tartalmazott jelet a szál mindkét végén (3. táblázat), így feltételezhető, hogy a szál egyik végén a szálfolytonosság-hiányokat halmozó rDNS klaszter található, míg a DNS szálak másik, jelölést nem hordozó végén pedig egy jelölhető 3' OH-t nem eredményező, feltehetően TopI eredetű törés van. A vizsgálat során olyan DNS szálak is megfigyelhetőek voltak limitált jelölést alkalmazva, melyek több jelölt szakaszt tartalmaztak egymástól ~10 kb távolságra (nyilak a 15.B ábrán). Ezek valószínűleg az rDNS klaszter transzkripciósi egységei. Sok esetben viszont pontszerű jelölést kaptam, ami azzal magyarázható, hogy az rDNS klaszter sokkal sűrűbben tartalmaz egyszál folytonosság-hiányokat a XII. kromoszóma többi részéhez képest, ami megnöveli az rDNS klasztert tartalmazó DNS szakasz törékenységét, így az rDNS transzkripciósi egységei változó számban maradtak a DNS szálak végein.



15. ábra. DNS egyszál folytonosság-hiányok jelölése Pol I-gyel élesztő XII. kromoszóma rendszeren limitált és nem limitált jelölési körülmények között. *Élesztő XII. kromoszóma DNS molekuláris combingja. Biotinnal jelölt nukleotidokat építettem be limitált (A és B) vagy nem limitált (C és D) jelöléssel agarózba ágyazott, nem szinkronizált (A és C), és α -faktorral G_1 fázisban szinkronizált (B és D) BY4741 élesztő sejtekből CHEF segítségével elválasztott XII. kromoszóma DNS-be. (A) Nem szinkronizált sejtek XII. kromoszómájának combingja, a jelölés Pol I enzimmel, limitált körülmények között történt. (B) G_1 szinkronizált sejtek XII. kromoszómájának combingja, a jelölés Pol I enzimmel, limitált körülmények között történt. Az egymás melletti nyilak a jelölt rDNS klaszter tandem génjeit jelölik. (C) Nem szinkronizált sejtek XII. kromoszómájának combingja, a jelölés Pol I enzimmel, nem limitált körülmények között történt. (D) G_1 szinkronizált sejtek XII. kromoszómájának combingja, a jelölés Pol I enzimmel, nem limitált körülmények között történt. A DNS-t YOYO-1 festékekkel (zöld), a beépített biotint egérben termelt biotin ellenes antitesttel, majd másodlagos antitestként Alexa Fluor 647-tel konjugált egér ellenes antitesttel*

jelöltem (piros). Előfordul, hogy a jelölt DNS szakaszok nem feszülnek ki a combing során a fedőlemeze, hanem nagy, fényes foltokat alkotnak a DNS szálak végein. Az ábrákat több, konfokális mikroszkóppal készült felvételen látható DNS szálak képeiből állítottam össze.

XII. kr. Pol I jelölés	Csak az egyik végen jelet tartalmazó szálak %-a	Mindkét végen jelet tartalmazó szálak %-a	Belső jelet tartalmazó szálak %-a
Limitált	19,9	0	2,1
Nem limitált	50,9	2,5	0,5

3. táblázat. Az egyik, illetve mindkét végén jelet hordozó DNS szálak százalékos eloszlása a combing kísérletek során. *Combing módszerrel kezelt, Pol I által jelölt élesztő XII. kromoszóma DNS szálainak jelölődési statisztikája limitált, és nem limitált jelölés esetén. Az egyik, illetve mindkét végén jelet hordozó DNS szálakat megszámláltam és elosztottam az összes DNS szál számával. Minden belső jelölést hordozó DNS szál legalább egyik végén jelölés detektálható.*

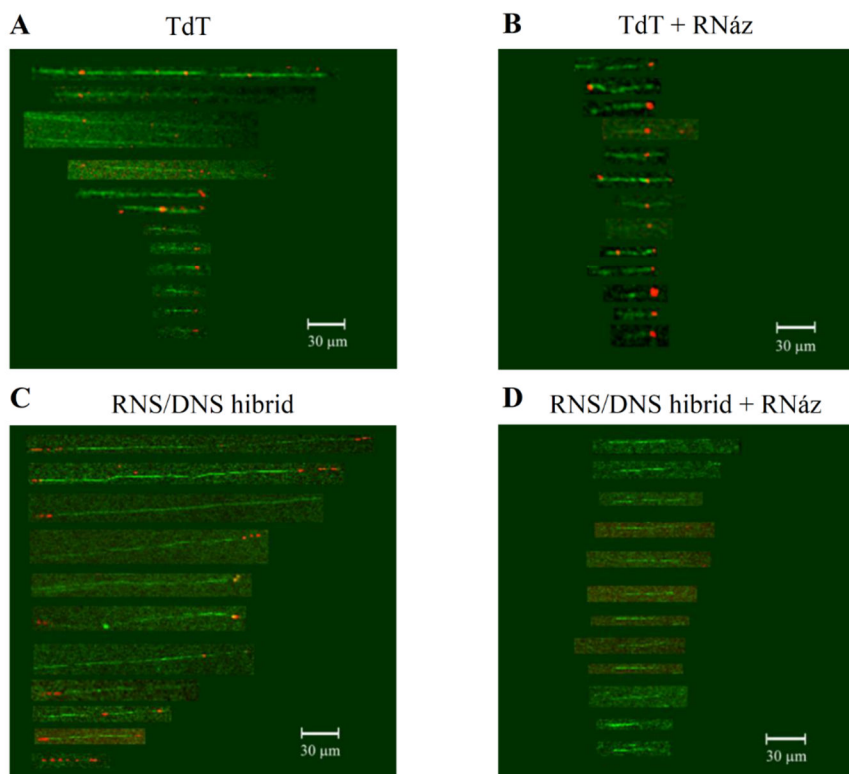
Ismert, hogy szálfolytonosság-hiányok DNS replikáció során az Okazaki fragmentek szintézise során jelentős mértékben keletkeznek, így megvizsgáltam ezek gyakoriságát α -faktor (13 aminosavas párzási feromon) segítségével G_1 fázisban szinkronizált élesztő sejtek DNS-ében is (15. B és D ábrák). A konfokális mikroszkóppal készült képek kiértékelése során megmértem a képeken az összes DNS szál hosszát és a jelölt szálfolytonosság-hiányok számát, majd ezekből kiszámoltam, hogy átlagosan mekkora DNS szakaszra esik 1 db szálfolytonosság-hiány. A nem szinkronizált sejtekből izolált DNS esetében átlagosan 100 kb-onként, míg G_1 szinkronizált sejtek esetében 150 kb-onként fordult elő a XII. kromoszómán jelölhető szálfolytonosság-hiány (lásd 4. táblázat). Ez a különbség valószínűleg a DNS replikáció következtében létrejövő és nem azonnal ligálódó Okazaki fragmentumok jelenlétével, illetve hiányával magyarázható a kétféle mintában.

	XII. kromoszóma DNS	
	Nem szinkronizált	G1 szinkronizált
Átlagos DNS szál méret (mely 1db jelölt szálfolytonosság-hiányt tartalmaz)	99,9 kb	154,6 kb
SD	21,8 kb	18,2 kb

4. táblázat. Pol I-gyel jelölt DNS szálfolytonosság-hiányok eloszlása α -faktorral G₁ fázisban szinkronizált és nem szinkronizált élesztő sejtek combingolt XII. kromoszóma DNS-ében. *A jelölt szálfolytonosság-hiányokat megszámláltam és elosztottam a DNS szálak összesített hosszával több látóteret tartalmazó konfokális mikroszkópos képen. A statisztika kiszámolásához ~300 szálát mértem le mintánként.*

3.2.1.3. DNS szálfolytonosság-hiányok jelölhetőek terminális transzferázzal

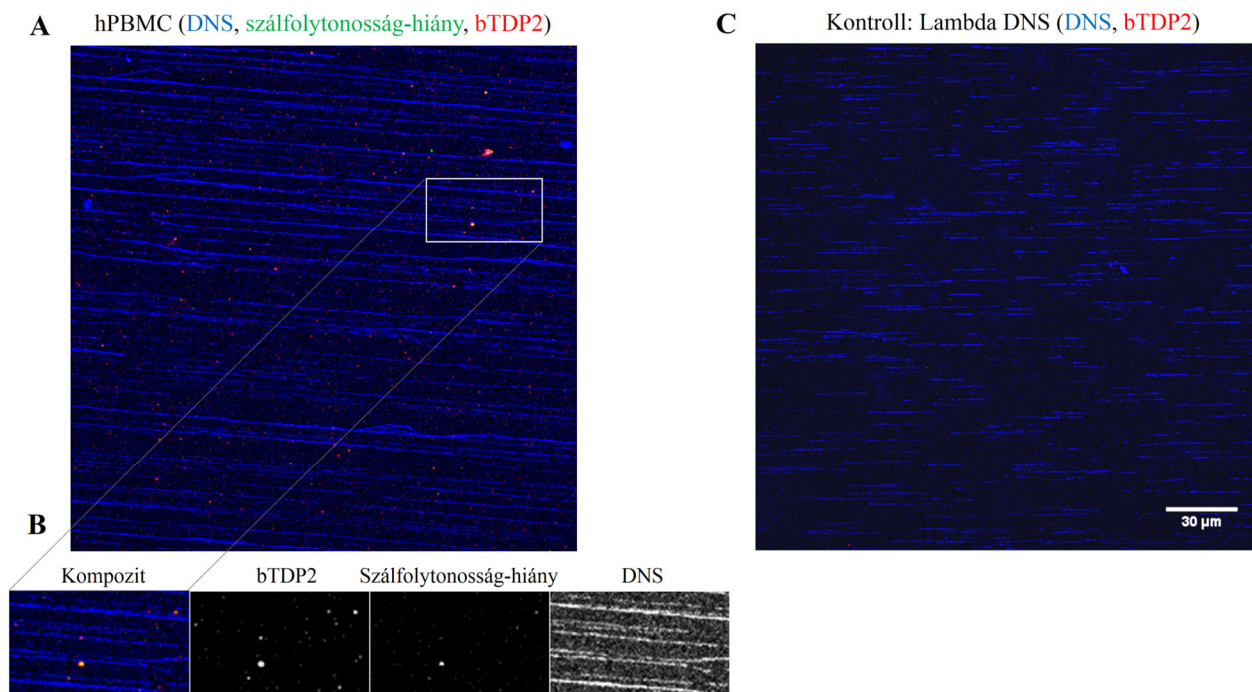
Az előző kísérletek végzése közben felmerült lehetőségként, hogy a terminális transzferáz (TdT) a transzkripció során keletkező és a mintapreparálás során a mintában maradó RNS/DNS hibridek RNS végének 3' OH csoportját is megjelölheti. A Pol I-gyel ellentétben a TdT templátján független módon kapcsolhatók a DNS szabad 3' OH csoportjához a biotinnal jelölt nukleotidok, melyek a szálfolytonosság-hiány helyén a szomszédos DNS száltól térben különálló, rövid egyszálú nukleinsav szakaszt alkotva pontos lokalizációt tesznek lehetővé (16.A ábra). Az RNS végjelölés kiküszöbölése céljából az agarózba ágyazott élesztő DNS-t TdT jelölés után több különböző RNÁzzal (lásd Anyagok és Módszerek; Aziz El Hage, *nem közölt adatok*) emésztettem, így megszabadulva a mintában található RNS/DNS hibridektől. Az RNázok hatását S9.6 RNS/DNS hibridekre specifikus antitest [254] segítségével ellenőriztem (16.C-D ábra). Az RNáz kezelt mintában a kezeletlen kontrolléhoz hasonló erősségű TdT jelet detektáltam (16.B ábra), párhuzamosan az S9.6 jel csökkenésével, mely megerősíti, hogy TdT jelölés során nagyrészt DNS szálvégek 3' OH csoportját jelöltem. Mivel a TdT-vel hasonló jelölési gyakoriságot kaptam, mint Pol I-gyel, továbbá a TdT jelölés esetében az RNáz emésztés hatására nem csökkent jelentősen a jel, így azt gondolom, hogy Pol I esetében is a DNS-t jelöltem.



16. ábra. DNS szálfolytonosság-hiányok jelölése TdT-vel élesztő genomi DNS-ből készített combing preparátumon, és az RNáz kezelés hatása a jelölésre. A biotinnal jelölt nukleotidokat TdT enzim segítségével építettem be agarózba ágyazott élesztő sejtek genomi DNS-ébe. Az agaróz blokkokat jelölés után RNáz enzimekkel vagy anélkül inkubáltam. A beépített biotint egérben termelt anti-biotin antitesttel (piros), az RNS/DNS hibrideket pedig S9.6 antitesttel, majd Alexa Fluor 647-tel jelölt, egér ellenes IgG antitesttel detektáltam (piros). A DNS-t YOYO-1 festékkel (zöld) tettem láthatóvá. (A) TdT jelölt, combingolt genomi DNS RNáz kezelés nélkül. (B) TdT jelölt, combingolt genomi DNS kombinált RNáz kezelés után. (C) RNS/DNS hibridek jelölése combingolt genomi DNS-en, RNáz kezelés előtt. (D) RNS/DNS hibridek jelölése combingolt genomi DNS-en kombinált RNáz kezelés után. A szálfolytonosság-hiányok és az RNS/DNS hibridek jelölései külön fedőlemezen készültek, melyek ugyanabból a biológiai mintából származtak. Az ábrákat több, konfokális mikroszkóppal készült felvételen látható DNS szálak képeiből állítottam össze.

3.2.1.4. A hPBMC sejtekből származó DNS-en detektált szálfoltonosság-hiányok TopII eredetűek

Ismert, hogy a TopII enzimek katalitikus ciklusa során egy-egy 3' OH csoport szabaddá válik a két DNS szálon, mely a mi rendszerünkben jelölhető. A laboratóriumunk által korábban publikált következtetésekkel [124, 254] egybehangzóan a DNS-en replikáció-független és transzkripcióval asszociálható módon előforduló, TopII eredetű száltöréseket írtak le számos, nagy figyelmet keltő közleményben [141, 147, 151, 156]. Mindezek nyomán felmerül a lehetősége annak, hogy az általam detektált szálfoltonosság-hiányok létrejöttében is a TopII játszik szerepet. Az agarózba ágyazott minták készítésekor alkalmazott fehérjementesítési lépés során a DNS-hez kovalensen kötődött TopII fehérje csak részlegesen emésztődik, így a DNS-kötött TopII enzimből a DNS szál 5' végén egy foszfortirozil-oligopeptid csoport marad vissza. A sejtekben *in vivo* is egy foszfortirozil-oligopeptid marad a TopIIcc proteaszómális degradációja után, melyet a Tirozil DNS foszfodiészteráz enzim 2 (TDP2) távolít el a DNS-ről. Rekombináns TDP2 enzimmel a DNS mintát kezelve a mi rendszerünkben az enzim nem hasította le a peptidet (*itt be nem mutatott adatok*), viszont a peptid fluoreszcensen kimutatható volt biotinnal jelölt TDP2 (bTDP2) segítségével. A bTDP2-vel jelölt DNS végek jelentősen átfedtek a Pol I-gyel jelölt szálfoltonosság-hiányokkal hPBMC sejtekből izolált DNS combing preparátumokon (lásd 17. A-B ábra), mely a szálfoltonosság-hiányok TopII eredetére utal. A bTDP2 aspecifikus DNS-kötése ellen szól, hogy Lambda fág DNS-hez adva kevés bTDP2 kötődést detektáltam (17. C ábra).



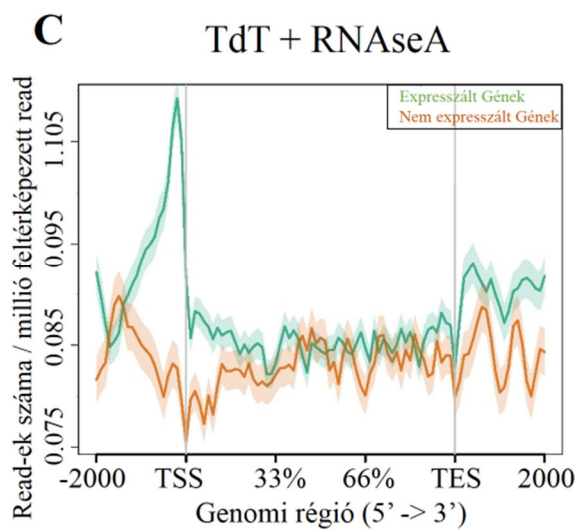
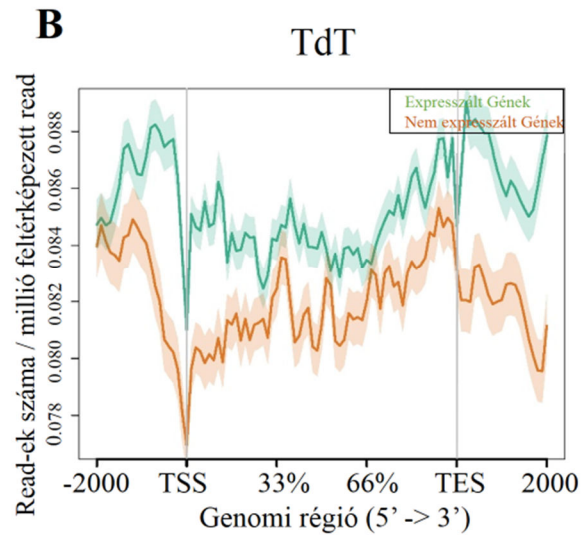
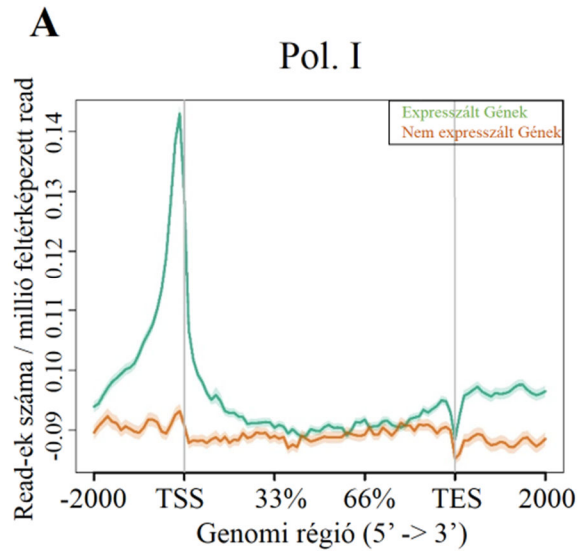
17. ábra. TopII eredetű DNS szálfolytonosság-hiányok kimutatása hPBMC sejtek DNS-ében.

A szálfolytonosság-hiányokat Pol I-gyel jelöltem, limitált körülmények között fluoreszcens ChromaTide 568 festékkal kapcsolt dUTP-t beépítve (zöld). bTDP2-vel (piros) detektáltam a TopII eredetű foszfotirozil csoportot (piros), melyet egérben termelt anti-biotin antitesttel, majd Alexa Fluor 647-tel jelölt, egér ellenes IgG antitesttel tettem láthatóvá. A DNS-t YOYO-1 festékkal jelöltem (kék). (A) Pol I és bTDP2 jelölés hPBMC sejteken. (B) Az (A) részben látható konfokális mikroszkópos kép egy részlete látható kinagyítva. Kompozit és egysatornás képek láthatók a jelölt molekulákról (bTDP2, szálfolytonosság-hiány, DNS) egymás mellett. (C) Kontroll: A bTDP2-vel jelölt Lambda fág DNS. Az (A) és (C) ábrán konfokális mikroszkóppal készült, reprezentatív képek láthatók.

3.2.2. DNS szálfolytonosság-hiányok halmozódnak az aktív gének promoterein

Az irodalomból ismert, hogy bizonyos gének transzkripciójában a TopII, illetve az általa okozott átmeneti, a génaktivációt kísérő DNS-száltörés szerepet játszik [147]. Ennek vizsgálatára az agarózba ágyazott hPBMC sejtekből DNS-t izoláltam, a szálfolytonosság-hiányokat enzimatikusan megjelöltem, és NGS segítségével feltérképeztem. (A kísérletet a Székvölgyi Lóránt által beállított mintakészítési protokoll szerint végeztem. A bioinformatikai kiértékelés

Halász László és Czipa Erik munkája.) A feltérképezett szálfoltonosság-hiányok körülbelül 10%-a a génekre lokalizálható. A génen belüli eloszlásukat vizsgálva a read-ek halmozódását detektáltuk az aktív gének promoterein. Ezzel ellentétben, az inaktív gének promoterein a read-ek száma sokkal alacsonyabb volt (18.A ábra). A géntesteken sokkal kevesebb jelet detektáltunk a promoterekhez képest. A kísérletet TdT-vel jelölt mintán megismételve (18.B ábra) magas jelintenzitást detektáltunk a géntesteken és a promotereken egyaránt (18.B ábra), melyet minden bizonnyal az RNS/DNS hibridek RNS 3' végének TdT általi jelölése következtében láttunk. Ugyanis ha a TdT jelölt mintát szekvenálás előtt RNáz A-val emésztettem, a Pol I-gyel jelölt mintához hasonló metaplot ábrát kaptunk, azaz az aktív gének esetében a géntesten alacsony, a promotereken pedig magas read számot detektáltunk (18.C ábra). Tehát a TdT-vel történő jelölés során a géntesten található, valószínűleg RNS/DNS hibrid-eredetű RNS végek 3' OH csoportját is megjelöljük, melyek eltűnnek a minta RNáz emésztése során. (A jel RNS/DNS hibrid eredete mellett szólt az is, hogy párhuzamos mintán S9.6 antitesttel elvégezve az immunoprecipitációt, hasonló metaplotot kaptunk (*itt nem mutatott adatok*, Székvölgyi és mtsaival kollaborációban végzett kísérlet) Az eredményeket qPCR-rel validáltam. A DIP-seq kísérletekből szerzett adatok alapján a jelölt szálfoltonosság-hiányokat halmozó aktív gének, illetve a halmozást nem mutató inaktív gének promotereire PCR primereket terveztem. A pozitív lókuszok közül 13-ból 12 esetben sikeresen detektáltam dúsulást DIP-qPCR-rel, míg a negatívak közül 5 vizsgált lókusz egyikében sem láttam a pozitív lókuszoknál tapasztalt halmozódást a jelöletlen kontrollhoz képest (*itt be nem mutatott adatok*).

