

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**R-hurok regulátorok azonosítása és vizsgálata nagy
áteresztőképességű genomikai szűrőmódszerekkel és
metaanalízissel**

Kissné Boros-Oláh Beáta

Témavezető: Dr. Székvölgyi Lóránt



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2024

R-hurok regulátorok azonosítása és vizsgálata nagy áteresztőképességű genomikai szűrőmódszerekkel és metaanalízissel

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Kissné Boros-Oláh Beáta okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Székvölgyi Lóránt, MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Balázs Margit, MTA doktora

Dr. Pankotai Tibor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csósz Éva, MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Balázs Margit, MTA doktora

Dr. Pankotai Tibor, PhD

Kormosné Dr. Goda Katalin, PhD

Dr. Burkovics Péter, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet A épület tanterme
2024. december 11. 13:00

1. Bevezetés

1.1. Bevezetés az R-hurkok biológiájába

Az R-hurok egy háromszálú nukleinsav struktúra, mely egy DNS-RNS hibridből (egy RNS molekula DNS-el való komplementer bázispárosodásával létrejött duplex) és egy kiszorított szimpla szálú DNS-ből áll. R-hurkok viszonylag gyakran előfordulnak a genomban (a genom lefedettsége: élesztőben 8%, *Arabidopsis thaliana*-ban 10%, emberben 5%) jelentős fiziológiai jelentőséggel bírva (Wahba et al., 2016; Xu et al., 2017; Sanz et al., 2016). Alapvetően pozitív funkciókat töltenek be, fontos biológiai folyamatokhoz szükségesek, viszont a túlzott felhalmozódásuk DNS-károsodáshoz és a genom instabilitásához vezethet. Számos humán betegséggel összefüggésbe hozták már az R-hurkok akkumulálódását, például szerepet játszhatnak különböző neurodegeneratív és daganatos betegségek kialakulásában is (1. ábra).

1.1.1. R-hurok felfedezése

Az R-hurok szerkezetet több, mint 45 évvel ezelőtt fedezték fel egy in vitro kísérlettel (Thomas et al., 1976). Egy élesztő DNS-ből és bakteriofág DNS-ből álló hibrid DNS-molekula 70%-os formamid jelenlétében R-hurkot alakított ki az élesztő 26S rRNS-el, amely RNS komplementer volt az élesztő DNS-el. A 70%-os formamidra azért volt szükség, mert a DNS-RNS hibrid szerkezet kialakulása a dupla szálú DNS olvadáspontja közelében nagyobb valószínűséggel végbemehet. Megállapították, hogy az R-hurok szerkezet nagyon stabil, csak az RNS szál degradációjával tudták az R-hurok szerkezetet megszüntetni. Emiatt ekkor még úgy gondolták, hogy az R-hurkok biológiailag nem relevánsak (Hegazy et al., 2020).

In vivo 20 évvel később sikerült kimutatni az R-hurkokat (Drolet et al., 1995). Az R-hurok in-vivo kialakulását módosított *Escherichia coli* törzsekkel mutatták ki, amelyekben vagy a topA (topoizomeráz I-et kódoló gén) volt deletálva, vagy a gyrB (DNS giráz B alegységét kódoló gén) hőmérséklet-érzékeny mutációt szenvedett. A kutatók azt találták, hogy a DNS-giráz B alegysége elősegíti az R-hurok kialakulását azáltal, hogy feloldja a pozitív szuperhelicitást a DNS-en belül, míg a topoizomeráz I gátolja az R-hurok kialakulását a negatív szuperhelicitás feloldásával. Az R-hurok DNS-RNS hibrid részében lévő RNS-t lebontó endoribonukleáz, az RNáz H túlzott expressziója feloldotta a topA mutáns növekedési rendellenességeit. Ezenkívül az RNáz H delécioja miatt kialakult növekedési hibákat kompenzálta a DNS-giráz B alegység aktivitásának csökkenése. Ezek a megfigyelések arra utaltak, hogy az R-hurok felhalmozódása okozta a növekedési hibákat. Ezt követően az R-hurok

nagyon sok kutató figyelmének a középpontjába került, népszerű kutatási területté vált a vizsgálata.

1.1.2. R-hurok képződése

Az R-hurokok általában aktív gének közelében képződnek, különösen hajlamosak a promóter régiókban kialakulni. Bár DNS-RNS hibrid folyamatosan képződik az RNS-polimeráz transzkripciós buborékán belül, nem valószínű, hogy az R-hurok egyszerűen ennek a néhány nukleotidnyi hibridnek a meghosszabbítása lenne, inkább az RNS 5'-végének visszahibridizációja révén jöhet létre. Ezt alátámasztja az RNS polimeráz komplex szerkezete, az RNS és a DNS szál különböző kimeneti csatornákon távozik a komplexből, ami megakadályozza, hogy a transzkripciós buborékban lévő R-hurok meghosszabbodjon (Westover et al., 2004). Ezt a fajta R-hurkot cisz R-huroknak nevezik.

A másik típus amikor transz módon képződik az R-hurok vagyis az RNS az átíródás helyétől távoli komplementer DNS szakaszhoz hibridizálódik. Például nem kódoló RNS-ek és a CRISPR/Cas9 proteinhez kapcsolódó guide RNS-ek képezhetnek ilyen R-hurokokat.

1.1.2.1. R-hurok jelenlétét elősegítő tényezők

Számos faktor ismert, melyek növelik az R-hurokok előfordulásának a valószínűségét. Ilyen például a guanin gazdag transzkript képződése a citozin gazdag templát DNS-ről, a képződő DNS-RNS hibrid fokozott stabilitása miatt. A DNS másodlagos szerkezete a kiszorított szimpla szálon, mint például a guanin kvadruplex vagy DNS-t kötő fehérjék szintén stabilizálhatják az R-hurok szerkezetet. A negatív szuperhelicitás szintén elősegítheti az R-hurok kialakulását. Az éppen átíródó géneknél a nem templát DNS szálaban, ha az RNS polimeráz tovább haladását követően egyszál törés (nick) alakul ki, szintén nagyobb eséllyel képződhet R-hurok. A nick jelenléte kevésbé teszi lehetővé a DNS két szálának az újbóli hibridizációját, így megnő annak a valószínűsége, hogy a templátszál az újonnan született RNS-hez fog hibridizálódni. Az R-hurok gátló fehérjék (pl. Ribonukleáz H és RNS-DNS helikázok) károsodása az R-hurok felhalmozódásához vezethet (Hegazy et al., 2020).