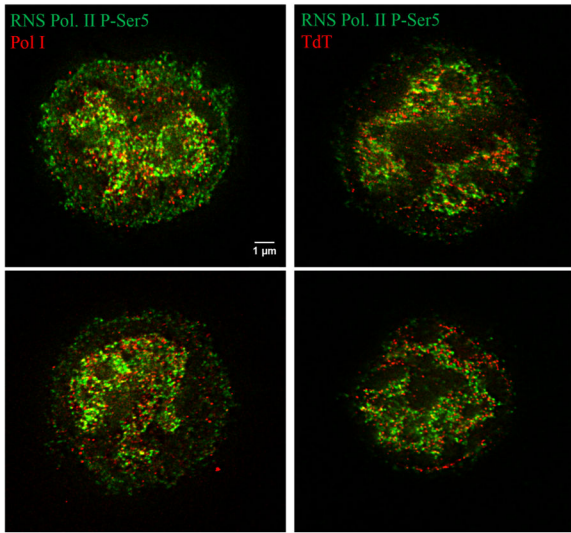
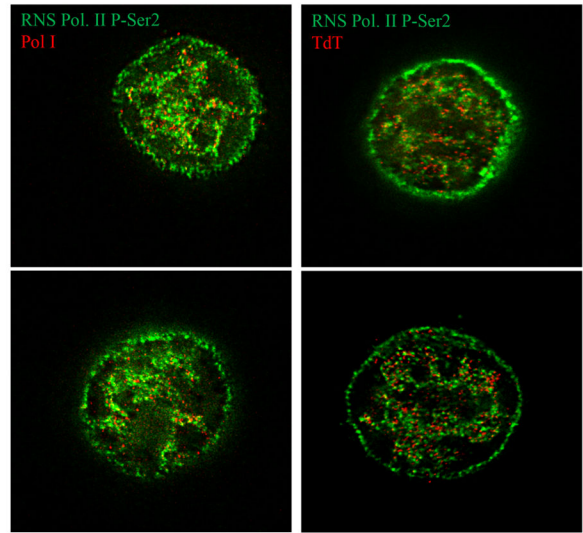
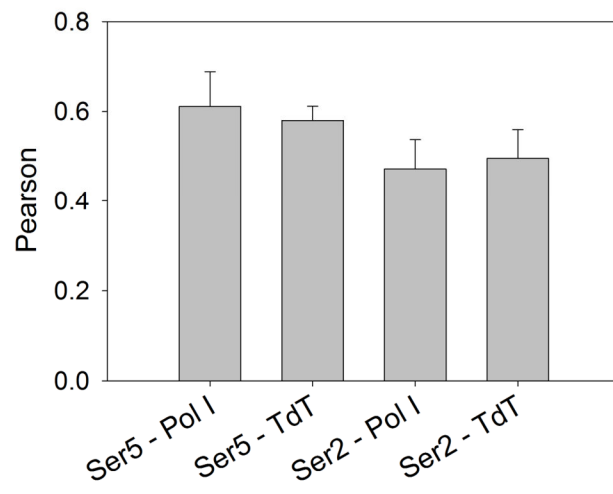
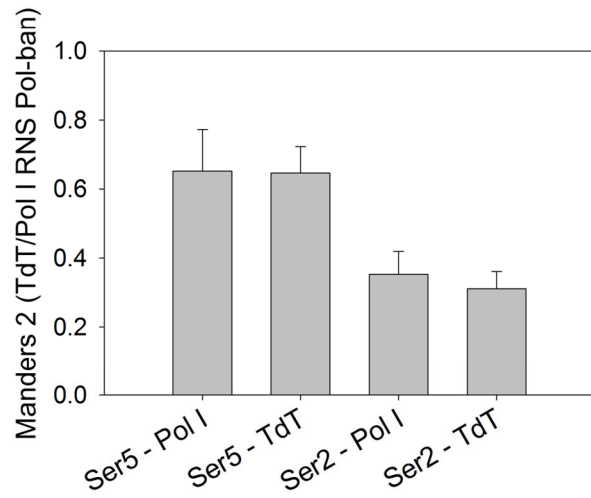
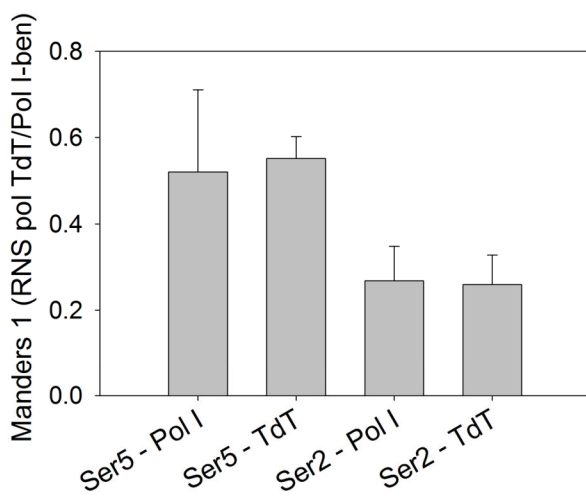


18. ábra. hPBMC sejtekben a DNS szálfoltyonosság-hiányok az aktív gének promoterein halmozódnak. (Székvölgyi Lóránttal, Halász Lászlóval és Czipa Erikkel kollaborációban nyert adatok) *Agarózba ágyazott, deproteinált DNS-be enzimatikusan biotinnal jelölt nukleotidokat építettem be, melyet immunoprecipitálás és szekvenálás követett. A képen az aktív és inaktív gének metaplot ábrája látható, a végjelölés halmozódása megfigyelhető aktív (zöld) és inaktív (barna) gének esetében. (A) A Pol I enzimmel jelölt DNS szálfoltyonosság-hiányok halmozódnak az aktív gének promoterein (TSS (transzkripciós starthely) előtti szakasz), ellentétben az inaktív génekkel. A géntesten (TSS és TES (transzkripciós végpont) közötti szakasz) kevés read detektálható aktív és inaktív gének esetében egyaránt. (B) A TdT enzimmel jelölt DNS szálfoltyonosság-hiányok halmozódnak az aktív és inaktív gének promoterein és a géntestén egyaránt. (C) A TdT enzimmel jelölt, majd RNase A-val kezelt mintában a DNS szálfoltyonosság-hiányok eloszlása a Pol I enzimmel jelölt mintához hasonlít, azaz az inaktív génekkel ellentétben az aktív gének promoterein halmozódnak, míg a géntesten kevés read detektálható aktív és inaktív gének esetében egyaránt.*

3.2.3. A DNS szálfoltyonosság-hiányok kolokalizálnak az iniciáló és elongáló RNS polimerázzal: szuperrezolúciós mikroszkópiával végzett vizsgálatok

A qPCR-rel verifikált DIP-seq adatok alapján a szálfoltyonosság-hiányok az aktív gének promoterein halmozódnak (18. ábra). Ezt megerősítendő, szuperrezolúciós konfokális mikroszkópos technikával készült képeken megvizsgáltam, hogy az általam jelölt szálfoltyonosság-hiányok milyen mértékben állnak együtt az RNS polimerázzal a transzkripció iniciációs és elongációs fázisában. Ismert, hogy az RNS polimeráz II C-terminális doménjén (CTD) található Ser5 foszforilációja a transzkripció iniciációs fázisában lévő, míg a Ser2 aminosavának foszforilációja a transzkripció elongációs és terminációs fázisában lévő RNS polimerázra jellemző. Immunofluoreszcens technikát alkalmazva STED mikroszkópiával (rövid tanulmányút keretében az Institute of Molecular Genetics intézményben (Prága, Csehország), Ivan Novotny segítségével az enzimatikusan jelölt DNS szálfoltyonosság-hiányok és a transzkripció iniciációs, valamint elongációs fázisában lévő RNS polimeráz részleges kolokalizációját észleltem (19. ábra). A szálfoltyonosság-hiányokat bakteriális DNS Polimeráz I-gyel vagy TdT-vel jelöltem. Utóbbi esetben az RNS végek jelölődését (ld. 16. ábra) a jelölés után végzett RNáz kezeléssel szüntettem meg. Az eredmények azt mutatták, hogy az iniciáló RNS polimeráz II (Ser5

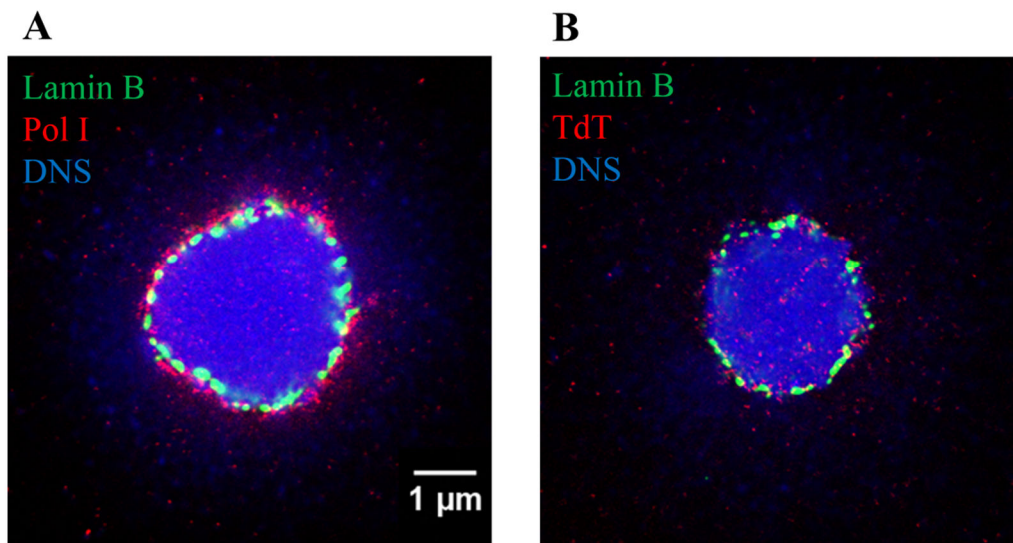
foszforilált) és a jelölt folytonosság-hiányok nagy mértékben (Pearson és Manders 1 illetve 2 értékek átlaga ≈ 0.6) (lásd 19.A és C ábrák) együtt álltak, míg a transzkripció elongációs fázisára jellemző RNS polimeráz II (Ser2 foszforilált) és a szálfolytonosság-hiányok az előzőhöz képest kisebb, részleges kolokalizációt mutattak (Pearson ≈ 0.5 ; Manders 1 ≈ 0.25 ; Manders 2 ≈ 0.35) (lásd 19. B és C ábrák).

A**B****C**

19. ábra. A DNS szálfoltonosság-hiányok részlegesen kolokalizálnak az RNS polimerázzal a transzkripció iniciációja és elongációja során STED mikroszkópiás feloldásban. *Agarózba ágyazott és fixált Jurkat sejtekben DNS Pol I vagy TdT enzim segítségével megjelöltem a DNS szálfoltonosság-hiányokat, és immunofluoreszcenciás módszer segítségével láthatóvá tettem az RNS polimeráz Ser5 foszforilált (A panel) és Ser2 foszforilált (B panel) formáját. Az RNS polimeráz formáit két különböző foszforilációs állapotra specifikus, nyúlban termelt antitesttel (zöld) (lásd Anyagok és Módszerek) jelöltem. A beépített biotint Abberior Star Red STED-re alkalmas fluoreszcens festékhez kapcsolt streptavidinnel detektáltam (piros). (A) DNS folytonosság-hiányok kolokalizációja Ser5 foszforilált RNS polimerázzal. (B) DNS folytonosság-hiányok kolokalizációja Ser2 foszforilált RNS polimerázzal. (C) Az (A) és (B) ábrarész mintáiból számolt kolokalizációs értékek (Pearson és Manders 1 és 2) eloszlása. A hibavonalak SEM értékeket jelölnek, melyeket az egyes sejtek esetében számolt kolokalizációs átlag értékekből számoltam. A paraméterek kiszámításához 5-5 STED mikroszkópos képet elemeztem. Az (A) és (B) ábrán reprezentatív, STED mikroszkópos képek láthatók.*

3.2.4. A DNS szálfoltonosság-hiányok a nukleáris laminához közel detektálhatók halo preparátumon

A következő kísérletekben a DNS egyszál folytonosság-hiányok eloszlását vizsgáltam halo preparátumon, melyben egymástól elkülöníthető a szuperhelikális és relaxált DNS. Halo preparátum készítése során az egyetlen sejtmagból készült preparátumot magas koncentrációjú sóoldattal (2M NaCl) kezeljük, minek következtében a nukleoszómamentessé váló DNS a sejtmagból kitüremkedik. A halo preparátumon két, topológiailag elkülönült domén különböztethető meg, a halot alkotó szuperhelikális DNS szálaké, melyek szuperhelicitása interkalátor kötődés következtében megváltozik (lásd 21. ábra), és a topológiailag relaxált, feltehetően a nukleáris mátrixhoz rögzült domén. A halo preparátumon a DNS szálfoltonosság-hiányok perifériás, gyűrűszerű halmozódást mutatnak (20. ábra), közel a nukleáris laminához. A 20. ábrán látható, hogy a szálfoltonosság-hiányokat tartalmazó DNS szakaszok a lamina hálózatából részben kitüremkednek. A szálfoltonosság-hiányok a nem szuperhelikális, laminához közeli DNS kompartmentben halmozódnak, míg a szuperhelikális DNS hurkok által alkotott haloban kevés jelet mértem.

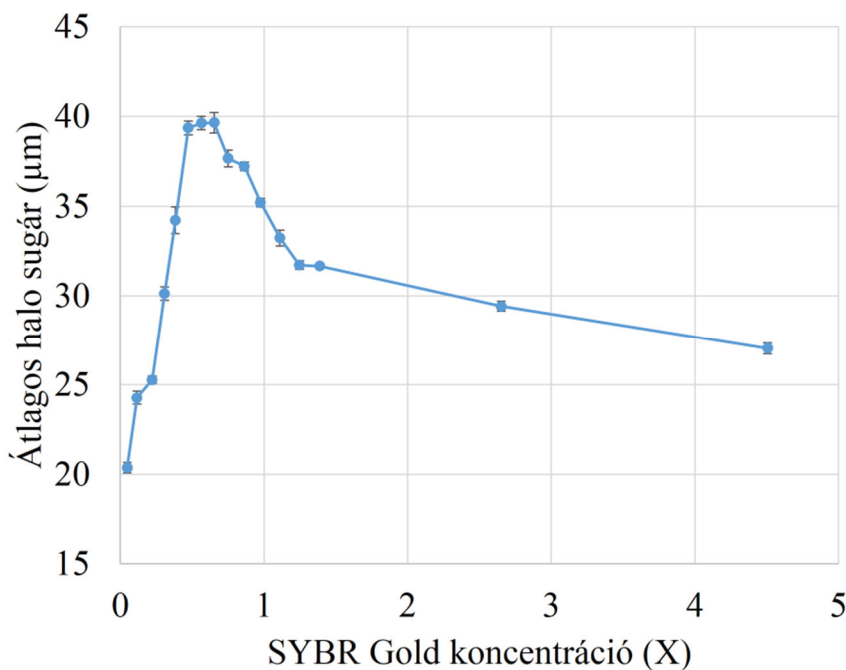


20. ábra. A szálfolytonosság-hiányok a nukleáris laminához közel detektálhatók. *A halo preparátumokat agarózba ágyazott Jurkat sejtekből készítettem. A DNS folytonosság-hiányokat Pol I (A) és TdT (B) enzimmel jelöltem, utóbbi esetben a jelölés után a mintát RNÁzzal kezeltem. Az enzimekkel beépített biotint Abberior Star Red STED-re alkalmas fluoreszcens festékhez kapcsolt streptavidinnel (piros), a nukleáris laminát Lamin B elleni antitesttel detektáltam (zöld). A DNS-t PI-dal festettem.*

3.2.5. Az interkaláció következtében megváltozik a szuperhelikális DNS-t tartalmazó halo mérete

A továbbiakban megvizsgáltam az interkaláció hatását a halo preparátumban jól elkülönülő szuperhelikális DNS hurkok topológiájára. Csoportunk korábban kimutatta a sejtmag méretének interkalátor-függő változását különböző koncentrációjú NaCl oldattal részlegesen hiszton-depletált magi preparátumokon, pásztázó lézer mikroszkópos kísérleti rendszerben ([124] referencia 4A ábrája). Halo preparátumon a szálfolytonosság-hiányok (20. ábra) következtében relaxált DNS jól elkülöníthető a lamina résein áttüremkedő, szuperhelikális DNS hurkokat tartalmazó halotól. Ismert, ha sejtekből készült halo preparátumhoz interkalátort adunk, változik a DNS tekertsége, melyet a halo méretének megváltozása kísér. Ezért megvizsgáltam, hogy az interkaláció következtében milyen mértékben változik a halo mérete 2M NaCl oldattal teljes mértékben hiszton mentessé tett mintán. Az általunk használt interkalátor egy DNS festék, így

alkalmas a halo méretének detektálására is. A kísérlettel kimutattam, hogy halo preparátumhoz SYBR Gold interkalátor koncentrációsora adva az interkaláció hatására a DNS relaxálódik, melyet a halo méretének növekedése kísér. Relaxációs koncentrációnál (0,6X SYBR Gold) a halo sugara a kiindulási sugár kétszeresére nő (21. ábra). (A kiindulási halo méretet azon legkisebb koncentrációjú (0,05X) SYBR Gold-dal detektáltam, amivel még a DNS látható.) Magasabb interkalátor koncentrációk (>1,5X SYBR Gold) jelenlétében a DNS túltekertté válik, melyet a halo méretének csökkenése mutat. Ez a csökkenés úgy magyarázható, hogy a túltekert DNS torziós feszülése (nagy T_w érték) Wr -be alakul át, s ezáltal a halo DNS hurkai rövidülnek és kisebb halo sugart mérünk.



21. ábra. A SYBR Gold interkalációs görbéje halo preparátumon. A görbén a halo sugarának változása látható a SYBR Gold interkalátor koncentrációjának függvényében 2M NaCl-dal kezelt Jurkat sejtekből készült halo preparátumon, pásztázó lézer mikroszkóppal mérve. A minimális interkalátorral (0,05X) kezelt kontroll mintákon a halok sugara átlagosan 20 µm, mely ~0,6X SYBR Gold koncentráció esetében éri el a maximumát (40 µm), ennél magasabb interkalátor koncentrációknál a halo sugara ~27-30 µm-re csökken. Mintánként ~500 halot mértem. Az ábrán 4 mérés átlaga látható. A hibavonalak SEM értékeket jelölnek, melyeket a 4 mérés adataiból számoltam.

4. Diskusszió

4.1.1. Hiszton aggregáció

Eredményeink azt mutatták, hogy a Dox kemoterápiás kezelések során használt terápiás koncentrációban masszív H2A hiszton aggregációt okozott a sejtmagban, ellentétben a H2B-vel (5. E, 7. B és C ábra). Az antraciklin kezelés következtében bekövetkező kromatin aggregációt már korábban leírták *in vitro* [76, 164] és *in vivo* [128] rendszerekben egyaránt, ám tudomásunk szerint ez az első eset, melyben az aggregáció jelenségét a hiszton fehérjéken figyelték meg. Ismert, hogy az interkalátor Dox hatására a hisztonok koncentráció-függő módon disszociálnak a kromatintról (lásd [122, 124, 128, 164]). Konfokális mikroszkópos mintákban megfigyelhető volt, hogy $>9 \mu\text{M}$ Dox kezelés hatására az immunfluoreszcensen detektált H2A molekulák nagy része a magon belüli térben elkülönül a DNS tartalmú területektől, ahogy ezt az LSC alapú kísérletekkel láttam (5.E ábra). Nukleoszóma rekonstitúciós kísérletekből ismert, hogy alacsony só koncentrációnál, DNS hiányában a szabad hisztonok hajlamosak az aggregációra [255-258], így az általunk tapasztalt jelenség háttérében az állhat, hogy a Dox következtében a kromatintról disszociálódó szabad hisztonok a sejtmagon belül aggregálnak. Tehát a Dox kezelés sejtmagi következménye a hisztonok disszociációja mellett azok aggregációja is. A H2B hiszton a H2A-hoz hasonló, a DNS-tartalmú kromatintól elkülönült képet mutatott, ha a citoplazmába történő kiáramlását PYR-41 kezeléssel gátoltam (8. és 9. ábra). Mivel ebben az esetben nem láttam aggregációt az LSC alapú kísérleti rendszerben (*itt be nem mutatott adatok*), ezért valószínűsíthető, hogy PYR-41 jelenlétében a H2B aggregátumok mérete, összetétele és/vagy stabilitása a H2A aggregátumoktól különbözik.

A H2A és H2B hisztonok HPLC-vel elkülöníthetők egymástól, vagyis e két hiszton hidrofóbicitása jelentősen különbözhet [259]. Ez egybehangzik a két hiszton általunk detektált különböző aggregációs hajlamával Dox kezelés után, hiszen különböző lehet a két hiszton Dox-ot megkötő képessége. Ezeken túl kimutattuk azt is, hogy a dimer két tagja egymástól függetlenül disszociálhat a nukleoszómáról (lásd a [124] referencia kiegészítő S13. ábráját), így lehetséges, hogy a Dox is különböző mértékben hat a két hiszton disszociációjára és aggregációjára. Feltételezhetően a PYR-41 hiányában a H2B transzlokálódik a citoplazmába, így kerülve el a sejtmagi aggregációt. Amikor rekombináns hisztonok Dox indukált mobilitását vizsgáltuk FCS módszerrel (6. ábra), a diffúziós idők változásának mértéke nem utalt kifejezett aggregációra.

Kisebb mértékű aggregáció (oligomerizáció) persze még így is lehetséges, de az is elképzelhető, hogy a hisztonok a Dox kötés következtében konformáció-változáson mennek keresztül, megváltozik az alakjuk, s ez okozza a diffúziós idő kisebb mértékű növekedését. A Dox-hoz hasonlóan a Dox + PYR-41 együttes jelenléte sem befolyásolta lényegesen a hisztonok mobilitását. Nagyon hasonló autokorrelációs görbéket kaptam 9 μ M Dox jelenlétében is (*itt be nem mutatott adatok*). A kicsiny, de kimutatható mobilitás változás Dox hatására megerősíti azt a feltételezést, hogy a Dox közvetlen molekuláris interakcióba lép mind a H2A, mind a H2B hisztonnal, és hogy ezeket az interakciókat a PYR-41 jelenléte szignifikánsan nem befolyásolja. Ebben a kísérleti rendszerben a jelentős hiszton aggregáció hiánya valószínűleg az élő sejtek sejtmagjától jelentősen eltérő környezettel, következésképpen eltérő molekuláris kölcsönhatásokkal magyarázható.