1.1.2.2. R-hurok jelenlétét gátló tényezők

Az R-hurokokat promótáló tényezők mellett számos faktor ismert, ami megakadályozza vagy megszünteti az R-hurok szerkezetet. Például az RNS molekulák RNS-t processzáló vagy exportáló fehérjékkel való bevonása megakadályozza a DNS-RNS hibrid létrejöttét (Li & Manley, 2005). A topoizomeráz I szintén gátolja az R-hurok kialakulást, azáltal, hogy feloldja

a negatív szuperhelicitást az RNS polimeráz II mögött. A kevésbé hozzáférhető heterokromatin az R-hurok kialakulásának szintén nem kedvez. A heterokromatikus jelek, mint például a hiszton H3 lizin 9 di- és trimetilációja (H3K9me_{2/3}) a DNS-RNS hibridek alacsony előfordulásával társul *C. elegans*-ban (Zeller et al., 2016). A DNS-RNS hibrid helikázok pl. szenataxin a két szál szétválasztásával, míg a Ribonukleáz H pedig a DNS-RNS hibrid RNS szálának emésztésével képes megszüntetni az R-hurkokat.

1.2. R-hurok fiziológiai szerepe

Az R hurkok számos fiziológiai folyamatban részt vesznek, ilyen például a mitokondriális DNS replikációja (B. Xu & Clayton, 1996; Pohjoismäki et al., 2010), az immunglobulin gének osztályváltó rekombinációja (Yu et al., 2003) vagy baktériumokban a CRISPR-Cas9 rendszer működése (Jinek et al., 2012).

Az R-hurkok szerepet játszanak a centromer működésében, a pontos kromoszóma szegregációban, ami kulcsfontosságú a stabil genom fenntartásához. A centromer lókuszek R-hurkokat (CEN R-hurkok) is tartalmaznak, amelyek evolúciósan konzerváltan sejtciklus-függő módon szabályozódnak. Emberi sejtekben a CEN R-hurkokban a kiszorított szimpla szálú DNS-t az RPA megköti, és a DNS-károsodásra válaszadó ATR kinázt toborozza, ami az Aurora B aktiválásához vezet, ami elősegíti a helyes mikrotubulus-kinetokor kapcsolódást (Niehrs & Luke, 2020).

R-hurkok képződnek a telomereken is, ahol a nem kódoló RNS, TERRA hibridizálódik a telomer DNS-hez. Az R-hurkok kialakulása a telomeráz enzimet nem tartalmazó sejtekben rekombinációs eseményekhez vezet, ami a telomerek megnyúlását és ezen keresztül a sejtek öregedésének késleltetését eredményezi (Santos-Pereira & Aguilera, 2015).

1.2.1. R-hurok szerepe a génexpresszióban és a kromatinszerkezet változásban

Az R-hurkok szerepet játszhatnak a génexpresszióban, erre bizonyítékkal szolgál, hogy az R-hurkok a gének promóterénél és terminációs régiójánál dúsulnak (Skourti-Stathaki & Proudfoot, 2014). A promótereknél elhelyezkedő R-hurkok a transzkripciós faktorok kötődésének gátlásával a transzkripció gátlásához vezethetnek. Ugyanakkor más transzkripciós faktorok kötődését elősegíthetik, represszorok kötődését gátolhatják, így a transzkripció aktiválásában is részt vehetnek. Az R hurkok guaninban gazdag terminátor elemeknél való dúsulása megkönnyíti az RNS-polimeráz II várakozását (pausing) a transzkripció hatékony befejezése előtt (García-Muse & Aguilera, 2019).

A DNS-RNS hibrideket a CpG-szigetek nem metilált állapotával is összefüggésbe hozzák, melyek számos gén promóterére jellemzőek emlős sejtekben. A CpG-szigeteken kialakult R-hurkok megvédik ezeket a régiókat a DNS-metilációval szemben, elkerülve a transzkripció gátlását. Ez a védelem azzal magyarázható, hogy a DNS-metiltransferáz 1 a duplaszálú DNS kötését és metilálását preferálja a DNS-RNS hibriddel szemben (Grunseich et al., 2018) illetve az R-hurkok vonzzák a DNS demetiláló TET enzimet (Arab et al., 2019).

A hosszú nem kódoló RNS-eken ill. a DNS-kötő fehérjéken keresztül kifejtett R-hurok szabályozásra jó példa az Arabidopsis thaliana modell növényben megfigyeltek. A COOLAIR antiszensz nem kódoló RNS negatívan szabályozza a FLOWERING LOCUS C (FLC) gén átíródását. Viszont a COOLAIR promóter régiójánál keletkező R-hurkot a NODULIN HOMEBOX (AtNDX) szimpla szálú DNS-t kötő fehérje stabilizálja, ez gátolja a COOLAIR átíródását és a gátláson keresztül aktiválja az FLC gén expresszióját (Sun et al., 2013, Csorba et al., 2014). Továbbá az R-hurkok kromatin dekondenzációt válthatnak ki, de elősegíthetik a heterokromatikus állapot létrejöttét, a kromatin tömörödését is (Skourti-Stathaki et al., 2014, Castellano-Pozo et al., 2013.).

1.2.2. Az R-hurok pozitív szerepe a DNS hibajavításban

A DNS-RNS hibridek elősegíthetik a DNS-javítást az aktívan átíródó genomi régiókban. Amikor egyszálú DNS-törések (nicks) vagy duplaszál törések (DSB) képződnek az aktív transzkripció közelében, több helyreállító útvonal konvergál, hogy biztosítsák, hogy a törés közvetlen közelében a transzkripció gátolt legyen. Ezek közé tartozik a Pol II eltávolítása, a transzkripció szüneteltetése; ami viszont az R-hurok stabilizációjához is vezethet. A lokális kromatin szerkezete represszív állapotra változik a károsodási helyek körül, hogy biztosítsa a transzkripció gátlását a törési helyek körül. Érdekes, hogy mind a PRC1, mind a PRC2, amelyek R-hurok-függő módon helyezkednek el néhány promóternél, a DNS töréseknél is jellemzőek, és a transzkripció elnémítását indukálják a Lys119 H2A hisztonon (H2AK119) történő ubiquitináció révén (Niehrs & Luke, 2020).

A DNS-RNS hibridek képződését a DSB helyen elősegítheti a homológ rekombináció (HR) általi javítás kezdeti 5'-végi ssDNS emésztés lépése, mivel ez szabad 3'-ssDNS túlnyúlást eredményez, amely könnyebben hibridizálódhat a születő RNS-sel. Ugyanakkor a DNS-RNS hibridek az 5'-végi ssDNS reszekció előtt is kialakulhatnak, kizorítva a nem templát szálát, így az 5'-ssDNS végének jelentős expozíciója elősegítheti annak nukleázok általi lebomlását. Mivel az 5'-végű DSB reszekció kulcsfontosságú lépés, amely a DSB-javítást a homológ

rekombináció felé tereli, a DSB-k DNS-RNS hibridjei elősegíthetik a homológ rekombinációt a nem homológ DNS végek összekapcsolása (NHEJ) általi javítással szemben. A DNS-RNS hibridizáció által okozott szerkezeti változások akadályozhatják a törött DNS-vég megfelelő felismerését az NHEJ-faktorok által (Aguilera & Gómez-González, 2017). A transzkripcióan aktív kromatin töréseit elsősorban a HR javítja, míg a transzkripcióan inaktív kromatinon belülieket az NHEJ (Aymard et al., 2014).