4.1.2. Nukleo-citoplazmatikus transzlokáció

A Dox kezelés látványosan megnövelte a citoplazmában a H2B hiszton szintjét, melyet nem kísért a H2A emelkedése (8. és 9. ábra). A H2B hiszton Dox kezelés hatására bekövetkező citoplazmatikus transzlokációja egy olyan jelenség, amit tudomásunk szerint korábban nem írtak le. Mivel alacsony koncentrációjú Dox kezelésnél is detektálható ez a jelenség Jurkat sejtek, hPBMC és DC sejtek esetében is, így ezt érdemes figyelembe venni a Dox-ra adott sejtválasz vizsgálata esetén. Az a tény, hogy a Dox-szal és PYR-41-gyel egyszerre kezelt sejtek sejtmagjában detektált H2B trabekulárisan, a DNS-t tartalmazó területeken kívül halmozódik fel (8. és 9. ábra), arra utal, hogy a hisztonok Dox hatására bekövetkező kromatinról történő disszociációját a PYR-41 kezelés nem befolyásolja, tehát csak a H2B nukleáris exportját gátolja a PYR-41.

A Dox indukálta H2B felhalmozódást a citoplazmában immunofluoreszcens módszerrel detektáltam, monoklonális és poliklonális antitestekkel (8. ábra), továbbá tömegspektrometriás módszerrel is (12. ábra), ahol a H2B citoplazmatikus frakcióban történő megjelenése a korábban észleltekkkel egybecsengően PYR-41 érzékenységet mutatott. A PYR-41-gyel és Dox-szal együtt kezelt sejtek esetében is a magon belül mindkét antitesttel detektáltam a H2B jelenlétét (8. ábra), ami valószínűtlenné teszi, hogy nem specifikus antitestkötődést láttam – erre utalnak a tömegspektrometriás adataim is (ld. alább). Bár az antraciklin indukált H1 magon belüli áthelyeződését a magvacskába GFP-vel jelzett H1-et expresszáló sejtek esetében korábban kimutatták [128], én nem észleltem a H2B-GFP nukleo-citoplazmatikus transzlokációját (11.

ábra). Az immunofluoreszcenciás módszerrel detektált endogén H2B áthelyeződése és a H2B-GFP relokáció hiánya látványosan bemutatható, ha a két entitást egyszerre detektálom (11. ábra).

A GFP jelenléte és ennek a H2B nukleo-citoplazmatikus transzlokációjára gyakorolt gátló hatása összeegyeztethető egy specifikus transzport mechanizmus jelenlétével. Ismert, hogy számos sejtmagi fehérje sejten belüli lokalizációja megváltozhat különböző kemoterápiás szerrel történő kezelés hatására, például kiemelhető a TopI nukleo-citoplazmatikus transzlokációja camptotecin hatására [158]. Így felmerül annak is a lehetősége, hogy a H2B citoplazmatikus megjelenése nem aktív transzport eredménye, hanem a H2B kis molekulatömege következtében passzívan kidiffundál a sejtmagból a magpóruson keresztül, ahol az elsődleges hiszton importért felelős Importin 7 fehérje-komplexhez kötődve csapdázódik, abban az esetben, ha a Dox mitokondriális toxicitása következtében ATP depléción is jelen van. Ez megmagyarázná a H2B-GFP sejtmagban maradását, ugyanis a H2B-GFP mérete jóval nagyobb a H2B-hez képest (~40 kDa), így nem tud a sejtmagból kidiffundálni. Ez a modell viszont nem magyarázza meg, miért nem láttunk a citoplazmában H2A hisztont. A GFP (vagy RFP - *itt be nem mutatott adatok*) jelenlétének hatása meglepő, de nem teljesen váratlan, hiszen akár egy hiszton molekulához kapcsolt Flag csoport jelenléte is komolyan hatással lehet a H2B molekuláris interakcióira [260].

A CRM1 függő magi export leptomycin B-vel történő gátlása nem befolyásolta jelentősen a H2B felhalmozódását a citoplazmában. Hasonlóan nem befolyásolta a H2B nukleo-citoplazmatikus transzlokációját az ubiquitináció, a NEDD-iláció, a SUMO-iláció, a transzkripció, a fehérjeszintézis vagy a Hsp90 funkció gátlása sem (10. ábra). A PYR-41 hatását elsősorban az ubiquitin-aktiváló enzim (E1) gátlásán keresztül fejt ki, mely nem társul az ubiquitin-konjugáló enzim (E2) gátlásával [248]. Viszont kimutatták, hogy a PYR-41 serkenti a sejtekben a SUMO-ilációt, és nem specifikus módon indukálhatja fehérjék keresztükötését, mely utóbbi hozzájárul a vegyület toxicitásához [248]. Azt is kimutatták, hogy a PYR-41 deubiquitinázt (DUB) gátló hatással is rendelkezik [248]. Az általunk használt másik E1 gátlószerrel történő kezelés nem reprodukálta a PYR-41 hatását, továbbá a 2-D08-cal (SUMO-iláció gátlószerrel) történő együttes kezelés csökkentette a PYR-41 Dox indukálta H2B exportra gyakorolt gátló hatását (ez esetben a H2B nagy mennyiségben jelen volt a sejtmagban és a citoplazmában egyaránt; lásd 8. ábra). Ezért feltételezzük, hogy a H2B export a SUMO-iláción keresztül kapcsolatban van a fehérjelebontást irányító biokémiai mechanizmusokkal. A fő magi export útvonal CRM1 (exportin-1 vagy XPO1)

függő, mely leptomycin B-vel gátolható azáltal, hogy az alkilálja és ezzel gátolja magát a CRM1 fehérjét [261]. Mivel a leptomycin B magas koncentrációban adva sem fejtett ki gátló hatást a Dox indukálta H2B exportra, így nem valószínű, hogy a H2B citoplazmatikus felhalmozódásáért a CRM1 függő magi export a felelős. Egyéb, CRM1 független magi export mechanizmus is ismert, köztük az érett mRNS [188, 262], poly(A)⁺ RNS-ek [263], és RNS helikázok [196] transzportja, elvileg ezek a mechanizmusok hozzájárulhatnak a H2B nukleo-citoplazmatikus exportjához.

A SUMO-ilációval járó biokémiai folyamatok szerepet játszanak a mRNS-ek [264] és különböző fehérjék [265] magi exportjában is. Mivel a fehérjelebontási útvonalak kapcsolatban állnak a H2B hiszton Dox indukálta nukleo-citoplazmatikus transzlokációjával (8. és 9. ábra), lehetséges, hogy ez a jelenség kapcsolatban áll korábbi tapasztalatokkal is. Megfigyelték, hogy érdekes módon a PYR-41 csökkenti a szepszis során fellépő tüdőkárosodást az NFκB gyulladásos választ kiváltó útvonallal interferálva, mely útvonal a szepszis során megnövekvő koncentrációjú szabad hisztonokra adott válaszban is részt vesz [218, 266]. A megnövekedett fehérjelebontás fontos szerepet játszik a Dox terápiát limitáló kardiotoxicitás kialakulásában [267]. A SUMO-ilációhoz szükséges UBC9 ubiquitin-konjugáló enzim (E2) csendesítése megnöveli a hepatocelluláris májrák Dox érzékenységét [268]. A SUMO útvonal befolyásolása hatással van a Dox toxicitására élesztőben [269]. A H2A és H2B gének csendesítése megnövekedett antraciklin érzékenységgel társul mellrák esetében [270]. Mindezeket figyelembe véve a jövőben érdemes lesz erőfeszítéseket tenni a H2B citoplazmatikus felhalmozódása és a fehérjelebontási útvonalak közötti pontos kapcsolat felderítésére.

Feltételezhető, hogy az eddigieken túl, a H2B Dox által indukált nukleo-citoplazmatikus transzlokációja kapcsolatban lehet különböző élettani vagy patológias folyamatokkal. Sejtmagon kívüli hisztonok jelentőségét már korábban több kísérletes rendszerben leírták [203, 210]. A sejten kívüli hisztonok anti-mikrobiális hatásának mechanizmusát és jelentőségét elég behatóan ismerik [213]. A vérplazmában található hisztonok mennyisége a szepszis súlyosságával korrelál [218], mivel hozzájárulnak az endotél diszfunkcióhoz [218]. Ismert, hogy az extra-kromoszómális H2B a veleszületett anti-virális immunválasz kiváltásában is fontos szerepet játszik [240, 242, 243]. A Dox kezelés PYR-41 érzékeny H2B nukleo-citoplazmatikus transzlokációt váltott ki Jurkat és hPBMC sejtekhez hasonlóan DC-k esetében is, melynek során jelentősen csökkent a sejtmag H2B tartalma. Érdekes módon a DC-k citoplazmájában kezelés nélkül is magas a H2B szintje (10. ábra),

főleg a sejtmembrán-közeli területeken. Mivel a DC-k a természetes immunitásban jelentős szerepet játszanak [271, 272], lehetséges, hogy a dendritikus sejtekben mért magas citoplazmatikus H2B szint a patogének felismeréséhez szükséges [272]. Aktivált DC-k citoplazmájában kimutattak H1 hisztont, melyhez kísérletesen antitestet adva a DC-k aktivációját gátolni lehetett [273]. Ebből az következik, hogy a H1 citoplazmatikus jelenléte elengedhetetlen a DC-k érésehez és a T sejtek aktiválásához. Mivel a H2B citoplazmatikus szintje már 2,25 μM koncentrációjú Dox kezeléskor is hamar megemelkedik (7. ábra), lehetséges, hogy a H2B hisztonnal kapcsolatos antivirális és antimikrobiális immunológiai útvonalak Dox segítségével hatékonyabbá tehetőek.

Az 1. és 2. táblázat alapján a Dox sokféle fehérje sejtmagból történő kijutását elősegítette, ami arra utal, hogy a Dox a sejtmag teljes szerkezetére kifejti hatását. Különböző hisztonok és számos egyéb fehérje sejtmagból történő kiáramlását detektáltuk Dox kezelés hatására, melyek a kromatin szervezésében, transzkripcióban, splicingban, replikációban, DNS hibajavításban, magi exportban és importban, hősokk válaszbán és fehérjelebontásban vesznek részt. Ezek közül néhány fehérje citoplazmatikus megjelenése PYR-41-re érzékeny volt (1. és 2. táblázat). A Dox hatására aggregálódott H2A-t (ami a korábbi agarózba ágyazott sejteken elvégzett immunofluoreszcenciás jelölési kísérletek alapján a magban maradt, lásd 5.E és 9. ábrák) a Dox kezelt sejtek citoplazmatikus lizátumában detektáltuk (12. ábra). Ez feltehetően azzal magyarázható, hogy a tömegspektrometriás kísérletek során alkalmazott kísérleti körülmények elősegítették a fehérjék kijutását a sejtmagból. Ilyen például a nem-ionos detergenssel történő kezelés és a magok centrifugálása során fellépő mechanikai stressz, melyek az agarózba ágyazott, Dox kezelt és formaldehid fixált sejtrendszerben nem voltak jelen. Fontos megemlíteni, hogy ilyen körülmények között a lizátumban megjelenő H2A kevésbé volt PYR-41-re érzékeny, mint a H2B (1. táblázat). Az általunk detektált, Dox hatására kialakuló molekuláris interakciók zavara a sejtmagban hozzájárulhat a Dox klinikai alkalmazása során fellépő hatásokhoz és mellékhatásokhoz egyaránt.

4.1.3. A Dox kezelés hatása a sejtek életképességére és az észlelt jelenségek potenciális élettani jelentősége

A kísérletek során megfigyeltük azt is, hogy a két órás Dox kezelés után azonnal nem volt kimutatható az életképesség csökkenése (13. ábra), tehát a hisztonok átrendeződése élő sejtekben történt. A H2A aggregációja $\geq 10 \mu\text{M}$ Dox koncentrációs kezelésnél kezdődik, mely 24 órával a kezelés után $\sim 50\%$ -os toxicitást okoz [168] (a disszertáció alapját képező I. cikk 6.C ábrája, Erfaneh Firouzi Niaki munkája). Mivel a Dox sejtproliferációt gátló hatása [168] (a disszertáció alapját képező I. cikk 6.B ábrája, Erfaneh Firouzi Niaki munkája) csak 48 óra múlva jelentkezik, így a két óra után fellépő H2A aggregáció előre jelezheti a Dox hosszú távon kifejtett toxikus hatását. A H2B citoplazmatikus transzlokációja ennél még érzékenyebb előrejelzője lehet a toxicitásnak, ugyanis a citoplazmában a H2B már $2 \mu\text{M}$ Dox kezelés után is detektálható, ami $\sim 15\text{-}20\%$ -os citotoxicitást okoz 24 óra után.

A fentiekén túl fennáll a lehetősége annak is, hogy a H2B (PYR-41-gyel gátolható) nukleo-citoplazmatikus exportja a sejtekre védő hatást fejt ki, mivel megóvjaa a sejteket a magon belüli hisztonaggregáció toxikus hatásától. Ezt a feltételezést az is alátámasztja, hogy Dox kezelt sejteket PYR-41-gyel együtt kezelve erős szinergisztikus (és nem csupán additív) hatást észleltünk a sejtek toxicitására (a disszertáció alapját képező I. cikk [168] 6.D ábrája, Erfaneh Firouzi Niaki munkája), ami arra utal, hogy a H2B nukleo-citoplazmatikus transzlokációjának megakadályozása fokozza a toxicitást. Ez a megfigyelt szinergizmus felveti a lehetőségét annak, hogy a Dox kezelést a klinikumban kiegészítsék PYR-41-gyel a rák ellenes kemoterápia során, ugyanis jelenleg a PYR-41-et eleve egy potenciális tumorelles szernek tekintik [248]. A PYR-41 tumorelles hatását prosztata- és pajzsmirigyrákban jelenleg preklinikai tanulmányokban vizsgálják [274].

A toxicitás vizsgálata során felmerült az a kérdés, hogy a kísérleteink során jelen lévő Dox koncentráció hogy viszonyul a kemoterápiás kezelések során előforduló koncentrációhoz. A Dox citoplazmatikus koncentrációjáról több eltérő adat is ismert a szakirodalomban ($0.5\text{-től } 9 \mu\text{M}$ -ig) [122, 275-278], így a kísérleteink során használt Dox koncentráció tartomány ($0.5 - 36 \mu\text{M}$) és a gyógyszeres kezelés során kialakuló maximális plazma koncentráció átfedhetnek. Mivel egyes kromatin területek érzékenyebbek lehetnek a Dox-ra, így az általunk globálisan detektált aggregációs és relokációs jelenségek lokálisan kisebb Dox koncentrációknál is előfordulhatnak (ld. Eredmények 3.1 és 3.2 fejezetek). Több DNS-t kötő, kisméretű molekula citotoxicitása

nagyobb mértékben korrelál a kromatint károsító képességével, mint a DNS-t károsító hatásával [279]. A mi megfigyeléseink alapján a H2A és H2B hisztonok intracelluláris és magon belüli megoszlásának megzavarása orvosi szempontból is releváns lehet mind az antraciklin kezelés hatásmechanizmusa, mind mellékhatásai szempontjából. Érdekes lenne vizsgálni a Dox indukált H2B nukleo-citoplazmatikus transzlokáció hatását az extra-kromoszómális H2B által közvetített immunválaszra [240, 242, 243], hiszen megfigyeléseim alapján felvetődik, hogy Dox alkalmazásával a veleszületett immunválasz hatékonyságát növelni lehetne. Azonban felmerül az a lehetőség is, hogy a H2A aggregációja a Dox általános fehérje aggregációt fokozó hatásának megnyilvánulása, melyet élesztőben is kimutattak [280], amely hozzájárulhat a kardiotoxicitás kialakulásához [281].

4.2.1. A relaxált kromatin környezet hatása a DNS interkalációra

Az interkalátorok nukleoszóma eviktáló hatása mások közlése és saját munkánk alapján [122, 124] már ismert. A laboratóriumunkban kidolgozott kvantitatív nukleoszóma stabilitási esszé segítségével ezzel kapcsolatban azt is megállapítottuk, hogy a genomi DNS relaxációja nagyfokú nukleoszóma destabilizációt okoz [124], ami kedvez az interkalátorok DNS-hez való kötődésének [75]. Tehát a DNS relaxációja önmagában is és az interkalátorok kötődésének növelése révén is lokálisan csökkenti a nukleoszómák stabilitását. Ez azt is jelenti, hogy a genom mentén a relaxált domének erősebben kitettek a Dox kötődésének, és így ezek a területek valószínűleg fokozottan járulnak hozzá a leírt hisztonaggregációs és export jelenségekhez. Részben annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy ilyen kitüntetett területek léteznek-e a genomban, részben egy másik projekthez csatlakozóan, a relaxált kromatin területek feltérképezését tűztem ki célul a jelenlévő endogén szabad DNS végek detektálásával.

Kísérleteim során DNS szálfolytonosság-hiányokat mutattam ki aktív gének promoter régióin (18. ábra). Mivel korábban bizonyítottuk, hogy a promoter-közeli (H3K4me3 és H3K27ac posztranszlációs módosítással rendelkező) nukleoszómák alacsonyabb Dox koncentrációk hatására disszociálnak a kromatinról [124], és a promoterek mentén éppen ezek a nukleoszómák találhatóak, így valószínűsíthető, hogy a promoter közeli nukleoszómák csökkent stabilitása a szálfolytonosság-hiány következménye. Mindebből az következik, hogy az antraciklinek és más DNS interkalátor tulajdonságú gyógyszerek hatása relaxált kromatinban fokozottan érvényesül.

Így az endogén szálfolytonosság-hiányok következtében kialakult relaxált DNS régiók feltérképezése az antraciklinek klinikumban tapasztalt hatásainak, valamint mellékhatásainak pontosabb megértéséhez vezethet. Ezen következtetést az alapozza meg, hogy a DIP-seq kísérletekben alkalmazott szabad 3' OH jelölési eljárásunkat többféle kísérleti rendszerben (agarózba ágyazott sejtmag, halo preparátum és molekuláris combing) sikeresen alkalmaztam, és az eredmények összhangban állnak a kísérleti rendszerektől vártakkal. Kemoterápiás szerek sejtmagbéli heterogenitása jelentős lehet farmakodinámiai szempontból [282], így a Dox genom-menti kötődési különbségeinek is fontos szerepe lehet a szer hatásmechanizmusában. Figyelembe véve, hogy az interkalálódó ágensek kötődésének elsődleges meghatározója a szuperhelicitás [75], melynek mértéke a genom mentén a kötődés erősségére nézve irányadó lehetne. A psoralen kötődésen alapuló módszer azonban csak 1 psoralen molekula/5-15 kb feloldásban működik [41], és a linker régiók összegzett szuperhelicitásának térképét adja, de az interkalációnak preferenciálisan kitett relaxált szakaszokról nem ad részletes képet. Mivel a genom mentén, nukleoszóma-mentes területeken megfigyelhetők fiziológiás körülmények között is szálfolytonosság-hiányok [141, 142], melyek környezetében szükségképpen relaxált a DNS, így kedvező körülményeket teremtve a Dox interkaláció számára, ezek térképezésére tettem erőfeszítéseket. Utóbbi vizsgálatok egy része publikált anyag [161] (a disszertáció alapját képező II. cikk), egy jelentős, és részben itt is bemutatott hányada egy nagyobb lélegzetű, a DNS topológiai viszonyaival kapcsolatos, most íródó közlemény része lesz. A lehetséges szabad DNS végek közül a szabad 3' OH-véggel rendelkező, feltehetően TopII-eredetű szálszakadásokra fókuszáltunk, ezek feltételezhető lokalizáltsága miatt.

4.2.2. DNS egyszál szálfolytonosság-hiányok specifikusan jelölhetők és vizualizálhatók molekuláris combing rendszeren

A *S. cerevisiae* XII. kromoszómáján található rDNS klaszter 100-200 identikus, természetes módon megsokszorozódott DNS szakaszból áll, ami Southern-blot és reverse South-Western kísérleteink során sokkal nagyobb érzékenységet biztosított és ezáltal a combing kísérletek során lehetővé tette a jelölési adatok értelmezését. Vagyis jó modellrendszernek bizonyult a 3' OH-karakterű DNS szálfolytonosság-hiányok enzimatikus jelölésének beállításához.

A DNS szálfolytonosság-hiányokat többféle módon is megjelöltük. A Pol I templát-függő módon kapcsol a DNS szálfolytonosság-hiányok szabad 3' OH csoportjához biotinnal jelölt nukleotidokat (nem limitáló körülmények), melyek immunofluoreszcenciás módon konfokális mikroszkóppal detektálhatók. Amennyiben láncterminátor nukleotidok (ddNTP) is jelen vannak a jelölés során (limitáló körülmények), pontosabb lokalizáció érhető el a jelerősség terhére. A molekuláris combing rendszerben végzett kísérletek mikroszkópos képein valóban rövidebb DNS szakaszt jelöltünk meg limitáló körülmények között, a nem limitáló körülmények között elvégzett jelöléshez képest (15. ábra A és C). Limitáló jelölésnél a DNS szálak egy részének esetében a szálak végén egymás melletti foltok formájában felismerhetők az rDNS klaszter jelölődött transzkripciós egységei (15.B ábra), ami azt jelenti, hogy ezeken a helyeken a DNS kettős szál folytonos marad, tehát a kísérlet során egyszál folytonosság-hiányokat jelöltem. Ismert, hogy az rDNS transzkripcionális egységei közül egy időben nagyjából 50%-uk aktív [283, 284]. Nem limitáló jelölés esetén a DNS szálak közelítőleg fele hordoz jelet a fragment egyik végén, de mindössze a szálak körülbelül 2%-a hordoz jelet mindkét végén, és csupán a DNS szálak 0.5%-án mutattam ki belső jelölődést. Erre az a valószínű magyarázat, hogy a DNS szál jelet hordozó vége az rDNS klaszterre esik, míg a szál másik végén jelölhető 3' OH csoportot nem eredményező egyszál folytonosság-hiány (például TopI hasítás következtében) keletkezett, mely a combing kísérlet során megnövekvő DNS feszülés következtében (14. ábra) duplaszál töréssé alakult. A szálak végein detektált, jelölt DNS szakaszok mérete változó, ugyanis a szálfolytonosság-hiányokban gazdag rDNS régióban nagyobb valószínűséggel törik el a DNS a XII. kromoszóma többi részéhez képest (bár nem kötelezően; lásd 15.B ábra), így a DNS szálakon maradt jelölt transzkripciós egységek száma is változó. Terminális transzferáz enzim segítségével templát-független módon jelölhetők a DNS szálfolytonosság-hiányok biotinnal kapcsolt nukleotidok beépítésével. A TdT a szabad 3' OH csoportokhoz rövid, egyszálú nukleinsavként kapcsolja a jelölt nukleotidokat, mely szál a kettős szálú DNS-től térben elválik. Felmerült, hogy TdT-vel történő jelölésnél a transzkripció során keletkező RNS/DNS hibridek 3' OH csoportja is jelölődhet. A kísérleteket RNáz emésztést tartalmazó lépéssel megismételve az RNáz-zal nem kezelt kontroll mintához hasonló számú jelet kaptam (16. ábra), miközben az RNS/DNS hibridek az RNáz emésztés hatására teljesen eltűntek. Élesztő DNS-en nyert tapasztalataim azt mutatták, hogy a végjelölési eljárás valóban szabad DNS végeket mutat ki és ezek a végek jelentős hányadukban egyszál-töréseknek felelnek meg. A kísérletek révén fény derült arra is, hogy az egyszál-törések

mentén a DNS törékeny, az egyszál folytonosság-hiány könnyen válik duplaszál töréssé mechanikai behatásokra.

4.2.3. A TopII asszociált promoter-proximális egyszál folytonosság-hiányok lehetséges szerepe a kromatin hurokméret kialakításában és a transzkripció szabályozásában

A DIP-seq kísérleteinket G₀ állapotú hPBMC sejtek kromatinján végeztük, kizárva, hogy a DNS replikáció során jelentkező szabad végeket jelöljük. Az eredmények szerint a DNS szálfolytonosság-hiányok az aktív gének promoterein halmozódnak (18. ábra). Ugyanezen sejtek fixált preparátumain, STED mikroszkópiával, a DNS egyszál folytonosság-hiányok kolokalizációját detektáltam transzkripciót iniciáló és elongáló RNS polimerázzal (19. ábra), megerősítve a DIP-seq kísérletek eredményét. Az általunk detektált promoter-proximális egyszál folytonosság-hiányok (18. és 19. ábrák) jelenléte egybeesik azon irodalmi adatokkal, melyek egy-egy gén esetében mutatnak ki aktivitással összefüggésben jelentkező száltöréseket [141, 147, 151, 156, 285-287]. Az irodalmi adatok alapján feltérképezett DNS szálfolytonosság-hiányok CTCF/cohesin-közeli lokalizációt mutatnak, de az irodalomban ellentmondások találhatóak a pontos lokalizáció tekintetében [160, 288].

S. cerevisiae esetében is DNS egyszál folytonosság-hiányok halmozódását láttuk az aktív gének promoterein (a disszertáció alapját képező II. cikk [161] 2. és 6. ábrája). A molekuláris combing kísérletek során konfokális mikroszkóppal készített képeket elemezve kiszámoltam, hogy a *S. cerevisiae* DNS átlagosan 100-150 kb méretű DNS szakaszonként tartalmaz 1 db jelölt DNS szálfolytonosság-hiányt. A DIP-seq adataink alapján a DNS egyszál folytonosság-hiányokat jelölve a detektált read-ek 10%-a halmozódik az aktív gének promoter régióján, míg a read-ek 90%-a a genom többi részén eloszlik. Mivel a DIP-seq minták esetében sok sejtben indultunk ki, egy read egy adott genomi helyen csak minden sokadik sejtben lehet jelen, és ez a gyakoriság ezekből a kísérletekből nem határozható meg. Ugyanakkor a molekuláris combing kísérletek során detektált DNS egyszál folytonosság-hiányok gyakoriságából ezt megbecsülhetjük. Mivel egy diploid hPBMC sejt genomja megközelítőleg 6 milliárd bázispárból áll, és a genomban 14-28000 aktív gén TSS található, ezekből az adatokból kiszámolva átlagosan 150-200 kb-onként fordul elő egy TSS. Ez megfelel a DNS egyszál folytonosság-hiányok molekuláris combing kísérletekben általam kiszámolt (100-150 kb) gyakoriságának (4. táblázat).

Az általam használt 3' OH jelölés TopII aktivitásra jellemző szabad végek kimutatására alkalmas. Ilyen természetű végeket más enzimek is produkálhatnak, ezért a folytonosság-hiányok lehetséges eredetére vonatkozóan további kísérleteket végeztem. Mivel a cleavage complexben kovalensen rögzült TopII-t és annak proteolitikus maradványát is a TDP2 enzim képes kötni és eltávolítani, megkíséréltem molekuláris combing rendszerben a DNS-kötött és a fehérjementesítés során részlegesen degradálódott TopII jelenlétét biotinilált TDP2 segítségével detektálni. Ehhez összehasonlítottam a biotin-TDP2 jelek és a DNS szálfolytonosság-hiányok lokalizációját emlős sejtek DNS-én (17. ábra). A bTDP2 segítségével jelölt TopII nagymértékű kolokalizációját mutattam ki DNS szálfolytonosság-hiányokkal emlős sejtek DNS-én.

Fentieket egy olyan modellben értelmezzük, melyben a TopII által okozott egyszál folytonosság-hiányok lokális DNS relaxációt eredményezve elősegítik a promotertől 3' irányban elhelyezkedő +1 nukleoszóma destabilizációját, elősegítve ezen barrier legyőzését és az RNS polimeráz továbbhaladását a DNS mentén.

4.2.4. A genomi DNS topológiai dichotómiája

A halo és comet kísérleti rendszereket régóta használják DNS károsító ágensek következtében kialakuló duplaszálú DNS-törések és apoptotikus DNS fragmentáció kimutatására [289, 290], valamint az intakt kromatin szerkezeti sajátosságainak vizsgálatára is [291, 292]. A módszernek az az alapja, hogy a detergenssel történő sejtlízist követően magas ionerősségű oldat segítségével a hisztonok a DNS-ről eltávolíthatók, és a DNS hurkok a laminán át kibugyanva DNS festéssel holdudvarszerű képletet, ún. halot alkotnak. DNS festésre interkalálódó SYBR Gold-ot alkalmazva kimutattuk, hogy különböző interkalátor koncentrációk mellett a halo DNS hurkainak szuperhelicitása megváltoztatható (21. ábra), mely a halo sugarának az interkalátor koncentrációjától függő megváltozásában nyilvánul meg. Alacsony interkalátor koncentráció a DNS relaxáció irányában hat. A nukleoszómák sókezeléssel kiváltott disszociációja után ott maradó, negatívan túltekert DNS plektonémákba szerveződik, melybe az interkalálódó SYBR Gold $Wr \rightarrow Tw$ átalakulást előidézve DNS hossznövekedést okoz. Egy ponton túl a DNS pozitívan túltekertté válik, melyet a Wr ellentétes irányú növekedése kompenzál, a DNS-hurkok rövidülésével kísérve. A halóban található DNS ezen viselkedése egyértelmű kísérleti bizonyítéka annak, hogy itt intakt, szuperhelikális DNS hurkok találhatóak. Ugyanakkor a 3' OH jelöléssel

kimutatott DNS egyszál folytonosság-hiányok többnyire a hurkok tövén, lamina-proximálisan helyezkednek el (20. ábra), vagyis a relaxált és szuperhelikális kromatin régiók élesen szeparálódnak a halo preparátumban, ami arra utal, hogy ez a topológiai szeparáció valamilyen módon megvalósul a natív sejtmagban is. A valószínűleg TopII-eredetű egyszál folytonosság-hiányok nukleáris laminával összefüggő strukturához rögzülnek, mely limitálja a szálfolytonosság-hiány miatti relaxáció tovaterjedését a halora. Ez a modell összhangban van azokkal a megfigyelésekkel, melyek szerint a transzkripció fix struktúrához kötötten ún. transzkripciós gyáraknak nevezett intranukleáris doménekből zajlik, miközben a DNS áthalad rajtuk.

Ismert, hogy a kromatin lokálisan hurkokba [293] és TAD-okba (Topológiaiilag Asszociált Domén) [294, 295] szerveződik. A cohesin jól ismert funkciója, hogy a testvér kromatidákat összetartja a mitotikus sejtosztódás során, de újabban leírták a fehérje fontos szerepét interfázisban a kromatin hurkok szervezésében is [296]. Emlősökben a kromatin hurkok kihorgonyzó pontjain gyakran előfordul a DNS szekvenciában a CCCTC motívum, melyhez CTCF (CCCTC kötő faktor) és cohesin kötődik [293, 297]. Úgy gondolják, a cohesin a kromatin hurok képződésének/loop extrusion egy központi molekulája. Egy modell szerint a kromatin hurkok kialakulásában két cohesin gyűrű köti a DNS-t és kapcsolja össze a hurok kezdő- és végpontját, mely pont CTCF fehérjéhez horgonyzódik ki. A kromatin hurkok kihorgonyzódási pontjain transzkripció-függő TopII aktivitást detektáltak, mely korrelál a transzkripció intenzitásával [298] és cohesin jelenlétével [288]. Mások leírták, hogy a TopII β azon túl, hogy a hurkok tövén halmozódik [147, 288, 299], fizikailag kapcsolatba is lép a CTCF és cohesin fehérjékkel [299]. Feltételezik, hogy a kromatin hurkok tövén a TopII a transzkripció [299] és a kromatin hurkok formálódása [288] során fellépő topológiai stressz csökkentésében játszik szerepet. Eredményeink alapján azt gyanítjuk, hogy a TopII fenti szerepe a 3D kromatin domének szerveződésében szoros kapcsolatban állhat a téziseimben leírt, TopII-eredetű DNS-törésekkel. Itt bemutatott adataim ezek génszabályozást és szuperhelikális- illetve relaxált doméneket egyaránt szervező jelentőségére utalnak.

5. Anyagok és Módszerek

5.1. Sejtenyésztés

A Jurkat és H2B-GFP-t expresszáló HeLa sejteket T150 flasksban (Corning Glass Works, Corning, NY) 10% FBS tartalmú médiumban tenyésztettem. A tenyészfolyadék penicillint (100 µg/ml), streptomycint (0.25 µg/ml) és 2 mM végkoncentrációban glutamint tartalmazott.

5.2. hPBMC és monocita eredetű DC sejtenyészetek

A hPBMC és DC sejteket az Immunológiai Intézetből (Debrecen) kaptuk Dr. Bácsi Attilától. Az egészséges donoroktól vett vérből készült fehérvérsejtekben gazdag *buffy coat*-okat az Országos Vérellátó Szolgálat igazgatójának és a Debreceni Egyetem Tudományos Etikai Bizottságának engedélyével szereztük be az Országos Vérellátó Szolgálat regionális vérellátó központjából (Debrecen, Magyarország). A véradók tájékoztatást kaptak arról és írásos formában beleegyezésüket adták ahhoz, hogy adataikat az Európai Unió irányelveinek megfelelően dolgoztuk fel és tároljuk. A hPBMC sejteket Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Svédország) oldattal történő standard sűrűség-gradiens centrifugációs módszerrel izoláltuk. A monocitákat a hPBMC sejtekből CD-14 mikrogyöngyök segítségével immun-mágneses sejtseparálási módszerrel különítettük el a gyártó leírása alapján (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Németország). A VarioMACS mágneses szeparálás után a sejtek 96-99%-a CD-14⁺ monocitának bizonyult, melyet áramlási citométerrel ellenőriztünk. A monocitákat 1 x 10⁶ sejt/ml-es koncentrációban AIM-V médiumban (Gibco, Paisley, Skócia) tenyésztettük, a médiumot L-glutaminnal és 1% Gentamicin/Streptomycin oldattal (Hyclone, South Logan, Utah) egészítettük ki. A szeparálás napján és a rá következő második napon a médiumhoz 100 ng/ml végkoncentrációban IL-4-et (PeproTech EC, London, Egyesült Királyság) és 80 ng/ml végkoncentrációban GM-CSF-et (Gentaur Molecular Products, Brüsszel, Belgium) adtunk. A monocitákat 5 napig tenyésztettük 24-lyukú sejtenyésztő lemezen.

5.3. Élő sejtek alacsony olvadáspontú agarózba (LMP) történő beágyazása

A sejtek beágyazását [124] szerint hajtottam végre. Röviden, 8-lyukú kamrák lyukait (Ibidi, Martinsried, Németország) 1% (m/v) alacsony olvadáspontú (LMP) agarózzal vontam be. A 6×10^6 sejt/ml koncentrációjú sejtszuspenziót (PBS-ben) összekevertem 1 x PBS-ben feloldott 1%-os LMP agarózzal 37 °C-on, és az agarózos szuszpenziót a lyukak közepén homogéne szétterítettem. A kamrát jégre tettem, miután az agaróz polimerizálódott, 1% FBS tartalmú sejtenyésztió médiumot adtam a lyukakhoz.

5.4. Minták készítése tömegspektrometriás kísérletekhez

36 μ M Dox kezelt és kontroll sejteket lizáltam 0.8 ml 2×10^7 sejt/ml koncentrációjú sejtszuspenzió és 0.2 ml 1% Triton X-100-at tartalmazó jéghideg PBS összekeverésével jégen. 10 perc inkubáció után 14 ml jéghideg PBS-sel leállítottam a lízist, a magokat 500 g-vel 5 percen át centrifugáltam. A felülúszót Amicon Ultra 0.5 ml-es szűrővel (EMD Millipore, Darmstadt, Németország) töményítettem, végül tömegspektrometriával analizáltam. A sejtmagokat PBS/EDTA-ban frissen oldott 4%-os formaldehiddel 10 percen át inkubálva fixáltam, majd agarózba ágyaztam 8 lyukú kamrában (Ibidi, Martinsried, Németország) a fent leírt módon. A minták fehérje koncentrációját Bradford módszerrel határoztuk meg. A mintákat 5%-os SDS-poliakrilamid gélen 80 V-on 15 percig elektroforetizálva tisztítottuk meg (Kalló Gergő munkája). A fehérjéket Coomassie Brilliant Blue festékkel festettük, majd kivágtuk a gélből és a gélkockán belül tripszinnel emésztettük. Ezután a mintákat 20 mM dithiotreitollal 56°C-on kezeltük, melyet alkilálás követett 55 mM jódiacetamiddal 45 percen át. A tripszines kezelést MS tisztaságú TPCK-kezelt tripszinnel (AbSciex) végeztük egy teljes éjszakán át 37°C-on. Ezután az emésztett peptideket kivontuk és liofilizáltuk. A peptideket végül feloldottuk 10 μ l 1%-os hangyasavban, majd az LC-MS analízis előtt a mintákhoz egyenlő arányban ismert retenciós idővel rendelkező (indexed retention time (iRT) peptidkeveréket (Biognosis) adtunk. A mintákat duplikátumok formájában mértük.

5.5. LC-MS analízis

Az LC-MS analízis Kalló Gergő munkája, a részletes leírás megtalálható a [168] (a disszertáció alapját képező I. cikk) közleményben. A tömegspektrometriás mérés előtt a peptideket víz/acetonitril grádiens segítségével elválasztottuk Easy nLC 1200 nano UPLC (Thermo Scientific, Waltham, USA) készülékkel, melyet mosási lépések követtek. A tömegspektrometriás mérés egy Orbitrap Fusion tömegspektrométer (Thermo Scientific, Waltham, USA) segítségével történt. Minden egyes mérés esetén kiválasztottuk a 14 leggyakrabban előforduló, többszörösen töltött iont az MS/MS analízishez.

5.6. Tömegspektrometriás adatok analízise

A gyűjtött LC-MS/MS adatokat fehérjék azonosítására és kvantifikációjára használtuk fel (Kalló Gergő munkája), melyet MaxQuant 1.6.2.10 programmal végeztünk [300] a [168] (a disszertáció alapját képező I. cikk) referenciában leírtak szerint. A felismert fehérjék LFQ értékét normalizáltuk az iRT keverék LFQ értékére. A relatív fehérje mennyiségeket az 1. táblázat alapján számoltuk ki.

A sejtmagban maradt H2A és H2B hisztonokat immunfluoreszcenciával jelöltem. Ezeket az intenzitásokat és a lizátumban tömegspektrometriásan mért fehérje szinteket azonos skálán hasonlítottuk össze (lásd 12. ábra) a következő egyenletek alapján:

$$\text{H2A-CTRL}_{(m)} + a * \text{H2A-CTRL}_{(l)} = \text{H2A-CTRL}_{(ö)}$$

$$\text{H2A-Dox}_{(m)} + a * \text{H2A-Dox}_{(l)} = \text{H2A-Dox}_{(ö)}$$

$$\text{H2B-CTRL}_{(m)} + a * \text{H2B-CTRL}_{(l)} = \text{H2B-CTRL}_{(ö)}$$

$$\text{H2B-Dox}_{(m)} + a * \text{H2B-Dox}_{(l)} = \text{H2B-Dox}_{(ö)},$$

a -t kifejezve:

$$a = (\text{H2A-CTRL}_{(m)} - \text{H2A-Dox}_{(m)}) / (\text{H2A-Dox}_{(l)} - \text{H2A-CTRL}_{(l)}),$$

ahol az a egy konstans, melyet a tömegspektrometriásan mért fehérje egységének LSC-vel mért fluoreszcencia intenzitás egységgé való átváltásához használtam. Az egyenletekben szereplő l , n

és ő a lizátumban, a sejtmagban mért, illetve az összes mennyiséget jelenti. A 12. ábrán a sejtmagban maradt és a lizátumban mért H2A és H2B mennyiségek százalékos ábrázolása látható.

5.7. Sejtek kezelése

Dox, puromycin, cycloheximide, leptomycin B, PYR-41, α -amanitin, actinomycin D, 2-D08 (mind Sigma, Budapest, Magyarország), 17-AAG (Reagents Direct, Encinitas, USA), MLN4924 (EMD Millipore, Darmstadt, Németország) és MLN7243 (Chemgood, Glen Allen, USA) anyagokat komplett DMEM médiumban az ábrákon feltüntetett koncentrációkra hígítottam és élő sejtekhez adtam az ábrákon jelzett ideig, melyet a minták fixálása és lízise követett.

5.8. Sejtmag preparátumok készítése

A 8 lyukú kamrák lyukaiba előzetesen agarózba ágyazott sejteket 500 μ l jéghideg 1x PBS-sel háromszor megmostam, mosásonként 3 percen át, ezután permeabilizáltam a következő módok egyikével: (I) A mintákat előfixáltam 400 μ l jéghideg 4%-os (m/m) formaldehid oldattal, melyet 1x PBS/EDTA-ban oldottam fel. Az előfixálást jégen végeztem 15 percen keresztül, ezután a sejteket úgy permeabilizáltam, hogy az előfixáló oldatot lecseréltem 500 μ l jéghideg 1% (v/v) Triton X-100 tartalmú PBS/EDTA-ra (5 mM EDTA PBS-ben) és 10 percig jégen inkubáltam. (II) A mintákat jéghideg PBS/EDTA-ban oldott 1% (v/v) Triton X-100 oldattal lizáltam 10 percen át jégen. (III) A mintákat 500 μ l jéghideg 1% (v/v) Triton X-100 tartalmú oldattal lizáltam, amit 300 mM szukróz és 5 mM EDTA tartalmú oldatban oldottam fel. A lízis 10 percen át zajlott jégen. A lízist még egyszer megismételtem, majd a sejtmagokat 500 μ l jéghideg PBS/EDTA-val háromszor 3 percig mostam. A szuperrezolúciós mikroszkópiás kísérletekhez készült minták közül a 19. ábra mintáit a fent leírt módon előfixálva készítettem, a 20. ábrán szereplő halo preparátumokat előfixálás nélkül, 1% (v/v) Triton X-100/PBS/EDTA oldattal történő lízis után 2 x 500 μ l / well jéghideg 2M NaCl tartalmú PBS/EDTA-val (5 mM EDTA PBS-ben) inkubáltam 10 percig jégen, végül a mintákat 3x3 percig mostam PBS/EDTA oldattal.

5.9. Immunofluoreszcenciás jelölés

A permeabilizáció után a mintákat 500 μ l PBS/EDTA-ban oldott 5% (m/v) Blotto zsírintes tejpor oldattal (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Kalifornia, USA) inkubáltam 30 percig jégen abból a célból, hogy az aspecifikus antitestkötést csökkentsem. A mintákat 500 μ l jéghideg 1 x PBS/EDTA oldattal háromszor 3 percig mostam. Az indirekt immunofluoreszcens jelölést egérben termelt monoklonális anti-H2B (ab52484, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság; 1 mg/ml), nyúlban termelt poliklonális anti-H2B (Sigma-Aldrich; 1 mg/ml) vagy nyúlban termelt poliklonális anti-H2A antitesttel (ab18255, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság; 1 mg/ml) végeztem. Az elsődleges antitesteket 150 μ l 1 x PBS/EDTA/1% BSA-ban (1% (w/v) marha szérum albumint (BSA) tartalmazó 1 x PBS/EDTA-ban) hígítottam és a mintákhoz adtam, majd jégen inkubáltam egy éjszakán át. A fent felsorolt összes antitestet 1:800 hígításban adtam. Az elsődleges antitestes jelölés után a mintákat 500 μ l jéghideg 1 x PBS/EDTA-val háromszor mostam 10 percen át. A másodlagos antitesttel történő jelölést szintén 150 μ l 1% BSA/PBS/EDTA-ban végeztem jégen 2 órán át Alexa fluor 488-cal (A488) vagy Alexa fluor 647-tel (A647) konjugált kecskében termelt anti-egér IgG vagy szintén kecskében termelt anti-nyúl IgG antitestek (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) hozzáadásával, hasonló eredménnyel. Az ábrákon feltüntetett H2A-t A647-tel (piros csatorna), a H2B-t A488-cal (zöld csatorna) detektáltam. A másodlagos antitesteket szintén 1:800 hígításban alkalmaztam, melyet 2 mg/ml törzsoldatból 1% BSA/PBS/EDTA-ban hígítottam ki. A másodlagos antitesttel történő jelölés után a mintákat 500 μ l jéghideg PBS/EDTA-val háromszor 10 percig mostam. Ezután a mintákat 200 μ l 12.5 μ g/ml propidium jodiddal (PI) (1x PBS/EDTA-ban feloldva) festettem 60 percen át jégen. A festett magokat háromszor három percig mostam 500 μ l jéghideg PBS/EDTA-val. A minta fluoreszcencia intenzitását iCys pásztázó lézer mikroszkóppal mértem.

A korábban leírt tejporos blokkolás után a fent leírt hígításban és ideig jelöltem nyúlban termelt, Ser5 és Ser2 foszforilált RNS polimeráz II ellenes (ab5095 és ab5131, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság) vagy Lamin B ellenes (ab16048, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság), nyúlban termelt (elsődleges) antitesttel. Másodlagos antitestként STED-re alkalmas Abberior Star 580 fluoreszcens festékkel jelölt, kecskében termelt nyúl IgG ellenes antitestet (s-12-2015hp, Abberior, Göttingen, Németország) használtam a fent leírt módon. A beépített biotint Abberior

Star Red STED-re alkalmas fluoreszcens festékhez kapcsolt streptavidinnel (Abberior, Göttingen, Németország) detektáltam.