Az érintett fehérjék a javítás sajátosságától függően eltérőek lehetnek, de úgy tűnik, hogy az események sorrendje következetesen játszódik le: a DSB-nél az 5'-végű reszekciót követően a szabaddá vált 3' végen egy DNS-RNS hibrid képződik, amely olyan fehérjéken keresztül segíti a javítást, mint a RAD52, XPG1, BRCA1 és BRCA2. Az RNS-t ezt követően a senataxin, az RNáz H1, az RNáz H2 vagy a DDX1 eltávolítja, lehetővé téve a RAD51 DNS-hez való kötődését és a homológ rekombinációt. A DNS-RNS hibridek jelenléte a DSB-ken jól példázza egy átmeneti hibrid jelentőségét, amely fontos funkcióval bír, de később eltávolításra kerül a lehetséges problémák elkerülése érdekében (Niehrs & Luke, 2020).

1.3. R-hurok, mint genom instabilitást okozó struktúra

Az R-hurkok számos mechanizmus révén okozhatnak DNS-károsodást. Az R-hurkok exponált ssDNS szakaszokat eredményeznek, amelyek kémiailag instabilabbak, mint a dsDNS, és hajlamosabbak a transzkripció mutagenézisre (TAM), a rekombinációra (TAR) és a DSB-ekre. Az emlőssejtek által expresszált aktiváció által kiváltott citidin-deamináz (AID) és az Apolipoprotein B mRNS-szerkesztő katalitikus polipeptid (APOBEC) tagjai a ssDNS citozinjait uracillá képesek dezaminálni. Ezt követően az uracil DNS-glikoziláz kivágja az uracil bázist, abázikus helyet hozva létre, amelyek bázisszubsztitúciókhoz vagy ssDNS-bevágásokhoz vezethetnek, amiből a replikációs villa kialakulásakor DSB keletkezhet (Costantino & Koshland, 2015). Julie Solier és munkatársai kimutatták humán sejtekben, hogy a különböző RNS-feldolgozó faktorok, köztük az Aquarius (AQR) és a Senataxin (SETX) RNS/DNS-helikázok hiánya vagy a topoizomeráz I gátlása által indukált R-hurkok DNS-kettős szál törést okoznak az XPF és XPG nukleotidkivágó javítás (NER) endonukleázainak hasításán keresztül. Továbbá a DSB kialakulásához szükség van a transzkripcióhoz kapcsolt nukleotidkivágó javítás (TC-NER) faktorára, a Cockayne szindróma B csoportjára (CSB), azonban a globális genomjavító fehérjére, az XPC-re nem. Az RNS-polimeráz leállása lehetővé teszi a CSB számára az XPF és XPG endonukleázok toborzását. Az XPF és XPG szimplaszálú DNS rést hoz létre, amely DNS-replikáció révén DSB-vé alakítható, és/vagy az XPF és XPG mindkét szálon elhasítja az R-hurkot, DSB-t hozva létre. Ezek az eredmények azt mutatják,

hogy a TC-NER faktorok potenciálisan szerepet játszanak az R-hurok által kiváltott DNS-károsodásban és a genom instabilitásában (Sollier et al., 2014).

DSB-k keletkezhetnek az R-hurok és a replikációs gépezet közötti fizikai ütközés hatására is. Ezt bizonyítja az is, hogy a DNS-replikáció gátlásával megakadályozható az R-hurok által kiváltott DSB képződés. Az R-hurokok hatalmas fizikai akadályt jelenthetnek a replikációs villában viszonylag stabil másodlagos DNS szerkezetük, illetve a transzkripciós apparátus és más RNS-feldolgozó enzimek jelenléte miatt. Az R-hurokok közvetlenül okozhatják a villa összeomlását és a DSB képződését, még a nukleázok, például XPF és XPG beavatkozása nélkül is (Sollier & Cimprich, 2015).

1.4. R-hurok kapcsolata humán betegségekkel

Az R-hurokok számos humán betegségben szerepet játszanak, ideértve a daganatokat, a neurológiai rendellenességeket és az autoimmun betegségeket.

Az R-hurokok által közvetített genomi instabilitás hozzájárulhat a rákos sejtekre jellemző mutációkhoz és kromoszóma átrendeződésekhez (Negrini et al., 2010). A gyakori törékeny helyek (CFS - common fragile site) az emberi genom azon régiói, amelyek hosszú géneket tartalmaznak és az S-fázisban lassan replikálódnak, a DNS-törések forró pontjai (Glover, 2006). A CFS-ekben R-hurokok képződnek, az ebből fakadó DNS-replikációs villa és transzkripciós gépezet közötti ütközések hozzájárulnak a CFS lókuszek instabilitásához. Az R-hurokok eltávolítása RNaseH overexpresszióval csökkenti a CFS-hez kapcsolódó genomi instabilitást (Helmrich et al., 2011).

A tumorszupresszor BRCA2 depléciója R-hurok akkumulálódást és a DNS hibajavító ellenőrzőpont aktiválódását okozza. A BRCA2 részt vehet az RNS-DNS hibridek processzálasában/eltávolításában, máskülönben a replikációs stressz és a genomiális instabilitás forrása (Bhatia et al., 2014). A BRCA2 gyakran mutálódik és inaktiválódik daganatokban, különösen emlőrákban (Roy et al., 2012).

1.5. R-hurok vizsgáló módszerek

Számos technika áll már rendelkezésre az R-hurok struktúra azonosítására és jellemzésére. Egészen a közelmúltig a legtöbb tanulmány az S9.6 antitestet használta az R-hurok kimutatására és izolálására a DNS:RNS immunprecipitációnak (DRIP) nevezett módszerrel, immunfluoreszcens jelölésekkel vagy dot blot technikával.

Az S9.6 monoklonális antitestet 1986-ban egerekben állították elő Φ X174 bakteriofág eredetű szintetikus DNS-RNS hibrid antigénnel való immunizálással. Az antitestet magas DNS-RNS hibrid specificitással és affinitással jellemezték (Boguslawski et al., 1986). Az S9.6 scFv affinitását nem befolyásolják jelentősen a különböző pufferviszonyok vagy az 500 mM NaCl alatti ionerősség. Az általa erősen megkötött legkisebb epitóp hat bázispár DNS-RNS hibridet tartalmazó fragment. Az S9.6 körülbelül 0,6 nM disszociációs állandót mutat a DNS-RNS hibridre, és 2,7 nM az AU-ban gazdag duplaszálú RNS-re (Philips et al. 2013). A viszonylag erős duplaszálú RNS kötés kivédésére javasolt a nukleinsavon RNase emésztést végezni az immunprecipitálás vagy jelölés előtt, olyan kondícióban, melyben az R-hurkok nem sérülnek, viszont a szabad RNS-eket le tudjuk emészteni. Használhatunk ehhez Rnase T1, Rnase III vagy magas só mellett (300 mM NaCl) RNase A enzimet (Chédin et al. 2021, Halász et al., 2017). Mivel a dsRNS és az R-hurkok szerkezete jelentősen eltér, nem valószínű, hogy az antitest csak az R-hurok foszfát-cukor vázszerkezetét ismeri fel, amelyre a szekvencia független kötődéshez szükség lenne. Fabian König és munkatársai kimutatták, hogy az antitest affinitása szekvencia specifikus (König et al., 2017). Emiatt érdemes az S9.6-tól független módon is vizsgálni az R-hurkokat.

Az R-hurok leképezésének legszélesebb körben alkalmazott módszere a DRIPseq (Ginno et al., 2012), amely új generációs szekvenálást használ az S9.6 immunprecipitációval izolált R-hurkok térképezésére. A DRIP-seq-ben nukleinsavat izolálnak a sejtekből, majd restriktív enzimekkel vagy szonikálással fragmentálják azt. A genom restriktív enzimekkel történő feldarabolása torzítást okozhat és korlátozza a felbontást, különösen a gének 5' végén (Halász et al., 2017). Emiatt inkább a DNS ultrahangos kezelése javasolt a fragmentálásra, a restriktív enzimek használata helyett (El Hage et al., 2014; Halász et al., 2017). Az immunprecipitáció után a szekvenáló könyvtárakat szabványos dsDNS-alapú könyvtárkészítéssel hozzák létre. A szekvenálás validálását néhány kiválasztott genomi régió az IP mintán végzett QPCR-el végezhetjük el, mellyel nagyobb pontosságú kvantifikációt érhetünk el. A DRIP-seq konzisztens, reprodukálható és népszerű módszernek bizonyult az R-hurkok szekvenálásában. Számos továbbfejlesztése keletkezett a módszernek, melyekkel például szálspecifikussá tették a térképezést. Például ez megoldható szál-specifikus DNS-könyvtár-készítéssel, mint a ssDRIP-seq-ben (Xu et al., 2017). Továbbá az R-hurok RNS-szálának cDNS-szintézis utáni szekvenálásával (DRIPc-Seq) (Sanz et al., 2016). Az S1-DRIP-Seq-nek nevezett módszer pedig magában foglalja az S1-nukleáz felhasználását az R-hurok kiszorított ssDNS-ének lebontására, így az immunprecipitált DNS szekvenálása szintén

lehetővé teszi az R-hurok szálorientációjának azonosítását (Wahba et al., 2016). Végül a bis-DRIP-seq egyesíti az in situ ssDNS biszulfid kezelést az S9.6 immunprecipitálással, ezáltal javítja a hibridek és az ssDNS azonosításának specificitását. A biszulfid kezelés során a szimpla szálú DNS-en a nem metilált citozinok deaminálódnak, uracillá alakulnak (a PCR amplifikáció során pedig az uracil timinné konvertál), ez a szekvencia módosulás teszi lehetővé a szálspecificitást (Dumelie & Jaffrey, 2017).

Másik megközelítés a katalitikusan inaktív, tagelt RNáz H1 transzfekciója sejtekbe és ezen a módosított RNáz H1-en keresztüli immunprecipitáció, amely képes felismerni a DNS-RNS hibrideket, de nem tudja lebontani a hibrid RNS szálát. Ezt a módszert R-ChIP-nek nevezték el (Chen et al., 2017). Az R-ChIP kevesebb R-hurkot alkotó régiót azonosít, mint az S9.6-alapú DRIP-seq vagy DRIPc-seq. R-ChIP-el leginkább a promótereknél sikerül R-hurkokat azonosítani, a transzkripció terminátor régióknál nem. Az R-ChIP kisebb R-hurkot alkotó régiókat azonosít, mint a DRIPc-seq. A katalitikusan inaktív RNáz H1 enzim túlzott expressziója azzal a kockázattal jár, hogy in vivo megzavarja az R-hurkok dinamikáját. Az R-ChIP emlőssejteken történő megvalósításához ezért fontos, hogy a katalitikusan inaktív RNáz H1 megfelelő szinten expresszálódjon: túl magas expresszió esetén fennáll a domináns-negatív hatások kockázata; túl alacsony expresszió esetén, pedig fennáll annak a veszélye, hogy az endogén, katalitikusan aktív enzim megzavarhatja a katalitikusan inaktív mutáns kötődését és az R-ChIP hatékonyságát. Valószínűleg különböző típusú R-hurkok vannak, melyeket különböző típusú fehérjék ismernek fel. Ez lehet az oka annak, hogy az R-ChIP nem azonosította a terminátor régiókat R-hurok hotspotként az emberi sejtekben (Chen et al., 2017), ahol az R-hurkokat a DNS-RNS helikázok, például a Senataxin felismerik és szétválasztják, míg az RNáz H1 nem kötődik (Skourti-Stathaki et al. 2011). Ez megmagyarázhatja, hogy miért azonosított az R-ChIP kevesebb R-hurkot alkotó fragmentet, mint a DRIP-seq vagy DRIPc-seq. Elképzelhető, hogy a DRIP alkalmasabb a hosszú élettartamú R-hurkok detektálására, míg az R-ChIP jobb lehet az RNáz H1 által lebontott rendkívül dinamikus R-hurkok észlelésére (Vanoosthuyse, 2018).

Az egyik legújabb, S9.6 antitest független módszer, a biszulfid kezelési technika továbbfejlesztése, az SMRF-seq. Gyengéd DNS izolálás és restriktív enzim emésztést követően végzik nem denaturált környezetben a biszulfid kezelést. A hosszú leolvasású, egyedi molekulákat szekvenáló PacBio szekvenálás lehetővé teszi az R-hurok „lábnyomok” azonosítását közel nukleotid pontosságú felbontással, szálspecifikus módon a hosszú egyedi DNS-molekulákon, ultramély lefedettség mellett (Malig et al., 2020).

Fontos megjegyezni azt a megfigyelést, amely szerint a DNS-replikáció az R-hurok felhalmozódásának modulátora, ami miatt a kiindulási anyag sejtciklus-profilja, és különösen az S-fázisban és a mitózisban lévő sejtek aránya, nagymértékben befolyásolhatja a DRIP eredményét. Ezért vagy szinkronizálni kell a vizsgált mintákat, vagy törekedni kell az S-fázisban és a mitózisban lévő sejtek hasonló arányára (Vanoosthuyse, 2018).

1.6. R-hurok szabályozó gének, fehérjék azonosítása

Az utóbbi években több tanulmány megjelent, melyben nagy áteresztőképességű szűréseket végeztek az R-hurok szabályozó-, kötő fehérjék azonosítása érdekében.