5.10. Konfokális mikroszkópia

A képeket egy Olympus FluoView 1000 típusú konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készítettem 488 és 643 nm-es lézerek és 60x-os olaj immerziós objektív segítségével. ImageJ program segítségével állítottam össze és értékeltem ki a kompozit képeket. A műszer beállításai (lézer teljesítmény, fotoelektron sokszorozó feszültség, szoftveres erősítés) és a képkiértékelő program beállításai (fényerő, kontraszt, gamma faktor) mind azonosak voltak az egymással összehasonlított minták esetében. A sejtmag H2B tartalmát úgy határoztam meg, hogy a képek analízise során csak a sejtmagból származó immunfluoreszcens jelet vettem figyelembe. Ha a teljes sejtben mért összesített H2B intenzitásból (integrálból) kivonjuk a sejtmagban mért intenzitások összegét, megkapjuk a citoplazma H2B szintjét (8-10 reprezentatív sejt / minta). Két minta összehasonlításánál Student-féle t-tesztet, több minta összehasonlításakor egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) és Holm-Sidak *post hoc* tesztet használtam.

5.11. Automata pásztázó lézer mikroszkóp (LSC)

Az automata mikroszkópos felvételeket egy iCys műszerrel (iCys Research Imaging Cytometer; CompuCyte, Westwood, Massachusetts, USA) végeztem. Az A488-at és a PI-ot 488 nm-es argon ion lézerrel gerjesztettem, az A647-et pedig 633 nm-es HeNe lézerrel. A fluoreszcencia jeleket UPlan FI 20 x (NA 0.5) objektív segítségével gyűjtöttem. Az A488 fluoreszcenciáját 510/21 nm-es és 530/30 nm-es szűrőkkel, míg az A647 és PI fluoreszcenciáját 650/LP nm-es szűrővel detektáltam. A képek (1000 x 768 pixel) 1.5 μm -es lépéstávolsággal készültek. A képek kiértékelését és a műszer hardveres vezérlését az iCys 7.0 programmal végeztem Windows XP operációs rendszer alatt. A G₁ fázisú magok kapuzását a PI-dal jelölt DNS eloszlási hisztogramja alapján végeztem. A sejtmag összes pixelének fluoreszcencia intenzitását összegezve, fluoreszcencia integrál formájában számolta ki a szoftver. Az ábrákon látható szimbólumok a mért pontokat, míg a görbék a legjobb illesztést mutatják. A 3 paraméteres szigmoid görbék illesztését SigmaPlot 12.0 programmal végeztem. A 5. és 13. ábrán látható minták

fluoreszcencia intenzitásait '1'-re úgy normalizáltam, hogy a görbék illesztése előtt a G₁ fázisú magok esetében a különböző Dox koncentrációval kezelt minták intenzitásait a kezeletlen minta átlag intenzitásával elosztottam. A DNS tartalom és a cirkularitás segítségével 200-1000 G₁ fázisú sejtmag intenzitását vettem figyelembe 500-2000 eseményből. Az ábrákon feltüntetett SEM értékeket egy reprezentatív kísérlet során mért adatpontokból számoltam.

5.12. Életképesség vizsgálat

Dox kezelés után azonnal megvizsgáltam a sejtek életképességét 2 µg/ml PI és Annexin V-FITC kit (MBL, Woburn, Egyesült Királyság) segítségével a gyártó által adott leírás alapján.

5.13. Élesztő tenyésztése és szinkronizációja G₁ fázisban

A BY4741 *Saccharomyces cerevisiae* sejteket a korábban leírt [301] módon tenyésztettük (Hegedüs Éva munkája). Röviden, az élesztő sejteket különálló kolóniákból folyékony YPD táptalajba (1% élesztő extraktum, 2% bactopecton, 2% glükóz, pH=5) leoltottuk és 30°C-on növesztettük, amíg a sejtkoncentráció ~2 x 10⁷ sejt/ml (logaritmusos fázis, OD₆₀₀=1) értéket elérte. A logaritmusos fázisban az élesztő sejtek életképessége ~100% volt, a sejtek képesek voltak kolóniák képzésére, tehát a kísérletek során nem apoptotikus élesztő sejtekkel dolgoztam. Amennyiben G₁ fázisban szinkronizáltuk a sejteket, OD₆₀₀=0.7 eléréséig növesztettük, majd α-faktorról (50 ng/ml végkoncentrációban, Sigma-Aldrich) inkubáltuk a sejteket 1.5 órán keresztül 30°C hőmérsékleten. A szinkronizációt mikroszkóppal ellenőriztük.

5.14. Agaróz blokkok készítése élesztő és hPBMC sejtekből, DNS izolálás

Az agarózba ágyazott *S. cerevisiae* blokkok készítése [301] alapján történt. Röviden, a *S. cerevisiae* sejteket centrifugáltuk és kétszer mostuk 50 mM EDTA (pH 8.0) oldattal és szferoplasztáló oldatban (0.9M szorbitol, 0.125 M EDTA, 100 mM dithiothreitol, 2 mg/ml lyticase (Sigma-Aldrich)) reszuszpendáltuk. A mintákat 1:1 arányban 0.9 M szorbitol/0.125 M EDTA-ban feloldott 1.5%-os LMP agarózzal (Sigma-Aldrich) összekevertük és minta tartó zsebekbe pipettáztuk, 4°C-on hagytuk megszilárdulni 5 percig, végül 0.9 M szorbitol/0.125 M EDTA

oldatban inkubáltuk 37°C-on 6 órán át. Minden egyes minta $\sim 3 \times 10^8$ sejtet tartalmazott. Az élesztő szferoplasztokat tartalmazó agaróz blokkokat 0.5 mg/ml Proteináz K (Thermo Fisher Scientific) tartalmú lízis oldatban (0.5 M EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% SDS, pH 8.0) inkubáltuk 55°C hőmérsékleten, 2 napon keresztül. Ezt követően mostuk TE-vel (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8.0), majd 0.75 μ M fenil-metil-szulfonilfluoriddal (PMSF, Sigma-Aldrich) inkubáltuk 37°C-on 10 percen keresztül, a reziduális Proteináz K inaktiválásának céljából. Végül a blokkokat TE-vel mostuk és ugyanebben a pufferben 4°C-on tároltuk. A korábban leírt módszerrel izolált hPBMC sejteket 3x PBS/EDTA-val mostam és a sejtekből agaróz blokkokat készítettem (0.5% LMP agaróz végkoncentrációt elérve, PBS/EDTA-ban feloldva). Minden egyes minta ~ 2.5 millió sejtet tartalmazott. A lízis és a deproteinálás az élesztő sejtek esetében használt lízis pufferrel megegyező összetételű oldatban és módon történt.

5.15. A *S. cerevisiae* XII. kromoszóma preparátum készítése

A *S. cerevisiae* kromoszómákat 1 %-os agaróz gélen (melyet 0.5X TBE-ben oldottunk fel) egy CHEF Mapper XA PFGE (pulzáló teres gél elektroforetikus rendszer) (Bio-Rad Laboratories, Inc.) segítségével választottuk el egymástól a [161] (a disszertáció alapját képező II. cikk) közleményben leírtak alapján, Hegedüs Éva munkája).

5.16. DNS szálfolytonosság-hiányok enzimátikus jelölése *E. coli* DNS Polimeráz I enzimmel

E. coli DNS Polimeráz I enzim segítségével biotinnal jelölt nukleotidok (biotin-dUTP, Thermo Fisher Scientific) építhetők be a DNS szálfolytonosság-hiányok helyére agarózba ágyazott sejtek esetében (a [161] cikkben leírtak alapján (a disszertáció alapját képező II. cikk), Hegedüs Éva munkája). Amennyiben ún. láncterminátor (ddNTP, Thermo Fisher Scientific) nukleotidokat is hozzáadtunk a jelölő keverékhez (limitált jelölés), pontosabb lokalizáció érhető el, ugyanis a láncterminátor nukleotidok jelenléte korlátozza a jelölés DNS szál menti terjedését <200bp-os régióon belül (lásd a disszertáció alapját képező II. cikk [161] kiegészítő S6. ábrája). Először a blokkokat mostam 3x DNS Polimeráz pufferrel (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) 20 percen át. Ezután az egyensúlyozás elősegítése céljából a blokkokat 150 U/ml DNS Polimeráz I enzimmel (Thermo Fisher Scientific) inkubáltam jégen 30 percen át DNS Polimeráz I

pufferben, mely 1 μM dNTP mixet tartalmazott (1 μM biotin-dUTP, 1 μM dATP, 1 μM dCTP, 1 μM dGTP) - limitált jelölés esetén 5 μM ddNTP mix-szel kiegészítve (5 μM ddATP, 5 μM ddTTP, 5 μM ddCTP, 5 μM ddGTP). Ezután a mintákat 20 percen át inkubáltam 37°C-on. Az optimális dNTP/ddNTP arányt egy PCR termék segítségével állapítottuk meg (a disszertáció alapját képező II. cikk [161] kiegészítő S6. ábrája). Standard (nem limitáló) szálfolytonosság-hiány jelölésnél a ddNTP mixet kihagytuk a reakciókeverékből.

5.17. DNS szálfolytonosság-hiányok jelölése Terminális Transzferázzal (TdT)

A jelölési reakciót 260 U/ml Terminális Deoxinukleotidil Transzferázzal (Thermo Fisher Scientific) végeztem az enzim saját gyári pufferében 1 μM biotin-dUTP segítségével. A reakció egyéb körülményei megegyeznek a Polimeráz I jelölés esetében leírtakkal.

5.18. Kombinált RNáz kezelés (RNáz A, HI, H2)

Aziz El Hage együttműködő partnerünk közlése alapján ez az enzimkombináció a leghatékosabb az RNS/DNS hibridek emésztése szempontjából. Az agarózba ágyazott sejtekből izolált DNS-t 12.5 U/blokk RNáz HI-gyel (Thermo Fisher Scientific) emésztettem 1 x RNáz HI pufferben (20 mM Tris-HCl pH 7.8, 40 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 1 mM DTT) 37°C-on egy teljes éjszakán át. Ezután blokkonként 5 μl 10 mg/ml RNáz A-t (Thermo Fisher Scientific) adtam a blokkokhoz TE-ben és 1 órán át inkubáltam szobahőmérsékleten. Ezután blokkonként szintén 5 μl humán RNáz H2 enzimet (ajándék Martin Reijns-től, Edinburgh-i Egyetem) adtam a mintákhoz RNáz H2 pufferben (60 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgCl₂, 0.01% BSA, 0.01% Triton X-100), melyet egész éjszakán át inkubáltam 37°C-on. Minden egyes emésztés előtt a blokkokat equilibráltam a megfelelő enzim pufferével 3x 20 percen át. Minden emésztést 150 μl reakció térfogatban végeztem.

5.19. DNS combing

A molekuláris DNS combingot teljes genomi és élesztőből izolált XII. kromoszóma DNS-én végeztem a korábban leírt módon [302]. A genomi vagy a CHEF segítségével izolált XII.

kromoszóma DNS-t agarózba ágyazva végjelöltem biotinnal jelölt nukleotidok beépítésével (limitált vagy nem limitált módon, lásd fentebb). Az agaróz blokkban lévő genomi vagy XII. kromoszómális DNS-t 1.6 ml 0.1 M MES (pH 6.5) hozzáadásával szolubilizáltam 70°C-on 20 percen keresztül inkubálva, ezután a mintákat 42°C-ra tettem 10 percre. A blokkok agaróz tartalmát 8 U/blokk Agarase enzimmel (Thermo Fisher Scientific) emésztettem 42°C-on egy teljes éjszakán át. Lambda fág DNS esetén a helyspecifikus egyszál folytonosság-hiányokat Nt.BbvCI nickase enzim segítségével hoztam létre, mely a Lambda fág genomban 7 helyen hoz létre egyszál folytonosság-hiányt (306, 318, 614, 3977, 8013 és 12451 bázispár méretű DNS szakaszokat körülhatárolva). 1.5 µg DNS-hez 50 U/ml Nt.BbvCI nickase enzimet (New England Biolabs) adtam 20 µl CutSmart pufferben és 30 percen keresztül inkubáltam 37°C-on. A DNS mintákat szobahőmérsékletre helyeztem és eldobható tartókba öntöttem át pipettázás nélkül. A DNS combingot egy Genomic Vision (Franciaország) készüléssel végeztem a gyártó leírása alapján egy 22 x 22 mm méretű vinilszilánnal bevont fedőlemezen (Genomic Vision, Franciaország). A combing után a fedőlemezeket üveg tárgylemezekre ragasztottam cianoakrilát ragasztó segítségével. Az antitestek aspecifikus jelölését 30 µl 5% BSA/1x PBS/0.1% Triton X-100 oldattal történő 20 perces inkubáció segítségével csökkentettem, melyet egy tiszta fedőlemez segítségével terítettem szét a DNS-t tartalmazó fedőlemezen egy nedves kamrában. A DNS molekulákba korábban beépített biotint indirekt immunfluoreszcenciás módszerrel detektáltam, 1:60 arányban hígítottam egérben termelt biotin ellenes (Sigma Aldrich) (elsődleges) antitestet. Az RNS/DNS hibridek detektálását S9.6 antitesttel végeztem 33 µg/ml végkoncentrációban (melyet hibridóma sejtvonalból állítottunk elő; ATCC). Az elsődleges antitesteket 1% BSA/1x PBS/0.1% Triton X-100 oldatban adtam hozzá a mintához és 45 percen át inkubáltam szobahőmérsékleten, nedves kamrában. A mintákat ezután 3x mostam 1x PBS-sel, majd tovább mostam 2x 30 µl PBS/0.1% Triton X-100 oldat hozzáadásával. Másodlagos antitestként Alexa Fluor 647-tel konjugált kecskében termelt anti-egér IgG antitestet (Life Technologies) használtam, melyet 17 µg/ml végkoncentrációban hígítottam ki 1% BSA/1x PBS/0.1% Triton X-100 oldattal, melyet szobahőmérsékleten inkubáltam 45 percig nedves kamrában. Rekombináns TDP2 fehérjét (Yves Pommier-től kaptuk ajándékba, NIH, USA) biotinnal megjelöltem (bTDP2) biotin konjugáló kit segítségével (Abcam) a gyártó utasításai szerint. A DNS mintákhoz 30 µl bTDP2 oldatot adtam (22 µg/ml végkoncentrációban), majd 45 percig inkubáltam nedves kamrában szobahőmérsékleten. Olyan kísérletek során, melyben a bTDP2-vel együtt jelöltük a DNS

szálfolytonosság-hiányokat biotin-dUTP helyett direkt módon, fluoreszcensen jelölt ChromaTide568-dUTP-t használtam a jelölés során. Ebben az esetben egér anti-biotin antitesttel és Alexa Fluor 647-tel kapcsolt egér ellenes IgG másodlagos antitesttel mutattam ki a bTDP2 kötődését. Az immunfluoreszcenciás jelölés után a fedőlemezeket a korábban leírt módon alaposan mostam. Az utolsó mosást PBS-sel végeztem 5 percen át. A DNS jelölésére 30 µl 1:5000-re (0.1 M MES-ben pH 6.5) hígított YOYO-1 festéket (Thermo Fisher Scientific) adtam a mintához, majd sötétben, nedves kamrában 20 percig inkubáltam szobahőmérsékleten. A fedőlemezekre ProLong® Gold Antifade (Thermo Fisher) oldatot cseppentettem, majd egy tiszta fedőlemezzel lefedve 4°C-ra helyeztem és egy éjszakán át inkubáltam. A mintát Olympus FluoView 1000 konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal vizualizáltam, 488, 543 és 633 nm-es lézereket és 60x-os olaj immerziós objektívet használtam.

5.20. DNS interkalátor relaxációs koncentrációjának meghatározása halo tekerési kísérleti rendszerben

Az LSC alkalmazásán alapuló mérési eljárást laboratóriumunkban Fenyőfalvi György állította be. Jurkat sejteket (1000 sejt/µl) izotóniás lízis pufferben (20 mM Tris-HCl pH 7.0, 300 mM szukróz, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM spermin, 0.2% (v/v) Triton X-100) lizáltam jégen 7 percen keresztül. Ezután, az előbbi puffer Triton X-100-at nem tartalmazó változatából annyit adtam a lizátumhoz, hogy 10 sejtmag/µl legyen a végkoncentráció, majd a lizátumot 100 µl térfogatokban átpipettáztam egy α-poly-L-lizinnel (MW 150 000–300 000) bevont 96 lyukú lemez lyukaiba (TPP, Svájc). Ezután a lemezt centrifugáltam (750 g, 10 perc, 4°C), majd minden egyes lyukból 70 µl-t eltávolítottam és 270 µl jéghideg extrakciós oldatot (20mM Tris-HCl pH 7.5, 2.22M NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA) adtam a lyukakhoz, mely segítségével a hisztonokat eltávolítottam a kromatinból. Ezután 270 µl-t óvatosan lecseréltem minden lyukban 270 µl tekerő oldatra (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2.22M NaCl), amit annyi SYBR Gold oldattal egészítettem ki előzetesen, amekkora SYBR Gold végkoncentrációk a 21. ábrán szerepelnek. A létrejött sejtmagi halokat LSC-vel mértem le.

5.21. Dox és Dox + PYR-41 együttes jelenlétének hatása fluoreszcensen jelölt, rekombináns hisztonok mobilitására FCS módszerrel

A rekombináns H2A és H2B hiszton fehérjéket (Sigma Aldrich) előzetesen DyLight 650 fluoreszcens festékkonjugáló kit (Abcam) segítségével megjelöltem 0.3-0.6 F/P jelölési arányban, majd szűrtem 1 x PBS-sel 200 nM-ra kihígítottam önmagában (kontroll); 36 μ M Dox (Dox); 36 μ M Dox + 50 μ M PYR-41 (Dox + PYR-41) jelenlétében. Az FCS mérésekhez üveg aljú FCS-re alkalmas 8 lyukú kamrát (Nunc) használtam. Az FCS méréseket egy Nikon-A1 típusú konfokális mikroszkópra szerelt PicoQuant-FLIM-FCS modul segítségével végeztük el. Mintánként 6 véletlenszerűen kiválasztott pontban mértünk (Mocsár Gábor segítségével), 25 °C hőmérsékleten. A mérésekre használt mikroszkóp Nikon Ti-E inverz, négy lézer gerjesztését használó (405, 488, 561 és 647 nm), superfoldású (2D és 3D STORM) és konfokális üzemmódú mikroszkóp volt. A PicoQuant modul 5 db picoszekundumos impulzus lézerekből (405 nm, 485 nm, 510 nm, 560 nm, 640 nm) valamint időkorrelált egyedi foton számláló (TCSPC, Time-correlated single-photon counting) elektronikából és nagy teljesítményű adatfeldolgozó számítógépből áll. A detektálás 440/40, 482/35, 520/35, 550/49, 594LP, 600/50, 690/70 nm emissziós szűrőkkel volt lehetséges. A mérésekhez 60 \times vízimmerziós (NA=1.2) objektívet használtunk. A DyLight 680 festéket 647 nm lézere gerjesztettük a maximális lézerteljesítmény 0.2%-val (a fókusz síkban $P_{max}=7.9$ mW). Ezzel a lézerteljesítménnyel a fotoelhalványulás okozta relatív intenzitáscsökkenést és az ebből származó műterméket az autokorrelációs függvényben minimalizáltuk. A festékek fluoreszcencia emisszióját 690/70 nm (Semrock, New York, USA) sávszűrővel szűrjük, s foton számláló lavina fotodiódával (SPCM-AQRH-14-TR, Excelitas, Toronto, Canada) TCSPC modul segítségével detektáltuk. A fotodiódák kimenetén a detektált fotonok beérkezése után egy 250 ps szélességű TTL jel jelenik meg, ezen TTL jelek felfutó élének a beérkezési idejét a TCSPC rendszer regisztrálta. Az autokorrelációs görbéket a foton beérkezési időkből a SymphoTime szoftver valós időben számolta ki multiple- τ algoritmussal. Az oldatok autokorrelációs görbéit 20 x 10 s mérési idővel határoztuk meg minden egyes mérési pontban, az empirikus görbéket mintánként átlagoltuk, majd SigmaPlot segítségével ábrázoltuk.

5.22. STED (Stimulált Emisszió Depléció) mikroszkópia, dekonvolúció és kolokalizáció számolás

A 8 lyukú kamrába ágyazott fixált sejtmagokat illetve halo preparátumokat egy Leica TCS SP8 STED 3X mikroszkóppal vizualizáltam (rövid tanulmányi út keretében az Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences intézményben, Prága, Csehország). A mintákat a mikroszkóphoz kapcsolt pulzáló fehér lézer (WLL2 – 470-640 nm, 1 nm léptetési távolság, 8 párhuzamos lézer vonal, egyenként 1.5 mW teljesítménnyel) segítségével gerjesztettem, és szuperszenzitív hibrid detektorokkal (HyD 400-720 nm) detektáltam. A kísérletekhez 775 nm-es pulzáló STED, >1.5 W teljesítményű depléciós lézert használtam, melyet a mérés előtt kalibrációs gyöngyök segítségével a megfelelő síkba beállítottam. Az Abberior Star 580, az Abberior Star RED és PI festékeket 580, 647 illetve 543 nm-es lézerrel gerjesztettem. A PI nem STED-képes festék, így a csatorna képeinek felbontása a konfokális mikroszkópos képekkel egyenértékű. A képek készítéséhez HC PL APO 100x/1.4 olaj immerziós (STED; FWD 0.13; CG 0.17) objektívet használtam, végül a mérés után a nyers képeket Huygens Professional (<https://svi.nl/Huygens-Professional>) dekonvolúciós programmal processzáltam. A kompozit képeket FiJi ImageJ programmal (<https://imagej.net/Fiji>) hoztam létre. A JACoP plugin (Just Another Colocalization Plugin, <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/track/jacop.html>) segítségével a különböző csatornában rögzített képek pixelei között kiszámoltam a Pearson-féle keresztkorrelációs és a Manders 1 és 2 együttállási együtthatókat („Manders 1” jelzi az 1-es csatorna pixeleinek átfedését a 2-es csatorna megfelelő pozícióban lévő pixeleivel, míg „Manders 2” a 2-es csatorna pixeleinek átfedését az 1-es csatorna megfelelő pozícióban lévő pixeleivel) minden analizált kép esetében. A keresztkorrelációs együtthatók eloszlása a 19. ábrán látható, melyeket mintánként 5-5 sejtől számoltam.

5.23. DNS immunoprecipitáció-szekvenálás (DIP-seq) és DIP-qPCR kísérletek

A DNS immunoprecipitáció-szekvenálás és a DNS immunoprecipitációval kapcsolt kvantitatív PCR (DIP-qPCR) kísérleteket [303] szerint végeztük kisebb módosításokkal. Röviden, a hPBMC sejteket 3x mostam PBS/EDTA-val, az életképességet tripánkék festési eljárással ellenőriztem, majd a mintát fixáltam 1% (m/v) PBS/EDTA-ban oldott formaldehiddel 10 percen át szobahőmérsékleten, melyet 0.7 M glicin oldattal oltottam ki. A mintát 3x mostam PBS/EDTA-

val és a fent leírt módon LMP agarózzal blokkokba ágyaztam. Minden egyes blokk ~2.5 millió sejtet tartalmazott. A mintákat a fent leírt módon lizáltam, fehérjementesítettem, és TdT-vel vagy Pol I enzimmel limitált körülmények között végjelöltem. Az agarózba ágyazott, végjelölt DNS preparátum blokkjaiból mintánként 6 db-ot használtam fel. A mintákat 4U/blokk koncentrációban agaráz enzim (Thermo Fisher Scientific) segítségével emésztettem. Ezután a mintákat egy Diagenode Bioruptor eszköz segítségével szonikáltam 200-1000 bp méretű DNS fregmentekre, a minták fragmentálását agaróz gélelektroforézissel verifikáltam. Szonikálás után az egyik TdT által végjelölt mintát 300 µg/ml végkoncentrációban RNáz A-val (Thermo Fisher Scientific) alacsony sókoncentráció mellett (TE-ben) 37°C-on 2 órán át emésztettem. A mintákat PCR cleanup kit (Macherey-Nagel) segítségével megtisztítottam az agaróztól. A fragmentált és tisztított DNS minták 95%-át (IP) előzetesen BSA-val blokkolt mágneses gyöngyökhöz (Dynabeads Protein G, Thermo Fisher) kötött anti-biotin (Sigma Aldrich) antitesttel immunoprecipitáltam egy teljes éjszakán keresztül, a minták 5%-át félretettem és -20°C-on tároltam (Input). Az eluált DNS-t PCR cleanup kit (Macherey-Nagel) segítségével megtisztítottam. Az IP és Input DNS mennyiségét Qubit fluoriméter segítségével quantitáltuk (Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium segítségével). A DIP-seq könyvtárkészítés Illumina módszerrel történt a gyártó utasításai szerint (Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium segítségével). A DIP-seq eredményeket qPCR-rel validáltam. A 13 aktív gén promoterén kimutatott csúcsra és a kilenc inaktív gén esetében halmozást nem mutató promoterre tervezett primerpárok segítségével 3 független kísérletben validáltam a DIP-seq kísérlet eredményét, melyet LightCycler® 480 (Roche) készülékkel végeztem.

5.24. DIP-seq kísérletek analízise

A DIP-seq adatok analízisét Czipa Erik és Halász László végezték. A szekvenált read-eket feltérképezték a referencia genomra (hg19) az itt leírt módon [304]. 3 egészséges donor hPBMC sejteinek RNS-seq adatai a GEO adatbázisból származtak (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE72502>:GSM1863325,GSM1863326, GSM1863327). Az FPKM (Fragments Per Kilobase Million) értékek kiszámolása után az FPKM értékek alapján történt a gének expresszált és nem expresszált kategóriákba való sorolása. Körülbelül 14000 expresszált és 28000 nem expresszált gén került azonosításra az FPKM értékek

alajján. Az Ngsplot program [305] segítségével kiszámolt read-elozslást mutatja a 18. ábra, expresszált (zöld vonal) és nem expresszált (narancs vonal) gének esetében. Csak a fehérjét kódoló gének TSS-étől 1000 bp-os távolságon belül lévő jeleket ábrázoltam.

6. Összefoglalás

6.1. Összefoglalás

A Dox kromatinra gyakorolt hatásait vizsgálva a következő eredményeket értem el:

1. Létrehoztam egy pásztázó lézer mikroszkópos kísérleti rendszert, mellyel kimutattam, hogy a Dox a H2A hiszton sejttagon belüli aggregációját indukálja, melyet nem kísér a H2B hiszton aggregációja.
2. A Dox az endogén H2B hiszton nukleo-citoplazmatikus transzlokációját okozza koncentráció- és időfüggő módon Jurkat, hPBMC és DC sejtekben.
3. A Dox indukált H2B nukleo-citoplazmatikus transzlokációja a fehérjelebontási folyamatokra ható PYR-41-gyel gátolható, és nem szüntethető meg a CRM1 mediált nukleáris export gátlásával. A SUMO-iláció gátlása részben antagonizálta a PYR-41 gátló hatását a H2B Dox indukálta transzlokációjára.
4. Tömegspektrometriás mérésekkel kimutattam, hogy a Dox kezelés a H2B mellett további sejtmagi fehérjék nukleo-citoplazmatikus transzlokációját is kiváltja PYR-41 érzékeny módon.

Megfigyeléseim az interkaláció során az eviktált hisztonok spontán aggregációjával, az aggregátumok lebontásának és nukleo-citoplazmatikus exportjának figyelembe vételével magyarázhatóak. A munkámban leírt, Dox által kiváltott globális kromatinszerkezet változásoknak orvosiológiai jelentősége lehet az antraciklinek hatásai és mellékhatásai szempontjából egyaránt.

A kromatin topológiai heterogenitásával kapcsolatos megfigyeléseim:

Mivel a Dox és egyéb antraciklinek kromatinba történő interkalációja függ a DNS topológiai állapotától, feltérképeztem az endogén DNS egyszál folytonosság-hiányok következtében kialakuló relaxált kromatin régiókat, melyek a DNS interkalátor gyógyszerek DNS kötődésének predilekciós pontjai lehetnek.

1. Kidolgoztam és *S. cerevisiae* genomi DNS-en validáltam egy enzimatikus jelölési módszert, mely alkalmas DNS szálfolytonosság-hiányok specifikus megjelölésére, továbbá beállítottam egy

molekuláris combing alapú kísérleti rendszert, mely alkalmas a jelölt egyedi DNS szálak fluoreszcenciás módszerrel történő vizualizálására.

2. Az előbbi jelölési stratégiával DNS immunoprecipitációs, szekvenálásos kísérletben endogén DNS egyszál folytonosság-hiányokat térképeztem hPBMC sejtek DNS-én. Megállapítottam, hogy azok az aktív gének promoterein halmozódnak.

3. Szuperfeloldású mikroszkópiával kolokalizációt detektáltam DNS egyszál folytonosság-hiányok és Ser5/Ser2-foszforilált RNS polimeráz II között.

4. Molekuláris combing kísérletekkel kimutattam, hogy a DNS egyszál folytonosság-hiányok kolokalizálnak TDP2-jelöléssel kimutatott TopII-vel hPBMC sejteken.

5. Magi „halo” preparátumon igazoltam, hogy a halo nukleáris laminán kitüremkedő része szuperhelikális, míg a szálfolytonosság-hiányok halmozódását detektáltam a lamina-proximális területeken.

A kromatinállomány fentiekben jellemzett topológiai kettőssége a magasabbrendű kromatinszerkezet alapvető szervező mechanizmusának tűnik. A relaxált domének az interkalálódó ágensek preferált támadáspontjaiként elsődlegesen járulhatnak hozzá az ilyen drogok sejtmagi hatásainak kiváltásához.

6.2. Summary

(Title: Doxorubicin-induced global changes and topological heterogeneity of chromatin.)

Investigating the effects of Dox on chromatin, the following results have been achieved:

1. I set up a scanning laser microscopic experimental system to show that Dox induces intranuclear aggregation of the H2A histone, and that this process is not accompanied by the aggregation of H2B;
2. I observed a novel phenomenon: Dox elicits the nucleo-cytoplasmic translocation of H2B in a concentration- and time-dependent manner in Jurkat, hPBMC, and DC cells;
3. The Dox-induced nucleo-cytoplasmic translocation of H2B can be inhibited with PYR-41, which affects protein degradation processes. The translocation cannot be abolished by the inhibition of CRM1-mediated nuclear export, while inhibition of SUMO-ylation partially antagonized the inhibitory effect of PYR-41 on Dox-induced H2B translocation;
4. I have shown by mass spectrometric analyses that, in addition to H2B, Dox treatment induces nucleo-cytoplasmic translocation of other nuclear proteins in a PYR-41 sensitive manner.

My observations can be interpreted in light of the spontaneous aggregation of histones evicted during intercalation, implicating protein degradation and nucleo-cytoplasmic export pathways in their clearance from the nucleus. The Dox-induced changes in global chromatin structure described in my work may have biomedical significance in connection with both the effects and side effects of anthracyclines.

Observations on the topological heterogeneity of chromatin:

Since intercalation of Dox and other anthracyclines into the DNA is favored by its relaxed topological state, I mapped the endogenous DNA breaks that may be preferred sites for the binding of such drugs.

1. I developed and validated an enzymatic labeling method suitable for the specific labeling of free 3'OH-marked DNA strand breaks, by setting up a molecular combing-based experimental system suitable for the fluorescence visualization of labeled individual DNA strands.

2. Using this labeling strategy, I mapped endogenous ssDNA breaks on the DNA of hPBMC cells by DNA immunoprecipitation and sequencing the promoters of active genes. I found that ssDNA breaks accumulate on the promoter regions of actively transcribing genes.
3. With superresolution microscopy, I detected co-localization between the free 3'OH-marked DNA breaks and Ser5 / Ser2-phosphorylated RNA polymerase II.
4. I have shown by molecular combing experiments that the free 3'OH-marked DNA breaks co-localize with TDP2-labeled TopII in hPBMC cells.
5. On nuclear halo preparations, I demonstrated that the protruding part of the halo through the nuclear lamina is superhelical, while I detected the accumulation of DNA single-strand breaks in the lamina-proximal areas.

The general picture emerging from the above shows that the strand breaks studied are of functional significance for gene regulation and also represent a global organizing principle for higher order chromatin structure. The relaxed domains associated with the breaks may be the primary targets of DNA intercalating drugs.

7. Tárgyszavak

Doxorubicin, antraciklinek, kromatin aggregáció, hiszton evikció, nukleo-citoplazmatikus transzlokáció, DNS egyszál folytonosság-hiány, topoizomeráz II, DNS combing, interkalátor, halo

Key words

Doxorubicin, anthracyclines, chromatin aggregation, histone eviction, nucleo-cytoplasmic translocation, single stranded DNA discontinuity, topoisomerase II, DNA combing, intercalator, halo

8. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:



Nyilvántartási szám: DEENK/359/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Nánási Péter Pál ifj.

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Nánási, P. P. i.**, Imre, L., Firouzi Niaki, E., Bosire, R., Mocsár, G., Türk-Mázló, A., Ausio, J., Szabó, G.: Doxorubicin induces large-scale and differential H2A and H2B redistribution in live cells.
PLoS One. 15 (4), e0231223-, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0231223>
IF: 2.74 (2019)
2. Hegedűs, É., Kókai, E., **Nánási, P. P. i.**, Imre, L., Halász, L., Jossé, R., Antunovics, Z., Webb, M. R., El Hage, A., Pommier, Y., Székvölgyi, L., Dombrádi, V., Szabó, G.: Endogenous single-strand DNA breaks at RNA polymerase II promoters in *Saccharomyces cerevisiae*.
Nucleic Acids Res. 46 (20), 10649-10668, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky743>
IF: 11.147

További közlemények

3. Henn, L., Szabó, A., Imre, L., Román, Á., Ábrahám, A., Vedelek, B., **Nánási, P. P. i.**, Boros, I. M.: Alternative linker histone permits fast paced nuclear divisions in early *Drosophila* embryo.
Nucleic Acids Res. 48 (16), 9007-9018, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkaa624>
IF: 11.501 (2019)
4. Firouzi Niaki, E., Van Acker, T., Imre, L., **Nánási, P. P. i.**, Tarapcsák, S., Bacsó, Z., Vanhaecke, F., Szabó, G.: Interactions of Cisplatin and Daunorubicin at the Chromatin Level.
Sci. Rep. 10 (1), 1-12, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-57702-7>
IF: 3.998 (2019)





5. Bosire, R., **Nánási, P. P. i.**, Imre, L., Dienes, B., Szőőr, Á., Türk-Mázló, A., Kovács, A., Seidel, R., Vámosi, G., Szabó, G.: Intercalation of small molecules into DNA in chromatin is primarily controlled by superhelical constraint.
PLoS One. 14 (11), 1-18, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224936>
IF: 2.74
6. **Nánási, P. P. i.**, Komáromi, I., Gaburjakova, M., Almássy, J.: Omecamtiv Mecarbil: a Myosin Motor Activator Agent with Promising Clinical Performance and New in vitro Results.
Curr. Med. Chem. 25 (15), 1720-1728, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/0929867325666171222164320>
IF: 3.894
7. **Nánási, P. P. i.**, Komáromi, I., Almássy, J.: Perspectives of a myosin motor activator agent with increased selectivity.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 96 (7), 676-680, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1139/cjpp-2017-0741>
IF: 2.041
8. Nagy, L., Gődény, I., **Nánási, P. P. i.**, Leskó, Á., Balogh, L., Bánhegyi, V., Bódi, B., Csípő, T., Csongrádi, A., Fülöp, G. Á., Kovács, Á., Lódi, M., Papp, Z.: A szív pozitív inotróp támogatása a miozin-aktivátor hatású omecamtiv-mecarbil segítségével.
Cardiol. Hung. 47 (1), 69-76, 2017.
9. Imre, L., Simándi, Z., Horváth, A., Fenyőfalvi, G., **Nánási, P. P. i.**, Niaki, E. F., Hegedűs, É., Bacsó, Z., Weyemi, U., Mauser, R., Ausio, J., Jeltsch, A., Bonner, W., Nagy, L., Kimura, H., Szabó, G.: Nucleosome stability measured in situ by automated quantitative imaging.
Sci Rep. 7 (1), 1-15, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-12608-9>
IF: 4.122
10. **Nánási, P. P. i.**, Gaburjakova, M., Gaburjakova, J., Almássy, J.: Omecamtiv mecarbil activates ryanodine receptors from canine cardiac but not skeletal muscle.
Eur. J. Pharmacol. 809, 73-79, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.027>
IF: 3.04
11. **Nánási, P. P. i.**, Váczi, K., Papp, Z.: The myosin activator omecamtiv mecarbil: a promising new inotropic agent.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 94 (10), 1033-1039, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1139/cjpp-2015-0573>
IF: 1.822





12. **Nánási, P. P. i., Nánási, P. P.:** Problems with class 3 antiarrhythmic agents: conclusions of the past - perspectives of the future.

Curr. Topics Pharmacol. 15 (2), 11-18, 2011.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 47,045

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
13,887**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.11.23.



9. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönöm témavezetőmnek Dr. Szabó Gábornak a munkám során nyújtott kiváló szakmai segítségét, megértését és türelmét, valamint, hogy időbeli ráfordítást nem sajnálva segítette munkám előrehaladását. Köszönöm neki a rengeteg segítséget, a kiváló ötleteket, az együtt gondolkodást.

Köszönöm a munkacsoportunk tagjainak, különösképpen Dr. Imre Lászlónak és Dr. Hegedüs Évának a közös kísérletek megvalósítása során nyújtott szakmai segítséget, odafigyelést.

Köszönöm Dr. Szöllősi János professzor Úrnak és Dr. Panyi György professzor Úrnak, hogy intézetvezetőként segítették munkámat.

Köszönöm a technikai segítséget Téglási Annamáriának és Vezendiné Nagy Adélnak, akikkel az évek alatt együtt dolgozhattam.

Köszönöm Halász Lászlónak és Czipa Eriknek a DIP-seq kísérletek bioinformatikai analízisét, továbbá köszönöm Mocsár Gábornak a segítségét a FCS kísérletek során. Köszönöm Csősz Évának és Kalló Gergőnek a tömegspektrometriás kísérletekben nyújtott segítségüket.

A nevek felsorolása nélkül köszönöm a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet valamennyi dolgozójának, kollégáimnak és kollaborátoraimnak a szakmai és emberi segítséget.

Köszönöm Pavel Hozáknak, hogy COST pályázat keretén belül egy rövid tanulmányút során (Prága, Csehország) hozzáférést biztosított egy STED szuperfeloldású mikroszkóphoz.

A disszertációhoz kapcsolódó kutatások a GINOP-2.3.2-15-2016-00044, GINOP-2.3.3-15-2016-00020, OTKA (K128770, K72762, NK101337, K128770), COST EuroCellNet CA15214, TÁMOP 4.2.2-08/1-2008-0015, TÁMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007, TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0023, TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 ösztöndíjak támogatásával készültek.

Köszönöm családomnak, hogy kiegyensúlyozott háttérrel biztosítottak számomra.

10. Irodalomjegyzék

1. Bachur, N.R., *Anthracyclines*, in *Encyclopedia of Cancer (Second Edition)*, J.R. Bertino, Editor. 2002, Academic Press: New York. p. 57-61.
2. Marinello, J., M. Delcuratolo, and G. Capranico, *Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: From Early Studies to New Perspectives*. 2018. **19**(11).
3. Arcamone, F., et al., *New developments in antitumor anthracyclines*. *Pharmacol Ther*, 1997. **76**(1-3): p. 117-24.
4. McGowan, J.V., et al., *Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2017. **31**(1): p. 63-75.
5. Green, A.E. and P.G. Rose, *Pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer*. *Int J Nanomedicine*, 2006. **1**(3): p. 229-39.
6. Yang, H.M. and R.A. Reisfeld, *Doxorubicin conjugated with a monoclonal antibody directed to a human melanoma-associated proteoglycan suppresses the growth of established tumor xenografts in nude mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(4): p. 1189-93.
7. Johansson, S., et al., *Elimination of HIV-1 infection by treatment with a doxorubicin-conjugated anti-envelope antibody*. *AIDS*, 2006. **20**(15): p. 1911-1915.
8. Gamo, F.-J., et al., *Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification*. *Nature*, 2010. **465**(7296): p. 305-310.
9. Simůnek, T., et al., *Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron*. *Pharmacol Rep*, 2009. **61**(1): p. 154-71.
10. Cagel, M., et al., *Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside*. *Drug Discov Today*, 2017. **22**(2): p. 270-281.
11. Smith, R.E., et al., *Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after doxorubicin-cyclophosphamide adjuvant therapy for operable breast cancer: the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Experience*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(7): p. 1195-204.
12. Kalender, Y., M. Yel, and S. Kalender, *Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats. The effects of vitamin E and catechin*. *Toxicology*, 2005. **209**(1): p. 39-45.
13. Jordan, K., et al., *Anthracycline extravasation injuries: management with dexrazoxane*. *Ther Clin Risk Manag*, 2009. **5**(2): p. 361-6.
14. Chatterjee, K., et al., *Doxorubicin cardiomyopathy*. *Cardiology*, 2010. **115**(2): p. 155-62.
15. Ewer, M.S. and S.M. Ewer, *Cardiotoxicity of anticancer treatments*. *Nat Rev Cardiol*, 2015. **12**(9): p. 547-58.
16. Murabito, A., E. Hirsch, and A. Ghigo, *Mechanisms of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Is Mitochondrial Dysfunction the Answer?* *Front Cardiovasc Med*, 2020. **7**: p. 35.
17. Takemura, G. and H. Fujiwara, *Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management*. *Prog Cardiovasc Dis*, 2007. **49**(5): p. 330-52.
18. Billingham, M.E., et al., *Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes*. *Cancer Treat Rep*, 1978. **62**(6): p. 865-72.
19. Buja, L.M., et al., *Cardiac ultrastructural changes induced by daunorubicin therapy*. *Cancer*, 1973. **32**(4): p. 771-88.
20. Deng, S., et al., *The catalytic topoisomerase II inhibitor dexrazoxane induces DNA breaks, ATF3 and the DNA damage response in cancer cells*. *Br J Pharmacol*, 2015. **172**(9): p. 2246-57.
21. Perez, E.A., *Impact, mechanisms, and novel chemotherapy strategies for overcoming resistance to anthracyclines and taxanes in metastatic breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2009. **114**(2): p. 195-201.

22. Arnason, T. and T. Harkness, *Development, Maintenance, and Reversal of Multiple Drug Resistance: At the Crossroads of TFPI1, ABC Transporters, and HIF1*. *Cancers* (Basel), 2015. **7**(4): p. 2063-82.
23. Richmond, T.J. and C.A. Davey, *The structure of DNA in the nucleosome core*. *Nature*, 2003. **423**(6936): p. 145-50.
24. White, J.H. and W.R. Bauer, *Calculation of the twist and the writhe for representative models of DNA*. *J Mol Biol*, 1986. **189**(2): p. 329-41.
25. Tobias, I., *The twist, writhe, and linking number distributions in closed circular DNA*. *J Biomol Struct Dyn*, 1985. **3**(2): p. 315-25.
26. Bowater, R., *Supercoiled DNA: Structure*. 2001.
27. Kornberg, R.D. and Y. Lorch, *Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome*. *Cell*, 1999. **98**(3): p. 285-94.
28. Gartenberg, M.R. and J.C. Wang, *Positive supercoiling of DNA greatly diminishes mRNA synthesis in yeast*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(23): p. 11461-5.
29. Joshi, R.S., B. Piña, and J. Roca, *Topoisomerase II is required for the production of long Pol II gene transcripts in yeast*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(16): p. 7907-15.
30. Ma, J. and M.D. Wang, *DNA supercoiling during transcription*. *Biophys Rev*, 2016. **8**(Suppl 1): p. 75-87.
31. Liu, L.F. and J.C. Wang, *Supercoiling of the DNA template during transcription*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(20): p. 7024-7.
32. Wu, H.Y., et al., *Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template*. *Cell*, 1988. **53**(3): p. 433-40.
33. Champoux, J.J., *DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism*. *Annu Rev Biochem*, 2001. **70**: p. 369-413.
34. Drew, H.R., J.R. Weeks, and A.A. Travers, *Negative supercoiling induces spontaneous unwinding of a bacterial promoter*. *Embo j*, 1985. **4**(4): p. 1025-32.
35. Wong, B.C., S.K. Chiu, and S.A. Chow, *The role of negative superhelicity and length of homology in the formation of paranemic joints promoted by RecA protein*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(20): p. 12120-7.
36. Naughton, C., et al., *Transcription forms and remodels supercoiling domains unfolding large-scale chromatin structures*. *Nat Struct Mol Biol*, 2013. **20**(3): p. 387-95.
37. Ljungman, M. and P.C. Hanawalt, *Presence of negative torsional tension in the promoter region of the transcriptionally poised dihydrofolate reductase gene in vivo*. *Nucleic Acids Res*, 1995. **23**(10): p. 1782-9.
38. Mizutani, M., et al., *Negative supercoiling of DNA facilitates an interaction between transcription factor IID and the fibroin gene promoter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(3): p. 718-22.
39. Parvin, J.D. and P.A. Sharp, *DNA topology and a minimal set of basal factors for transcription by RNA polymerase II*. *Cell*, 1993. **73**(3): p. 533-40.
40. Tabuchi, H. and S. Hirose, *DNA supercoiling facilitates formation of the transcription initiation complex on the fibroin gene promoter*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(30): p. 15282-7.
41. Corless, S. and N. Gilbert, *Investigating DNA supercoiling in eukaryotic genomes*. *Brief Funct Genomics*, 2017. **16**(6): p. 379-389.
42. Pommier, Y., et al., *Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016. **17**(11): p. 703-721.
43. Delgado, J.L., et al., *Topoisomerases as anticancer targets*. *Biochem J*, 2018. **475**(2): p. 373-398.
44. Stuchinskaya, T., et al., *How do type II topoisomerases use ATP hydrolysis to simplify DNA topology beyond equilibrium? Investigating the relaxation reaction of nonsupercoiling type II topoisomerases*. *J Mol Biol*, 2009. **385**(5): p. 1397-408.