A humán R-hurok kötő fehérjék azonosításának eddigi egyik legjelentősebb eredménye Wang és munkatársainak a kutatásából származik. Kétféle szintetikus DNS-RNS hibriddel végzett pull-down assay-ket követő tömegspektrometriával 803 olyan humán fehérjét azonosítottak, amelyek DNS-RNS hibridhez kötődnek, majd megerősítették, hogy *in vivo* is kötődnek a fehérjék az R-hurkokhoz. A 803 fehérjét számos sejttani funkció jellemzi, beleértve az RNS-feldolgozás legtöbb lépését. A fehérjék jelentős része K-homológ (KH) és helikáz doménnel rendelkeznek. (A KH domén felismeri, illetve megköti az RNS-t) Az azonosított fehérjék közül több mint 300 fehérje preferálta a DNS-RNS hibridhez való kötődést, a kettős szálú DNS-el szemben (Wang et al., 2018). Természetesen a DNS-RNS hibridekhez való kötődés nem feltétlenül jelenti azt, hogy a fehérje szabályozza is az R-hurkokat. Ugyanakkor a fehérjék befolyásolhatják az R-hurok stabilitását a transzkripcióra vagy a DNS-topológiára gyakorolt közvetett hatásokon keresztül, anélkül, hogy R-hurkot kötnének (Fournier et al. 2021).

Egy 2021-ben publikált tanulmányban Wu és munkatársai egér embrionális őssejteken végeztek S9.6 immunprecipitációt követő tömegspektrometriás analízist, amellyel 364 R-hurokkal kölcsönható fehérjét azonosítottak. Nukleoláris fehérjék, beleértve számos DEAD-box családba tartozó helikáz fehérjék, erősen dúszultak a találatok között. A DEAD-box helikázok alaposabb vizsgálata, feltárta a fehérjék szerepét a rRNS transzkripció utáni érésében és közvetlen vagy közvetett szerepét a differenciálódáshoz kapcsolódó gének szabályozásában. Ezek az eredmények az R-hurokhoz kapcsolódó fehérjék hatalmas hálózatát tárták fel, amelyek kulcsfontosságúak az őssejt homeosztázisban (Wu et al., 2021).

Andrés Aguilera munkacsoportja célzott szűrést végzett a potenciálisan káros R-hurkokkal szembeni védelemben szerepet játszó DNS-károsodás válaszfaktorok felkutatására. Ehhez HeLa sejtvonalat 240 DNS-károsodás válaszfaktort kódoló gént célzó siRNS könyvtárral

csendesítettek, majd S9.6-al végzett immunfluoreszcens jelöléssel vizsgálták, hogy történik-e az R-hurkok mennyiségében változás. Ezáltal három olyan DNS-károsodás válasz útvonalat tártak fel, amelyek fontosak a DNS-RNS hibrid felhalmozódásának megelőzésében az emberi sejtekben (Barroso et al., 2019).

Ezek a vizsgálatok nagyszerű kiinduló pontként szolgálnak további funkcionális vizsgálatokhoz, melyek segítségével közelebb kerülhetünk az R-hurok szabályozás megértéséhez.

2. Célkitűzés

Az ellenőrizetlen R-hurkok veszélyt jelentenek a genom integritására, ezért kulcsfontosságú az R-hurok struktúrák felismerésében és szabályozásában résztvevő fehérjék azonosítása, jobb megismerése. Ezért **első célunk** az ismert R-hurok szabályozó gének és daganatok közötti kapcsolatok vizsgálata volt. Ehhez genomikai adatbázisokat felhasználva vizsgáltuk kulcsfontosságú DNS-RNS hibrid kötő fehérjék génexpressziós adatait. Daganatos beteg csoportok génexpressziós adatait összevetettük a betegek túlélési adataival. Ezzel vizsgálva az R-hurkok szerepét a betegségek progressziójában. További célunk volt humán tumor sejtvonalak gyógyszerérzékenységének és a sejtvonalakban expresszálandó R-hurok regulátorok kapcsolatának a feltárása.

Második célunk egy nagy áteresztőképességű R-hurok regulátor screen kifejlesztése volt bárkódolt gendelációs élesztő könyvtáron (DRIP-BC-seq). A screen párhuzamos R-hurok szint mérést tesz lehetővé nagyszámú mutánsban ugyanazon a genomi teszt szakaszon. Célunk volt a DRIP-BC screen találatainak validálása a teljes genomban DRIP-seq-el, a mutánsok fiziológiájának vizsgálata spot assay-vel, illetve további funkcionális génexpressziós vizsgálatok elvégzése a mRNS-seq-el. A génexpressziós vizsgálatokkal megérthetjük, hogy a gendelációk milyen úton okoztak változást az R-hurkok elhelyezkedésében, mennyiségében.

Harmadik célunk egy új térbeli genomszerkezetvizsgáló screen kifejlesztése volt (4C-BC-seq), amellyel nagyszámú élesztő mutánsban szimultán vizsgálhatjuk egy adott genomi teszt szakasz összes 3D interakcióit. További célunk volt, hogy a DRIP-BC-seq és a 4C-BC-seq közös taláataival azonosítsunk olyan mutánsokat, amelyek egyszerre befolyásolják az R-hurkokat és a genom térbeli szerkezetét.

A 4C-BC-seq teljes genom szinten történő validálásához **negyedik célul** tűztük ki a Hi-C kromatin háromdimenziós szerkezetvizsgáló módszer implementálását a laborunkban. Ehhez vad típusú és Nodulin homeobox (NDX) mutáns *Arabidopsis thaliana* modellnövényeket vizsgáltunk. Ezzel egyúttal az R-hurkok kromatinszerkezet változásban való szerepét is tisztázni kívántuk, mivel az NDX volt az első fehérje, amiről bizonyították, hogy az R-hurok szimplaszálú DNS szakaszához kötődik és feltételezhetően stabilizálja e szerkezetet (Sun Q *et al.* Science 2013).

3. Eredmények

3.1. R-hurok szabályozó gének farmakogenomikai vizsgálata - fókuszban a rákterápia

Elemzéseink során azt vizsgáltuk, hogy a kulcsfontosságú R-hurkot kötő fehérjék összefüggésben állnak-e a rák túlélésével és a gyógyszerérzékenységgel. Szisztematikus farmakogenomikai elemzést végeztünk ezen összefüggések azonosítására. Az R-hurok gének és a rák közötti kapcsolat vizsgálatához először meghatároztuk, hogy a Wang et al. tanulmányában azonosított RNS-DNS hibrid kötő fehérjék (Wang et al., 2018) közül hány található meg a rákos gének regiszterében (Repana et al. 2019), amely 2372 gént tartalmaz, melyek szomatikus mutációja rák kialakulásához vezethet. A 448 vizsgált R-hurok gén közül 92 szerepelt a rákot kiváltó gének között, ami statisztikailag szignifikáns feldúsulásnak számít ($p=0,005792$; kétmintás z próba). Ezen 92 gén közül kiválasztottunk 36 gént, amelyek olyan kiemelkedő molekuláris útvonalakban játszanak szerepet, melyek R-hurok asszociációval rendelkeznek és szerepet játszanak a rák kialakulásában is (pl. DNS-topológia; RNS- DNS hibrid ribonukleázok és helikázok; RNS érés, splicing és export; DNS károsodás; kromatin módosítások).

3.1.1. Daganatos betegek génexpresszió és túlélés asszociációjának analízise

Az R-hurok gének mRNS-expresszióját a Cancer Genome Atlas (TCGA) adatbázisból töltöttük le, összehasonlítottuk az egészséges szövetek és a primer tumorok génexpressziós értékeit. A BUB3, DHX9, PRMT1, THOC4, THOC7, U2AF1 és ZNF207 (BUGZ) expressziója több primer daganatban megnövekedett a normál szövetekhez képest, míg az SRSF1 (ASF/SF2) a legtöbb daganat esetén csökkent (kivéve az akut myeloid leukémiát; LAML). Ezt követően vizsgáltuk, hogy az R-hurok gének génexpressziós szintje korrelál-e a rákos betegek túlélésével. A TCGA génexpressziós (RNS-seq) és túlélési adatait felhasználva elemzésünk során 12 862 Kaplan-Meier túlélési görbét állítottunk elő, és számos olyan esetet azonosítottunk, amelyek szignifikáns túlélési összefüggést mutattak az R-hurok génexpressziós szintjével (179 $p < 0,05$; 33 FDR $< 0,05$ esetén;). A legtöbb túlélési összefüggést a mellékvesekéreg karcinóma (ACC - 19 gén) és mesothelioma (MESO - 18 gén) esetében figyeltük meg az R-hurok gének alacsony expressziójával korrelálva. Az esetek 70%-ában (123, $p < 0,05$) az R-hurok gének alacsony expressziója mutatott összefüggést a rákos betegek hosszabb túlélésével. Az RNASEH2A, PIF1, THOC6 és PRMT1 alacsony expressziója például szignifikánsan meghosszabbította a túlélési időt mesotheliomában (MESO), míg az alacsony

FANCM mRNS-szint előnyös volt az emlőrák (BRCA) túlélése szempontjából. Az esetek 30%-ában ($52\ p < 0,05$ -nél) az R-hurok gének magas expressziója társult a jobb túlélési arányhoz; például a TREX1 és a BUB3 magas expressziója előnyös volt a méhnyakrák betegeknél (CESC). 10 R-hurok gén esetében a hosszú távú túlélés kizárólag az alacsony expressziójú betegek csoportjában volt megfigyelhető, függetlenül a rák típusától (ATXN2 (1), BRCA2 (5), CARM1 (6), DDX19A (2), RNASEH1 (6), THOC2 (4), THOC3 (4), TOP1 (5), U2AF1 (2), ZNF207 (3)). A többi 26 R-hurok gének esetén a magas vagy alacsony expressziójú csoportok előnyössége ráktípusonként változó.

A túlélési asszociációk száma szerint úgy tűnik, hogy az RNASEH2A, BLM, BRCA1, BUB3 és PIF1 több rák esetében is fontosak a túlélés szempontjából, míg az ATXN2, DDX19A és U2AF1 hatása csak a rák bizonyos típusaira korlátozódik. Annak bizonyítására, hogy az analízisünk képes azonosítani a valós génextpresszió - rák túlélés összefüggéseket, elemzésünkbe egy onkogén (ERBB2 - HER2) és egy tumorszuppresszor (TP53) gént is bevontunk, amelyek ismert pozitív kontrollok a rák asszociációjára, és nincs ismert R-hurok funkciójuk. Az R-hurok gének génextpressziója hasonló számú (néhány esetben több) rákos megbetegedés esetén hozható összefüggésbe a túléléssel, mint az ERBB2 és a TP53 esetében, ami az RNS-DNS hibrid kötő fehérjével kapcsolatos megfigyeléseink relevanciáját erősíti.

3.1.2. Sejtvonalak génextpresszió és drogszenzitivitás asszociációjának analízise

Annak érdekében, hogy azonosítsuk azokat az R-hurok géneket, amelyek potenciális gyógyszer-célpontok lehetnek a daganatterápia során, szinergikus kölcsönhatásokat kerestünk rákos sejtvonalakból származó R-hurok gének mRNS expressziós állapota és a kemoterápiás szerekkel szembeni érzékenység között. 1065 rákos sejtvonal 297 droggal szembeni érzékenységét hasonlítottuk össze az egyes sejtvonalakban a vizsgált R-hurok gének mRNS expressziós adataival. A vizsgált drogok az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatóság (FDA) által elfogadottak, biológiai útvonalak széles skáláját fedik le, beleértve a protein kináz jelátvitelt, a citoskeleton működését, a DNS-replikációt, a DNS-javítást és sejtciklus szabályozást.

Összesen 22 414 drog érzékenység és génextpresszió asszociációt azonosítottunk (22 414 - $p < 0,05$; 508 - $FDR < 0,05$). A szignifikáns kölcsönhatások teljes száma jelentős eltéréseket mutat gyógyszerenként (70–230 interakció gyógyszerenként) és a drogok által megcélzott molekuláris útvonalak szerint csoportosítva is. A legszélesebb körben reprezentált útvonalak közé tartozott a Ser/Thr protein kináz útvonal és a PI3K/RTK/MAPK jelátvitel, míg

a leggyakoribb gyógyszer-célpontok a MEK1/2, BRAF, PARP1/2, HSP90, AKT1/3, GSK-k, PI3K-k, IGF1R, ROCK1/3 és EGFR voltak. A vizsgált R-hurok gének 80%-ánál találtunk szignifikáns gyógyszer-érzékenységi asszociációt (29 p < 0,05; kivéve a BRCA2, BUGZ, DDX19, RNASEH1, RTEL1, THOC3 és THOC4; S1_4 táblázat), ebből a CARM1, EWSR1, DHX9 és a THOC1 mutatta a legtöbb gyógyszer-kölcsönhatást. Jelentős eltéréseket figyeltünk meg a különböző rákos sejtvonalak közötti gyógyszer-kölcsönhatások számában, irányultságában. Például a kissejtes tüdő karcinóma és a petefészekrák sejtvonalak a legtöbb vizsgált vegyületre és génre nézve negatív asszociációt mutattak, míg a B-sejtes leukémia, a Hodgkin-limfóma, a fej-nyakrák és az Ewing-szarkóma sejtekre túlnyomórészt pozitív asszociáció volt jellemző. Ezek a különbségek arra utalnak, hogy az RNS-DNS hibrid kötő fehérjék hatása eltérő kimenetelű lehet a különböző kemoterápiás kezelésekre adott válaszokban a genomális kontextustól/ráktípustól függően.

3.1.3. Túlélés és drog kölcsönhatás asszociációja

Mivel a természetes daganatokból származó rákos sejtvonalak jól tükrözik a primer rákok genomális kontextusát és szövettípusát, az azonosított gyógyszer-kölcsönhatásokat leszűkítettük azon R-hurok génekre, amelyek szignifikáns túlélési asszociációkat mutattak a megfelelő primer rák esetében. Ezáltal 1630 szignifikáns túlélés és gyógyszer-kölcsönhatást azonosítottunk (p < 0,05), amelyek 29 R-hurok gén expressziójával vannak kapcsolatban (hét R-hurok gén nem szerepel az eredmények között, mert nem volt túlélés vagy gyógyszer-kölcsönhatás asszociációja, vagy a vizsgált sejtvonalak között nem szerepelt a primer daganatnak megfelelő sejtvonal).