45. Laponogov, I., et al., *Trapping of the transport-segment DNA by the ATPase domains of a type II topoisomerase*. 2018. **9**(1): p. 2579.
46. Baranello, L., et al., *DNA break mapping reveals topoisomerase II activity genome-wide*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(7): p. 13111-22.
47. Yan, H., M. Tammaro, and S. Liao, *Collision of Trapped Topoisomerase 2 with Transcription and Replication: Generation and Repair of DNA Double-Strand Breaks with 5' Adducts*. Genes (Basel), 2016. **7**(7).
48. Yu, X., et al., *Genome-wide TOP2A DNA cleavage is biased toward translocated and highly transcribed loci*. Genome Res, 2017. **27**(7): p. 1238-1249.
49. Vos, S.M., et al., *All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(12): p. 827-41.
50. Kaur, P., *DNA Topoisomerase II: Promising Target for Anticancer Drugs*. 2014. p. 323-338.
51. Bromberg, K.D., A.B. Burgin, and N. Osheroff, *A two-drug model for etoposide action against human topoisomerase IIalpha*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 7406-12.
52. Lodish H, B.A., Zipursky SL, et al. , *The Role of Topoisomerases in DNA Replication*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21703/>. Molecular Cell Biology. 4th edition. Section 12.3, .
53. McClendon, A.K., A.C. Rodriguez, and N. Osheroff, *Human topoisomerase IIalpha rapidly relaxes positively supercoiled DNA: implications for enzyme action ahead of replication forks*. J Biol Chem, 2005. **280**(47): p. 39337-45.
54. Roca, J., *Varying levels of positive and negative supercoiling differently affect the efficiency with which topoisomerase II catenates and decatenates DNA*. J Mol Biol, 2001. **305**(3): p. 441-50.
55. Zhang, S., et al., *Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity*. Nat Med, 2012. **18**(11): p. 1639-42.
56. Vavrova, A., et al., *Catalytic inhibitors of topoisomerase II differently modulate the toxicity of anthracyclines in cardiac and cancer cells*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76676.
57. Capranico, G., et al., *Different patterns of gene expression of topoisomerase II isoforms in differentiated tissues during murine development*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1132**(1): p. 43-8.
58. Herman, E.H., et al., *Comparison of the structural changes induced by doxorubicin and mitoxantrone in the heart, kidney and intestine and characterization of the Fe(III)-mitoxantrone complex*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(9): p. 2415-30.
59. Angsutararux, P., S. Luanpitpong, and S. Issaragrisil, *Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity: Overview of the Roles of Oxidative Stress*. Oxid Med Cell Longev, 2015. **2015**: p. 795602.
60. Kranias, E.G. and D.M. Bers, *Calcium and cardiomyopathies*. Subcell Biochem, 2007. **45**: p. 523-37.
61. Kawase, M., et al., *Increase of ceramide in adriamycin-induced HL-60 cell apoptosis: detection by a novel anti-ceramide antibody*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1584**(2-3): p. 104-14.
62. Lucci, A., et al., *Multidrug resistance modulators and doxorubicin synergize to elevate ceramide levels and elicit apoptosis in drug-resistant cancer cells*. Cancer, 1999. **86**(2): p. 300-11.
63. Delpy, E., et al., *Doxorubicin induces slow ceramide accumulation and late apoptosis in cultured adult rat ventricular myocytes*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(2): p. 398-407.
64. Chen, Q., et al., *Epigenetic silencing of antiviral genes renders clones of Huh-7 cells permissive for hepatitis C virus replication*. J Virol, 2013. **87**(1): p. 659-65.
65. Uchida, Y., et al., *Ceramide reduction and transcriptional up-regulation of glucosylceramide synthase through doxorubicin-activated Sp1 in drug-resistant HL-60/ADR cells*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6271-9.
66. Denard, B., C. Lee, and J. Ye, *Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1*. Elife, 2012. **1**: p. e00090.

67. Kawaguchi, T., et al., *Prior starvation mitigates acute doxorubicin cardiotoxicity through restoration of autophagy in affected cardiomyocytes*. Cardiovasc Res, 2012. **96**(3): p. 456-65.
68. Li, D.L., et al., *Doxorubicin Blocks Cardiomyocyte Autophagic Flux by Inhibiting Lysosome Acidification*. Circulation, 2016. **133**(17): p. 1668-87.
69. Johnson, R. and S. Shabalala, *Aspalathin Reverts Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity through Increased Autophagy and Decreased Expression of p53/mTOR/p62 Signaling*. 2017. **22**(10).
70. Chrustek, A., et al., *The influence of doxorubicin on nuclear and cytoplasmic pool of F-actin in the A549 cell line*. Medical and Biological Sciences, 2014. **28**: p. 11-18.
71. Tacar, O., P. Sriamornsak, and C.R. Dass, *Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems*. J Pharm Pharmacol, 2013. **65**(2): p. 157-70.
72. Lal, S., et al., *Pharmacogenetics of target genes across doxorubicin disposition pathway: a review*. Curr Drug Metab, 2010. **11**(1): p. 115-28.
73. Gigli, M., et al., *Correlation between growth inhibition and intranuclear doxorubicin and 4'-deoxy-4'-iododoxorubicin quantitated in living K562 cells by microspectrofluorometry*. Cancer Res, 1989. **49**(3): p. 560-4.
74. Frederick, C.A., et al., *Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin*. Biochemistry, 1990. **29**(10): p. 2538-49.
75. Bosire, R., et al., *Intercalation of small molecules into DNA in chromatin is primarily controlled by superhelical constraint*. 2019. **14**(11): p. e0224936.
76. Rabbani, A., R.M. Finn, and J. Ausió, *The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure*. Bioessays, 2005. **27**(1): p. 50-6.
77. Krajewski, W.A. and J. Ausió, *Modulation of the higher-order folding of chromatin by deletion of histone H3 and H4 terminal domains*. Biochem J, 1996. **316 (Pt 2)**(Pt 2): p. 395-400.
78. Jollès, B., et al., *Comparison of DNA sequence selectivity of anthracycline antibiotics and their 3'-hydroxylated analogs*. Chem Biol Interact, 1996. **100**(2): p. 165-76.
79. Wang, A.H., et al., *Interactions between an anthracycline antibiotic and DNA: molecular structure of daunomycin complexed to d(CpGpTpApCpG) at 1.2-Å resolution*. Biochemistry, 1987. **26**(4): p. 1152-63.
80. Comings, D.E. and M.E. Drets, *Mechanisms of chromosome banding. IX. Are variations in DNA base composition adequate to account for quinacrine, Hoechst 33258 and daunomycin banding?* Chromosoma, 1976. **56**(3): p. 199-211.
81. Quigley, G.J., et al., *Molecular structure of an anticancer drug-DNA complex: daunomycin plus d(CpGpTpApCpG)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(12): p. 7204-8.
82. Gewirtz, D.A., *A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin*. Biochem Pharmacol, 1999. **57**(7): p. 727-41.
83. Cutts, S.M., et al., *Adriamycin-induced DNA adducts inhibit the DNA interactions of transcription factors and RNA polymerase*. J Biol Chem, 1996. **271**(10): p. 5422-9.
84. Cutts, S.M., et al., *The power and potential of doxorubicin-DNA adducts*. IUBMB Life, 2005. **57**(2): p. 73-81.
85. Studzian, K., et al., *Inhibition of RNA synthesis in vitro and cell growth by anthracycline antibiotics*. Neoplasma, 2001. **48**(5): p. 412-8.
86. Dano, K., S. Frederiksen, and P. Hellung-Larsen, *Inhibition of DNA and RNA synthesis by daunorubicin in sensitive and resistant Ehrlich ascites tumor cells in vitro*. Cancer Res, 1972. **32**(6): p. 1307-14.
87. Kim, S.H. and J.H. Kim, *Lethal effect of adriamycin on the division cycle of HeLa cells*. Cancer Res, 1972. **32**(2): p. 323-5.

88. Meriwether, W.D. and N.R. Bachur, *Inhibition of DNA and RNA metabolism by daunorubicin and adriamycin in L1210 mouse leukemia*. *Cancer Res*, 1972. **32**(6): p. 1137-42.
89. Cutts, S.M., et al., *Potential Therapeutic Advantages of Doxorubicin when Activated by Formaldehyde to Function as a DNA Adduct-Forming Agent*. *Curr Top Med Chem*, 2015. **15**(14): p. 1409-22.
90. Goodman, M.F., M.J. Bessman, and N.R. Bachur, *Adriamycin and daunorubicin inhibition of mutant T4 DNA polymerases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1974. **71**(4): p. 1193-6.
91. Wang, J.J., D.S. Chervinsky, and J.M. Rosen, *Comparative biochemical studies of adriamycin and daunomycin in leukemic cells*. *Cancer Res*, 1972. **32**(3): p. 511-5.
92. Zunina, F., R. Gambetta, and A. Di Marco, *The inhibition in vitro of DNA polymerase and RNA polymerases by daunomycin and adriamycin*. *Biochem Pharmacol*, 1975. **24**(2): p. 309-11.
93. Tanaka, M., S. Yoshida, and K. Kimura, *Mechanism of inhibition of DNA polymerases by 4'-epiadriamycin and 4'-O-tetrahydropyranyladriamycin*. *Gan*, 1983. **74**(6): p. 829-36.
94. Momparler, R.L., et al., *Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells*. *Cancer Res*, 1976. **36**(8): p. 2891-5.
95. Lehmann, M., et al., *Activity of topoisomerase inhibitors daunorubicin, idarubicin, and aclarubicin in the Drosophila Somatic Mutation and Recombination Test*. *Environ Mol Mutagen*, 2004. **43**(4): p. 250-7.
96. Scaglioni, L., et al., *Nemorubicin and doxorubicin bind the G-quadruplex sequences of the human telomeres and of the c-MYC promoter element Pu22*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1860**(6): p. 1129-38.
97. Victor, J.M., E. Ben-Haïm, and A. Lesne, *Intercalation and buckling instability of DNA linker within locked chromatin fiber*. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 2002. **66**(6 Pt 1): p. 060901.
98. Yang, F., et al., *Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1845**(1): p. 84-9.
99. Taatjes, D.J., et al., *Redox pathway leading to the alkylation of DNA by the anthracycline, antitumor drugs adriamycin and daunomycin*. *J Med Chem*, 1997. **40**(8): p. 1276-86.
100. Kato, S., et al., *Formaldehyde in human cancer cells: detection by preconcentration-chemical ionization mass spectrometry*. *Anal Chem*, 2001. **73**(13): p. 2992-7.
101. Kato, S., et al., *Mass spectrometric measurement of formaldehyde generated in breast cancer cells upon treatment with anthracycline antitumor drugs*. *Chem Res Toxicol*, 2000. **13**(6): p. 509-16.
102. Swift, L.P., et al., *Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death*. *Cancer Res*, 2006. **66**(9): p. 4863-71.
103. Forrest, R.A., et al., *Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation*. *Biochem Pharmacol*, 2012. **83**(12): p. 1602-12.
104. Cutts, S.M., et al., *Molecular basis for the synergistic interaction of adriamycin with the formaldehyde-releasing prodrug pivaloyloxymethyl butyrate (AN-9)*. *Cancer Res*, 2001. **61**(22): p. 8194-202.
105. Cutts, S.M., et al., *Formaldehyde-releasing prodrugs in combination with adriamycin can overcome cellular drug resistance*. *Oncol Res*, 2005. **15**(4): p. 199-213.
106. Rabbani, A., et al., *Binding of antitumor antibiotic daunomycin to histones in chromatin and in solution*. *Biochemistry*, 2004. **43**(51): p. 16497-504.
107. Firouzi Niaki, E., et al., *Interactions of Cisplatin and Daunorubicin at the Chromatin Level*. 2020. **10**(1): p. 1107.
108. Zargar, S.J. and A. Rabbani, *Interaction of daunomycin antibiotic with histone H(1): ultraviolet spectroscopy and equilibrium dialysis studies*. *Int J Biol Macromol*, 2002. **30**(2): p. 113-7.

109. Zargar, S.J. and A. Rabbani, *The effects of daunomycin antibiotic on histone H(1): thermal denaturation and fluorescence spectroscopy studies*. Int J Biol Macromol, 2000. **28**(1): p. 75-9.
110. Sprigg, L., et al., *Interaction of daunomycin with acetylated chromatin*. J Med Chem, 2010. **53**(17): p. 6457-65.
111. Rabbani, A., S. Abdosamadi, and N. Sari-Saraf, *Affinity of anticancer drug, daunomycin, to core histones in solution: comparison of free and cross-linked proteins*. Acta Pharmacol Sin, 2007. **28**(5): p. 731-7.
112. Fritzsche, H., et al., *Anthracycline antibiotics. Interaction with DNA and nucleosomes and inhibition of DNA synthesis*. Biochemistry, 1987. **26**(7): p. 1996-2000.
113. Chaires, J.B., N. Dattagupta, and D.M. Crothers, *Binding of daunomycin to calf thymus nucleosomes*. Biochemistry, 1983. **22**(2): p. 284-92.
114. Rabbani, A.S.B., Khodabandeh, M., *INTERACTION OF DOXORUBICIN WITH DNA-HMG1 COMPLEX*. Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran, 1995. **6**(3): p. 147-152.
115. Kikuchi, H. and S. Sato, *Binding of daunomycin to nonhistone proteins from rat liver*. Biochim Biophys Acta, 1976. **434**(2): p. 509-12.
116. Gniadzowski, M., et al., *Transcription factors as targets for DNA-interacting drugs*. Curr Med Chem, 2003. **10**(11): p. 909-24.
117. Salerno, D., et al., *Magnetic tweezers measurements of the nanomechanical properties of DNA in the presence of drugs*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(20): p. 7089-99.
118. Almqwashi, A.A., et al., *Mechanisms of small molecule-DNA interactions probed by single-molecule force spectroscopy*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(9): p. 3971-88.
119. Chaires, J.B., N. Dattagupta, and D.M. Crothers, *Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic acid: equilibrium binding studies on interaction of daunomycin with deoxyribonucleic acid*. Biochemistry, 1982. **21**(17): p. 3933-40.
120. Bancaud, A., et al., *Structural plasticity of single chromatin fibers revealed by torsional manipulation*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(5): p. 444-50.
121. Bancaud, A., et al., *Nucleosome chiral transition under positive torsional stress in single chromatin fibers*. Mol Cell, 2007. **27**(1): p. 135-47.
122. Pang, B., et al., *Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1908.
123. Teves, S.S. and S. Henikoff, *Transcription-generated torsional stress destabilizes nucleosomes*. Nat Struct Mol Biol, 2014. **21**(1): p. 88-94.
124. Imre, L., et al., *Nucleosome stability measured in situ by automated quantitative imaging*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 12734.
125. Gupta, P., J. Zlatanova, and M. Tomschik, *Nucleosome assembly depends on the torsion in the DNA molecule: a magnetic tweezers study*. Biophys J, 2009. **97**(12): p. 3150-7.
126. Hizume, K., S.H. Yoshimura, and K. Takeyasu, *Atomic force microscopy demonstrates a critical role of DNA superhelicity in nucleosome dynamics*. Cell Biochem Biophys, 2004. **40**(3): p. 249-61.
127. Clark, D.J. and G. Felsenfeld, *Formation of nucleosomes on positively supercoiled DNA*. Embo j, 1991. **10**(2): p. 387-95.
128. Wójcik, K., et al., *Daunomycin, an antitumor DNA intercalator, influences histone-DNA interactions*. Cancer Biol Ther, 2013. **14**(9): p. 823-32.
129. Teves, S.S., R.B. Deal, and S. Henikoff, *Measuring genome-wide nucleosome turnover using CATCH-IT*. Methods Enzymol, 2012. **513**: p. 169-84.
130. Deal, R.B., J.G. Henikoff, and S. Henikoff, *Genome-wide kinetics of nucleosome turnover determined by metabolic labeling of histones*. Science, 2010. **328**(5982): p. 1161-4.

131. Sørensen, B.S., et al., *Mode of action of topoisomerase II-targeting agents at a specific DNA sequence. Uncoupling the DNA binding, cleavage and religation events.* J Mol Biol, 1992. **228**(3): p. 778-86.
132. Yang, F., C.J. Kemp, and S. Henikoff, *Doxorubicin enhances nucleosome turnover around promoters.* Curr Biol, 2013. **23**(9): p. 782-7.
133. Yang, F., C.J. Kemp, and S. Henikoff, *Anthracyclines induce double-strand DNA breaks at active gene promoters.* Mutat Res, 2015. **773**: p. 9-15.
134. Hossain, M.Z., et al., *DNA-intercalators causing rapid re-expression of methylated and silenced genes in cancer cells.* Oncotarget, 2013. **4**(2): p. 298-309.
135. Seoane, J.A. and J.G. Kirkland, *Chromatin regulators mediate anthracycline sensitivity in breast cancer.* Nature Medicine, 2019. **25**(11): p. 1721-1727.
136. Ljungman, M. and P.C. Hanawalt, *Localized torsional tension in the DNA of human cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 6055-9.
137. Kouzine, F., et al., *Transcription-dependent dynamic supercoiling is a short-range genomic force.* Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(3): p. 396-403.
138. Widmer, R.M., T. Koller, and J.M. Sogo, *Analysis of the psoralen-crosslinking pattern in chromatin DNA by exonuclease digestion.* Nucleic Acids Res, 1988. **16**(14b): p. 7013-24.
139. Corless, S., C. Naughton, and N. Gilbert, *Profiling DNA supercoiling domains in vivo.* Genom Data, 2014. **2**: p. 264-7.
140. Nitiss, J.L., *Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy.* Nat Rev Cancer, 2009. **9**(5): p. 338-50.
141. Ju, B.G., et al., *A topoisomerase II β -mediated dsDNA break required for regulated transcription.* Science, 2006. **312**(5781): p. 1798-802.
142. Canela, A., et al., *Topoisomerase II-Induced Chromosome Breakage and Translocation Is Determined by Chromosome Architecture and Transcriptional Activity.* Mol Cell, 2019. **75**(2): p. 252-266.e8.
143. Schwarzer, W., et al., *Two independent modes of chromatin organization revealed by cohesin removal.* Nature, 2017. **551**(7678): p. 51-56.
144. Guillou, E., et al., *Cohesin organizes chromatin loops at DNA replication factories.* Genes Dev, 2010. **24**(24): p. 2812-22.
145. Li, Y., et al., *The structural basis for cohesin-CTCF-anchored loops.* Nature, 2020. **578**(7795): p. 472-476.
146. Joshi, R.S. and C. Nikolaou, *Structure and Chromosomal Organization of Yeast Genes Regulated by Topoisomerase II.* 2018. **19**(1).
147. Madabhushi, R., et al., *Activity-Induced DNA Breaks Govern the Expression of Neuronal Early-Response Genes.* Cell, 2015. **161**(7): p. 1592-605.
148. Lis, J.T. and W.L. Kraus, *Promoter cleavage: a topolI β and PARP-1 collaboration.* Cell, 2006. **125**(7): p. 1225-7.
149. Trotter, K.W., H.A. King, and T.K. Archer, *Glucocorticoid Receptor Transcriptional Activation via the BRG1-Dependent Recruitment of TOP2 β and Ku70/86.* Mol Cell Biol, 2015. **35**(16): p. 2799-817.
150. Puc, J., A.K. Aggarwal, and M.G. Rosenfeld, *Physiological functions of programmed DNA breaks in signal-induced transcription.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(8): p. 471-476.
151. Wong, R.H., et al., *A role of DNA-PK for the metabolic gene regulation in response to insulin.* Cell, 2009. **136**(6): p. 1056-72.
152. Erener, S., et al., *Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP1) controls adipogenic gene expression and adipocyte function.* Mol Endocrinol, 2012. **26**(1): p. 79-86.

153. Haffner, M.C., et al., *Transcription-induced DNA double strand breaks: both oncogenic force and potential therapeutic target?* Clin Cancer Res, 2011. **17**(12): p. 3858-64.
154. Moses, R.E. and B.W. O'Malley, *DNA transcription and repair: a confluence.* J Biol Chem, 2012. **287**(28): p. 23266-70.
155. Fong, Y.W., C. Cattoglio, and R. Tjian, *The intertwined roles of transcription and repair proteins.* Mol Cell, 2013. **52**(3): p. 291-302.
156. Bunch, H., et al., *Transcriptional elongation requires DNA break-induced signalling.* 2015. **6**: p. 10191.
157. Pedersen, J.M., et al., *DNA Topoisomerases maintain promoters in a state competent for transcriptional activation in Saccharomyces cerevisiae.* PLoS Genet, 2012. **8**(12): p. e1003128.
158. Le May, N., et al., *XPG and XPF endonucleases trigger chromatin looping and DNA demethylation for accurate expression of activated genes.* Mol Cell, 2012. **47**(4): p. 622-32.
159. Ray, S., et al., *Topoisomerase II α promotes activation of RNA polymerase I transcription by facilitating pre-initiation complex formation.* Nat Commun, 2013. **4**: p. 1598.
160. Gittens, W.H., D.J. Johnson, and R.M. Allison, *A nucleotide resolution map of Top2-linked DNA breaks in the yeast and human genome.* 2019. **10**(1): p. 4846.
161. Hegedüs, É., et al., *Endogenous single-strand DNA breaks at RNA polymerase II promoters in Saccharomyces cerevisiae.* Nucleic Acids Res, 2018. **46**(20): p. 10649-10668.
162. Gál, I., et al., *Protease-elicited TUNEL positivity of non-apoptotic fixed cells.* J Histochem Cytochem, 2000. **48**(7): p. 963-70.
163. Wojcik, K. and J.W. Dobrucki, *Interaction of a DNA intercalator DRAQ5, and a minor groove binder SYTO17, with chromatin in live cells--influence on chromatin organization and histone-DNA interactions.* Cytometry A, 2008. **73**(6): p. 555-62.
164. Rabbani, A., M. Iskandar, and J. Ausió, *Daunomycin-induced unfolding and aggregation of chromatin.* J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18401-6.
165. Ramakrishnan, V., *Histone H1 and chromatin higher-order structure.* Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1997. **7**(3): p. 215-30.
166. Ausió, J., *Analytical ultracentrifugation and the characterization of chromatin structure.* Biophys Chem, 2000. **86**(2-3): p. 141-53.
167. Mir, M.A., S. Das, and D. Dasgupta, *N-terminal tail domains of core histones in nucleosome block the access of anticancer drugs, mithramycin and daunomycin, to the nucleosomal DNA.* Biophys Chem, 2004. **109**(1): p. 121-35.
168. Nánási, P., Jr., et al., *Doxorubicin induces large-scale and differential H2A and H2B redistribution in live cells.* 2020. **15**(4): p. e0231223.
169. Görlich, D., et al., *A novel class of RanGTP binding proteins.* J Cell Biol, 1997. **138**(1): p. 65-80.
170. Pemberton, L.F., G. Blobel, and J.S. Rosenblum, *Transport routes through the nuclear pore complex.* Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(3): p. 392-9.
171. Sedorf, M. and P.A. Silver, *Importin/karyopherin protein family members required for mRNA export from the nucleus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(16): p. 8590-5.
172. Görlich, D. and U. Kutay, *Transport between the cell nucleus and the cytoplasm.* Annu Rev Cell Dev Biol, 1999. **15**: p. 607-60.
173. Rexach, M. and G. Blobel, *Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins.* Cell, 1995. **83**(5): p. 683-92.
174. Mosammamarast, N., et al., *Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins.* J Cell Biol, 2001. **153**(2): p. 251-62.
175. Nachury, M.V. and K. Weis, *The direction of transport through the nuclear pore can be inverted.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9622-7.