A következő tendenciákat figyeltük meg:

- i) A legtöbb túlélési interakció a következő 10 génnél figyelhető meg, melyek szignifikáns drog kölcsönhatással is rendelkeznek: BLM, RNASEH2A, ATXN1, BRCA1, BUB3, CARM1, GADD45A, FANCD2, THOC1, THOC2.
- ii) A THOC2 magas expressziója szarkóma sejtvonalakban a CX-5461 (G4 ligand / RNS-polimeráz I inhibitor) magas IC50-értékével társult, ami arra utal, hogy a CX-5461 kevésbé hatékony a magas THOC2 expressziót mutató szarkómák kezelésében. Ehhez képest a CX-5461 alacsony IC50-értéke az ATXN1 és TREX1 magas expressziójával, valamint a melanóma és a méhtest rákbetegeknél hosszabb túlélési idővel járt együtt.
- iii) A BRCA1 expressziója a nyelőcső karcinóma sejtvonalakban az 5-fluorouracillal (5-FU) szembeni magas IC50-nel (rezisztenciával) társult, míg az alacsony BRCA1-szint jobb túlélést

eredményezett nyelőcső karcinómában. Ez arra utal, hogy az 5-FU kezelés hatékony lehet a BRCA1(-) nyelőcső karcinómák kezelésében. Hasonlóképpen, a BRCA1 expressziója glióma sejtvonalakban az (52)-7-oxozeaenol, a GDC0941, a refametimib és a szelumetinib hatékonyságának csökkenésével járt együtt, míg az alacsony BRCA1 szint jótékony hatással volt a low-grade glióma túlélésére. Ezenkívül a mesothelioma sejtvonalak rezisztensek a doxorubicinre, az OSU-03012-re vagy a thapsigarginre, ha expresszálják a BRCA1-et. Ezek a gyógyszerek potenciálisan hatékony kemoterápiás szerek a BRCA(-) gliómák és mesotheliómák kezelésére. Fontos, hogy az 5-FU-t egy nyelőcsőkarcinómával (NCT00052910) kapcsolatos klinikai vizsgálatban tesztelik, a szelumetinibet low-grade gliómában (NCT01089101), a doxorubicint pedig mesotheliómában szenvedő betegeknél (NCT05063420506342) vizsgálják.

iv) A legtöbb gyógyszer/gén asszociációt az RDEA119, a szelumetinib és az olaparib esetében figyeltük meg. A legtöbb sejtvonal rezisztens RDEA119-re és szelumetinibre, olaparibra viszont érzékenységet mutat magas R-hurok gén génexpressziós szint mellett (kiegészítő S3 ábra). Például a szelumetinib-kezelés hatástalan volt az AQR-t overexpresszáló gyomor adenokarcinóma sejtvonalakban (NCT02448290 - 2. fázis), az ATXN1-et vagy BLM-et overexpresszáló szarkóma sejtvonalakban (NCT03155620 - 2. fázis, NCT01752569 - 2. fázis), a BRCA1-t vagy RNASEH2A-t overexpresszáló glióma sejtvonalakban, a FANCM-et vagy RNASEH2A-t overexpresszáló veserák sejtvonalakban és a TREX1-et overexpresszáló endometrium karcinóma sejtvonalakban. Ami a betegek túlélését illeti, az AQR, ATXN1, BLM, BRCA1 és RNASEH2A alacsony expressziója hosszabb túléléssel párosult a primer rákos megbetegedések esetén, kivéve a FANCM és TREX1 esetében, ahol a magasabb mRNS-szint volt előnyös a vesesejtes karcinómás és endometrium karcinómás betegeknél. Az olaparib kezelés eredményes volt a magas DDX19A expressziót mutató prosztatata adenokarcinóma sejtekben és a GADD45A-t overexpresszáló mellrák sejtekben, de a magas ZNF207 (BUGZ) expresszióval rendelkező mesothelioma sejtvonalak rezisztensek bizonyultak a kezelésre. Az Olaparib klinikai vizsgálat alatt áll mesotheliómában (NCT03531840 – 2. fázis), prosztatata adenokarcinómában (NCT01682772 – 2. fázis) és emlőrákban (NCT02000622 – 3. fázis) szenvedő betegeken.

v) Számos olyan gyógyszer, amely klinikai vizsgálat alatt áll az emlőrák kezelésére, alacsony IC50-értéket mutat a magas BRCA1 génexpressziójú mellrák sejtvonalakban. Például rukaparib (NCT02505048 – 2. fázis, BRCA1,2 mutáns betegek), dabrafenib (NCT02465060 – 2. fázis, BRAF V600E/R/K/D mutáns betegek), vismodegib (NCT02465060 – 2. fázis - SMO

vagy PTCH1 mutáns, NCT02694224 - 2. fázis), BMS-754807 (NCT01225172 - 2. fázis) és ruxolitimid (NCT01562873 - 2. fázis, NCT02928978 - 2. fázis).

vi) A magas BRCA1 génexpressziót mutató nyelőcsőkarcinóma sejtvonalak alacsony IC50-értékkel jártak a motesamib-, ciszplatin- és trametinib-kezeléseknél, amelyeket különféle klinikai vizsgálatokban tesztelnek (NCT00101907 - 1. fázis, NCT00655876 - 3. fázis, NCT20246, NCT2020246).

vii) A glióma sejtvonalakban az alacsony CARM1 expresszió az SN38 kezelés (I. típusú topoizomeráz gátló, az irinotekán aktív metabolitja) jobb hatékonyságával járt együtt, míg az alacsony CARM1 szinttel rendelkező gliómás betegek hosszabb túlélést mutattak. Lehetséges, hogy a CARM1(-) rákok érzékenyebbek az SN38 gyógyszeres kezelésre, ami a Top3B és a Top1 gátlásához vezet, ami viszont növelheti az R-hurok szintjét [32] és sejthalált indukálhat.

3.2. R-hurok szabályozó gének azonosítása élesztő gén deléciós könyvtár segítségével.

Az R-hurok daganatterápiában betöltött szerepének vizsgálatával párhuzamosan egy élesztő gén deléciós könyvtárat segítségül hívva elkezdtünk egy "screening" jellegű kísérlet sorozatot az eddig nem ismert R-hurok szabályozó gének azonosításának érdekében.

3.2.1. DRIP-BC-seq módszer beállítása

Az általunk kifejlesztett DRIP-BC-seq módszer során az Epi-ID gén deléciós élesztő könyvtáron DNS-RNS hibrid immunprecipitációt (DRIP) végeztünk, majd az immunprecipitált mintából PCR-el amplifikáltuk a különböző géndeléciókat azonosító bárkódokat (BC), végül az egyes bárkódok mennyiségét új generációs szekvenálás segítségével kvantitáltuk. Így lehetővé vált a bárkód környezetében megmérni az R-hurok szint különbségeket a különböző gén deléciós élesztő törzsek között.