176. Nakielny, S. and G. Dreyfuss, *Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus*. Cell, 1999. **99**(7): p. 677-90.
177. Jäkel, S., et al., *The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1*. Embo j, 1999. **18**(9): p. 2411-23.
178. Moreland, R.B., et al., *Amino acid sequences that determine the nuclear localization of yeast histone 2B*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(11): p. 4048-57.
179. Marchetti, M.A., et al., *Import of proteins into the trypanosome nucleus and their distribution at karyokinesis*. J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 5)**: p. 899-906.
180. Johnson-Saliba, M., et al., *Distinct importin recognition properties of histones and chromatin assembly factors*. FEBS Lett, 2000. **467**(2-3): p. 169-74.
181. Langer, T., *Nuclear transport of histone 2b in mammalian cells is signal- and energy-dependent and different from the importin alpha/beta-mediated process*. Histochem Cell Biol, 2000. **113**(6): p. 455-65.
182. Padavannil, A., et al., *Importin-9 wraps around the H2A-H2B core to act as nuclear importer and histone chaperone*. Elife, 2019. **8:e43630**.
183. Pemberton, L.F. and B.M. Paschal, *Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export*. Traffic, 2005. **6**(3): p. 187-98.
184. Fornerod, M., et al., *CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals*. Cell, 1997. **90**(6): p. 1051-60.
185. Kudo, N., et al., *Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of mammalian CRM1, a protein involved in nuclear export of proteins*. J Biol Chem, 1997. **272**(47): p. 29742-51.
186. Köhler, A. and E. Hurt, *Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 761-73.
187. Lu, C., et al., *Nuclear Export as a Novel Therapeutic Target: The CRM1 Connection*. Curr Cancer Drug Targets, 2015. **15**(7): p. 575-92.
188. Moore, M.J. and M. Rosbash, *Cell biology. TAPping into mRNA export*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1841-2.
189. Bachi, A., et al., *The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates*. Rna, 2000. **6**(1): p. 136-58.
190. Schmitt, I. and L. Gerace, *In vitro analysis of nuclear transport mediated by the C-terminal shuttle domain of Tap*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42355-63.
191. Wiegand, H.L., et al., *Formation of Tap/NXT1 heterodimers activates Tap-dependent nuclear mRNA export by enhancing recruitment to nuclear pore complexes*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(1): p. 245-56.
192. Katahira, J., et al., *Complex formation between Tap and p15 affects binding to FG-repeat nucleoporins and nucleocytoplasmic shuttling*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9242-6.
193. Rebane, A., A. Aab, and J.A. Steitz, *Transportins 1 and 2 are redundant nuclear import factors for hnRNP A1 and HuR*. Rna, 2004. **10**(4): p. 590-9.
194. Mosammaparast, N., C.S. Ewart, and L.F. Pemberton, *A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B*. Embo j, 2002. **21**(23): p. 6527-38.
195. Ito, T., et al., *Drosophila NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(6): p. 3112-24.
196. Thomas, M., et al., *The cellular DExD/H-box RNA-helicases UAP56 and URH49 exhibit a CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling activity*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22671.
197. Ederle, H., et al., *Nuclear egress of TDP-43 and FUS occurs independently of Exportin-1/CRM1*. 2018. **8**(1): p. 7084.

198. Xia, Q., et al., *Folliculin, a tumor suppressor associated with Birt-Hogg-Dubé (BHD) syndrome, is a novel modifier of TDP-43 cytoplasmic translocation and aggregation*. Hum Mol Genet, 2016. **25**(1): p. 83-96.
199. Mahboubi, H., et al., *Identification of Novel Stress Granule Components That Are Involved in Nuclear Transport*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e68356.
200. Fujimura, K., et al., *Identification of importin alpha1 as a novel constituent of RNA stress granules*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(7): p. 865-71.
201. Pavia, K.E., S.A. Spinella, and D.E. Elmore, *Novel histone-derived antimicrobial peptides use different antimicrobial mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1818**(3): p. 869-76.
202. Waga, S., E.M. Tan, and R.L. Rubin, *Identification and isolation of soluble histones from bovine milk and serum*. Biochem J, 1987. **244**(3): p. 675-82.
203. Kim, H.S., et al., *Endotoxin-neutralizing antimicrobial proteins of the human placenta*. J Immunol, 2002. **168**(5): p. 2356-64.
204. Kim, H.S., et al., *Pepsin-mediated processing of the cytoplasmic histone H2A to strong antimicrobial peptide buforin I*. J Immunol, 2000. **165**(6): p. 3268-74.
205. Patrzykat, A., et al., *Synergy of histone-derived peptides of coho salmon with lysozyme and flounder pleurocidin*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(5): p. 1337-42.
206. Robinette, D., et al., *Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish *Ictalurus punctatus*: characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins*. Cell Mol Life Sci, 1998. **54**(5): p. 467-75.
207. Rose, F.R., et al., *Potential role of epithelial cell-derived histone H1 proteins in innate antimicrobial defense in the human gastrointestinal tract*. Infect Immun, 1998. **66**(7): p. 3255-63.
208. Hiemstra, P.S., et al., *Antimicrobial proteins of murine macrophages*. Infect Immun, 1993. **61**(7): p. 3038-46.
209. Frohm, M., et al., *Biochemical and antibacterial analysis of human wound and blister fluid*. Eur J Biochem, 1996. **237**(1): p. 86-92.
210. Watson, K., et al., *Extra-nuclear location of histones in activated human peripheral blood lymphocytes and cultured T-cells*. Biochem Pharmacol, 1995. **50**(3): p. 299-309.
211. Zlatanova, J.S., et al., *Cytoplasmic pool of histone H1 in mammalian cells*. J Cell Sci, 1990. **96 (Pt 3)**: p. 461-8.
212. Bleher, R. and R. Martin, *Nucleo-cytoplasmic translocation of histone H1 during the HeLa cell cycle*. Chromosoma, 1999. **108**(5): p. 308-16.
213. Szatmary, P., et al., *Biology, role and therapeutic potential of circulating histones in acute inflammatory disorders*. J Cell Mol Med, 2018. **22**(10): p. 4617-4629.
214. Monteonofrio, L. and D. Valente, *Extrachromosomal Histone H2B Contributes to the Formation of the Abscission Site for Cell Division*. 2019. **8**(11).
215. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
216. Papayannopoulos, V., et al., *Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2010. **191**(3): p. 677-91.
217. Fuchs, T.A., et al., *Extracellular DNA traps promote thrombosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(36): p. 15880-5.
218. Xu, J., et al., *Extracellular histones are major mediators of death in sepsis*. Nat Med, 2009. **15**(11): p. 1318-21.
219. Urbonaviciute, V., et al., *Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE*. J Exp Med, 2008. **205**(13): p. 3007-18.

220. Martin, M. and A.M. Blom, *Complement in removal of the dead - balancing inflammation*. Immunol Rev, 2016. **274**(1): p. 218-232.
221. Chen, R., et al., *Novel chemokine-like activities of histones in tumor metastasis*. Oncotarget, 2016. **7**(38): p. 61728-61740.
222. Westman, J., et al., *Extracellular Histones Induce Chemokine Production in Whole Blood Ex Vivo and Leukocyte Recruitment In Vivo*. PLoS Pathog, 2015. **11**(12): p. e1005319.
223. Kim, J.E., et al., *Histones Induce the Procoagulant Phenotype of Endothelial Cells through Tissue Factor Up-Regulation and Thrombomodulin Down-Regulation*. PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0156763.
224. Silk, E., et al., *The role of extracellular histone in organ injury*. Cell Death Dis, 2017. **8**(5): p. e2812.
225. Allam, R., et al., *Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(8): p. 1375-88.
226. Allam, R., et al., *Histones trigger sterile inflammation by activating the NLRP3 inflammasome*. Eur J Immunol, 2013. **43**(12): p. 3336-42.
227. Tagai, C., et al., *Antimicrobial properties of arginine- and lysine-rich histones and involvement of bacterial outer membrane protease T in their differential mode of actions*. Peptides, 2011. **32**(10): p. 2003-9.
228. Dráb, T., et al., *The antimicrobial action of histones in the reproductive tract of cow*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **443**(3): p. 987-90.
229. Bolton, S.J. and V.H. Perry, *Histone H1; a neuronal protein that binds bacterial lipopolysaccharide*. J Neurocytol, 1997. **26**(12): p. 823-31.
230. Pereira, L.F., et al., *Histones interact with anionic phospholipids with high avidity; its relevance for the binding of histone-antihistone immune complexes*. Clin Exp Immunol, 1994. **97**(2): p. 175-80.
231. Semeraro, F., et al., *Histones induce phosphatidylserine exposure and a procoagulant phenotype in human red blood cells*. J Thromb Haemost, 2014. **12**(10): p. 1697-702.
232. Kalbitz, M., et al., *Role of extracellular histones in the cardiomyopathy of sepsis*. Faseb j, 2015. **29**(5): p. 2185-93.
233. Brill, A., et al., *Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(1): p. 136-44.
234. von Brühl, M.L., et al., *Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo*. J Exp Med, 2012. **209**(4): p. 819-35.
235. Kim, J.E., et al., *Circulating levels of DNA-histone complex and dsDNA are independent prognostic factors of disseminated intravascular coagulation*. Thromb Res, 2015. **135**(6): p. 1064-9.
236. Semeraro, F., et al., *Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4*. Blood, 2011. **118**(7): p. 1952-61.
237. Ammollo, C.T., et al., *Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation*. J Thromb Haemost, 2011. **9**(9): p. 1795-803.
238. Kheiri, S.A., T.M. Fasy, and H.H. Billett, *Effects of H1 histones and a monoclonal autoantibody to H1 histones on clot formation in vitro: possible implications in the antiphospholipid syndrome*. Thromb Res, 1996. **82**(1): p. 43-50.
239. Longstaff, C., et al., *Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones*. J Biol Chem, 2013. **288**(10): p. 6946-56.
240. Kobiyama, K., et al., *Role of Extrachromosomal Histone H2B on Recognition of DNA Viruses and Cell Damage*. Front Genet, 2013. **4**: p. 91.
241. Iqbal, J., et al., *Histone H2B-IFI16 Recognition of Nuclear Herpesviral Genome Induces Cytoplasmic Interferon- β Responses*. 2016. **12**(10): p. e1005967.

242. Kobiyama, K., et al., *Extrachromosomal histone H2B mediates innate antiviral immune responses induced by intracellular double-stranded DNA*. J Virol, 2010. **84**(2): p. 822-32.
243. Kawashima, A., et al., *Fragments of genomic DNA released by injured cells activate innate immunity and suppress endocrine function in the thyroid*. Endocrinology, 2011. **152**(4): p. 1702-12.
244. Hardin, J.A. and J.O. Thomas, *Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus: localization of prominent autoantigens on histones H1 and H2B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(24): p. 7410-4.
245. Rozijn, T.H. and G.J. Tonino, *STUDIES ON THE YEAST NUCLEUS. I. THE ISOLATION OF NUCLEI*. Biochim Biophys Acta, 1964. **91**: p. 105-12.
246. Sahoo, B., K.W. Drombosky, and R. Wetzel, *Fluorescence Correlation Spectroscopy: A Tool to Study Protein Oligomerization and Aggregation In Vitro and In Vivo*. Methods Mol Biol, 2016. **1345**: p. 67-87.
247. Ullrich, O. and T. Grune, *Proteasomal degradation of oxidatively damaged endogenous histones in K562 human leukemic cells*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(7): p. 887-93.
248. Yang, Y., et al., *Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics*. Cancer Res, 2007. **67**(19): p. 9472-81.
249. Kamiyama, D., et al., *Versatile protein tagging in cells with split fluorescent protein*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11046.
250. Matilainen, O., M.S.B. Sleiman, and P.M. Quiros, *The chromatin remodeling factor ISW-1 integrates organismal responses against nuclear and mitochondrial stress*. 2017. **8**(1): p. 1818.
251. Travers, J. and M. Rochman, *Chromatin regulates IL-33 release and extracellular cytokine activity*. 2018. **9**(1): p. 3244.
252. Kim, Y.H., et al., *Chromosome XII context is important for rDNA function in yeast*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(10): p. 2914-24.
253. Woolford, J.L., Jr. and S.J. Baserga, *Ribosome biogenesis in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2013. **195**(3): p. 643-81.
254. Székvölgyi, L., et al., *Ribonucleoprotein-masked nicks at 50-kbp intervals in the eukaryotic genomic DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(38): p. 14964-9.
255. Muthurajan, U., et al., *In Vitro Chromatin Assembly: Strategies and Quality Control*. Methods Enzymol, 2016. **573**: p. 3-41.
256. Lusser, A. and J.T. Kadonaga, *Strategies for the reconstitution of chromatin*. Nat Methods, 2004. **1**(1): p. 19-26.
257. Bartley, J.A. and R. Chalkley, *The binding of deoxyribonucleic acid and histone in native nucleohistone*. J Biol Chem, 1972. **247**(11): p. 3647-55.
258. Douglas Maya, M.M.-H., Lidia Delgado Ramos, Sebastián Chávez and Mari-Cruz Muñoz-Centeno, *A Histone Cycle*. The Mechanisms of DNA Replication, (February 20th 2013). .
259. Jiang, L., et al., *Global assessment of combinatorial post-translational modification of core histones in yeast using contemporary mass spectrometry. LYS4 trimethylation correlates with degree of acetylation on the same H3 tail*. J Biol Chem, 2007. **282**(38): p. 27923-34.
260. Foster, E.R. and J.A. Downs, *Methylation of H3 K4 and K79 is not strictly dependent on H2B K123 ubiquitylation*. J Cell Biol, 2009. **184**(5): p. 631-8.
261. Kudo, N., et al., *Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9112-7.
262. Cole, C.N. and J.J. Scarcelli, *Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(3): p. 299-306.
263. Müller-McNicoll, M., et al., *SR proteins are NXF1 adaptors that link alternative RNA processing to mRNA export*. Genes Dev, 2016. **30**(5): p. 553-66.

264. Zhang, H., K. Mahadevan, and A.F. Palazzo, *Sumoylation is Required for the Cytoplasmic Accumulation of a Subset of mRNAs*. Genes (Basel), 2014. **5**(4): p. 982-1000.
265. Ashikari, D., K. Takayama, and T. Tanaka, *Androgen induces G3BP2 and SUMO-mediated p53 nuclear export in prostate cancer*. 2017. **36**(45): p. 6272-6281.
266. Matsuo, S., et al., *PYR-41, A Ubiquitin-Activating Enzyme E1 Inhibitor, Attenuates Lung Injury in Sepsis*. Shock, 2018. **49**(4): p. 442-450.
267. da Silva, M.G., et al., *Cardiac systolic dysfunction in doxorubicin-challenged rats is associated with upregulation of MuRF2 and MuRF3 E3 ligases*. Exp Clin Cardiol, 2012. **17**(3): p. 101-9.
268. Fang, S., et al., *Down-regulation of UBC9 increases the sensitivity of hepatocellular carcinoma to doxorubicin*. Oncotarget, 2017. **8**(30): p. 49783-49795.
269. Huang, R.Y., et al., *Small ubiquitin-related modifier pathway is a major determinant of doxorubicin cytotoxicity in Saccharomyces cerevisiae*. Cancer Res, 2007. **67**(2): p. 765-72.
270. Braunstein, M., et al., *Downregulation of histone H2A and H2B pathways is associated with anthracycline sensitivity in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2016. **18**(1): p. 16.
271. Kelly, B. and L.A. O'Neill, *Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity*. Cell Res, 2015. **25**(7): p. 771-84.
272. Steinman, R.M. and H. Hemmi, *Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **311**: p. 17-58.
273. Hsu, L.W., et al., *The role of a nuclear protein, histone H1, on signalling pathways for the maturation of dendritic cells*. Clin Exp Immunol, 2008. **152**(3): p. 576-84.
274. Zhang, X., S. Linder, and M. Bazzaro, *Drug Development Targeting the Ubiquitin-Proteasome System (UPS) for the Treatment of Human Cancers*. Cancers (Basel), 2020. **12**(4).
275. Barpe, D.R., D.D. Rosa, and P.E. Froehlich, *Pharmacokinetic evaluation of doxorubicin plasma levels in normal and overweight patients with breast cancer and simulation of dose adjustment by different indexes of body mass*. Eur J Pharm Sci, 2010. **41**(3-4): p. 458-63.
276. Eksborg, S., *Pharmacokinetics of anthracyclines*. Acta Oncol, 1989. **28**(6): p. 873-6.
277. Greene, R.F., et al., *Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols*. Cancer Res, 1983. **43**(7): p. 3417-21.
278. Paul, C., et al., *Pharmacokinetics of daunorubicin and doxorubicin in plasma and leukemic cells from patients with acute nonlymphoblastic leukemia*. Ther Drug Monit, 1989. **11**(2): p. 140-8.
279. Neshler, E., et al., *Role of Chromatin Damage and Chromatin Trapping of FACT in Mediating the Anticancer Cytotoxicity of DNA-Binding Small-Molecule Drugs*. Cancer Res, 2018. **78**(6): p. 1431-1443.
280. Miles, J.S., et al., *THE ROLE OF PROTEIN CHAPERONES IN THE SURVIVAL FROM ANTHRACYCLINE-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. Int J Adv Res (Indore), 2018. **6**(3): p. 144-152.
281. Rodrigues, P.G., et al., *Early myocardial changes induced by doxorubicin in the nonfailing dilated ventricle*. 2019. **316**(3): p. H459-h475.
282. Klein, I.A. and A. Boija, *Partitioning of cancer therapeutics in nuclear condensates*. 2020. **368**(6497): p. 1386-1392.
283. Srivastava, R., R. Srivastava, and S.H. Ahn, *The Epigenetic Pathways to Ribosomal DNA Silencing*. Microbiol Mol Biol Rev, 2016. **80**(3): p. 545-63.
284. Santoro, R., *The silence of the ribosomal RNA genes*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(18): p. 2067-79.
285. Roedgaard, M., et al., *DNA Topoisomerases Are Required for Preinitiation Complex Assembly during GAL Gene Activation*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0132739.
286. Uthe, H., J.T. Vanselow, and A. Schlosser, *Proteomic Analysis of the Mediator Complex Interactome in Saccharomyces cerevisiae*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 43584.

287. Sperling, A.S., et al., *Topoisomerase II binds nucleosome-free DNA and acts redundantly with topoisomerase I to enhance recruitment of RNA Pol II in budding yeast*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(31): p. 12693-8.
288. Canela, A., et al., *Genome Organization Drives Chromosome Fragility*. Cell, 2017. **170**(3): p. 507-521.e18.
289. Sestili, P., *The fast-halo assay for the assessment of DNA damage at the single-cell level*. Methods Mol Biol, 2009. **521**: p. 517-33.
290. Kadioglu, E., et al., *Determination of DNA damage by alkaline halo and comet assay in patients under sevoflurane anesthesia*. Toxicol Ind Health, 2009. **25**(3): p. 205-12.
291. Afanasieva, K., et al., *DNA loop domain organization in nucleoids from cells of different types*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **483**(1): p. 142-146.
292. Afanasieva, K. and A. Sivolob, *Physical principles and new applications of comet assay*. Biophys Chem, 2018. **238**: p. 1-7.
293. Rao, S.S., et al., *A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping*. Cell, 2014. **159**(7): p. 1665-80.
294. Dixon, J.R., et al., *Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions*. Nature, 2012. **485**(7398): p. 376-80.
295. Nora, E.P., et al., *Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre*. Nature, 2012. **485**(7398): p. 381-5.
296. Mehta, G.D., et al., *Cohesin: functions beyond sister chromatid cohesion*. FEBS Lett, 2013. **587**(15): p. 2299-312.
297. de Wit, E., et al., *CTCF Binding Polarity Determines Chromatin Looping*. Mol Cell, 2015. **60**(4): p. 676-84.
298. Gothe, H.J., et al., *Spatial Chromosome Folding and Active Transcription Drive DNA Fragility and Formation of Oncogenic MLL Translocations*. Mol Cell, 2019. **75**(2): p. 267-283.e12.
299. Uusküla-Reimand, L., et al., *Topoisomerase II beta interacts with cohesin and CTCF at topological domain borders*. Genome Biol, 2016. **17**(1): p. 182.
300. Cox, J. and M. Mann, *MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(12): p. 1367-72.
301. Székvölgyi, L., et al., *Nick-forming sequences may be involved in the organization of eukaryotic chromatin into approximately 50 kbp loops*. Histochem Cell Biol, 2006. **125**(1-2): p. 63-73.
302. Seiler, J.A., et al., *The intra-S-phase checkpoint affects both DNA replication initiation and elongation: single-cell and -DNA fiber analyses*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(16): p. 5806-18.
303. Daniel, B., et al., *Mapping the genomic binding sites of the activated retinoid X receptor in murine bone marrow-derived macrophages using chromatin immunoprecipitation sequencing*. Methods Mol Biol, 2014. **1204**: p. 15-24.
304. Li, H. and R. Durbin, *Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform*. Bioinformatics, 2010. **26**(5): p. 589-95.
305. Shen, L., et al., *ngs.plot: Quick mining and visualization of next-generation sequencing data by integrating genomic databases*. BMC Genomics, 2014. **15**: p. 284.

11. Fűggelék