A DRIP kísérlethez az izolált genomi DNS-t csupán enyhén fragmentáltuk ultrahangos kezeléssel annak érdekében, hogy a bárkód szélesebb környezetéről nyerjünk információt. A gélképen látható, hogy a DRIP-hez használt DNS kisebb, mint 5 kb fragment méretű volt. Az immunprecipitációt követő bárkód PCR 50 ng DNS-en ment. Korábban kipróbáltuk 12,5 ng, 25 ng és 50 ng epi-ID élesztő könyvtárból származó DNS-en a bárkód PCR-t és agaróz gélelfőn ellenőrizve a PCR termékeket, úgy láttuk, hogy 12,5 - 50 ng között a PCR termék mennyisége lineárisan növekszik, tehát ezzel a kezdeti DNS mennyiség tartománnyal végezve a PCR-t, 17

PCR ciklust használva, kvantitatív eredményt kapunk. Az immunprecipitációt, RNaseH előkezelt mintán is elvégeztük, viszont a bárkód PCR az RNaseH előkezelt DNS-ből immunprecipitált mintán nem eredményezett terméket. Feltételezhetően az RNaseH előkezelt minta immunprecipitátuma csak aspecifikusan kötődött DNS-eket tartalmazott. Ebből arra lehet következtetni, hogy a kezeletlen mintán végzett immunprecipitáció (IP) S9.6 antitest specifikus DNS szakaszokat eredményezett az IP eluátumban és a bárkód környékén az élesztő törzsek legalább egy részében található R-hurok.

A DRIP-BC-seqhez készített DRIP mintákat QPCR-el is ellenőriztük egy R-hurok szempontjából pozitív és negatív genomi régió. Az RNaseH kezelt mintában több, mint felére csökkent a DRIP jel (IP/input arány) a pozitív genomi régió (Pos1 primer), míg a negatív genomi régió (CEN16 primer) nagyon alacsony QPCR jelet detektáltunk az RNaseH kezelt és kezeletlen mintákban egyaránt.

3.2.2. DRIP-BC-seq screen találatai

Mind a 4200 gén mutáns törzsön elvégezve a DRIP-BC-seq kísérletet 110 törzset találtunk melyekben a DRIP jel a bárkód ~10 kb környezetében szignifikánsan növekedett (IP/input > 1,5), 89 törzsben pedig szignifikánsan csökkent (IP/input < 0,67) a DRIP jel. A két gén csoporton funkcionális annotációt végeztünk a DAVID adatbázis használatával és azt találtuk, hogy azon deletált gének között melyek hiánya R-hurok növekedést eredményezett jelentősen dúsulnak a mitokondriális funkciójú, metabolikus folyamatokkal kapcsolatos gének. Azon deletált gének között melyek hiánya a DRIP-BC-seq alapján R-hurok csökkenést eredményezett a gén funkciókban jelentős egyezést nem találtunk. Viszont említésre méltó lehet, hogy néhány ubikvitin-kötéssel (7 db) kapcsolatos és autofágiával (4 db) kapcsolatos gén megtalálható a csökkent DRIP-BC-seq eredményű találatok között. A szignifikánsan magasabb DRIP jelű törzsek közül kiválasztottunk 11 mitokondriális funkcióval bíró törzset, melyeken teljes genom DRIP-seq-et és DRIP-QPCR méréseket végeztünk. Vizsgáltuk a kiválasztott törzsek növekedését YPD és YPG agar platen spot assay-nek nevezett növekedési assay-vel. Azt tapasztaltuk, hogy YPD gazdag táptalajon mindegyik mutáns képes nőni, viszont az *rpo41Δ*, *met7Δ*, *mgm101Δ*, *mss116Δ* törzsek jelentősen lassabban nőnek a vad típushoz képest. YPG agaron, ahol a glükóz helyett glicerol van a táptalajban, ugyanezek a törzsek egyáltalán nem mutattak növekedést. A *gas1Δ* és *pet20Δ* törzsek pedig sokkal lassabban nőttek, mint a vad típusú élesztő törzs.

3.2.3. DRIP-BC-seq találatainak validálása teljes genom DRIP-seq-el és QPCR-el

Minden DRIP kísérlet el lett végezve RNaseH előkezelt DNS-en is negatív kontrollként, majd QPCR-el vizsgáltuk a mintákat R-hurok szempontjából pozitív és negatív genomi régióon (El Hage & Tollervey, 2017). Az RNaseH kontroll mintánál a pozitív régióban (18S rDNS) nagyon alacsony jelet detektáltunk, az R-hurok negatív genomi régióban (CEN16) pedig a normál és RNaseH előkezelt mintában egyaránt nagyon alacsony jelet mértünk. Ez alapján a DRIP-ek R-hurok specifikus jelet mutatnak. A 18S rDNS régió a különböző mutánsok DRIP jel erősségének összehasonlítására nem megfelelő választás, mert ez a DNS szakasz 100-200 kópiában is jelen lehet a genomban, viszont R-hurok szempontjából nagyon erős pozitív kontroll régió, a módszer hatékonyságának ellenőrzésére kitűnően alkalmas.

A bárkód 10 kb környezetét összesítve (DRIP-seq score) vizsgálva az *exo5Δ*, *mgm1Δ*, *dss1Δ* törzseket leszámítva a vad típushoz képest a DRIP jel nőtt a validálásra kiválasztott törzsekben, tehát sikeres volt a DRIP-BC-seq validálása.

Ehhez képest a bárkód környezetében R-hurok szint növekedést mutató törzsek, a teljes genom DRIP-seq összesített peak számát tekintve, több esetben a várttól eltérő eredményt mutattak. Az *ung1Δ*, *rpo41Δ*, *oye2Δ*, *met7Δ*, *gas1Δ* mutánsokban jelentősen csökkent az összesített peak szám, tehát a vad típushoz képest az R-hurkok nagy arányban eltűntek ezekben a törzsekben. Az *exo5Δ*, *mgm1Δ*, *pet20Δ*, *dss1Δ*, *mss116Δ* törzsekben a DRIP-BC-seq eredményével egybevág, hogy a vad típushoz képest globálisan megnövekedett az R-hurkok száma. Az *mgm101Δ* mutánsban kis mértékű peak szám növekedést tapasztaltunk. Tehát a DRIP-BC-seq eredményével az össz peak számot vizsgálva 6 törzs DRIP-seq eredménye vág egybe a vizsgált 11 törzs közül, ez az eltérés a screening módszer jellegének tudható be. Ezért is nagyon fontos a validálás, viszont a teljes genom DRIP-seq-el azonosított R-hurok csökkenést mutató törzsek hasonlóan figyelemfelkeltőek és további vizsgálatokra érdemesek, mint az R-hurok növekedéssel jellemezhető törzsek.

A teljes genom DRIP-seq eredményét is validálni kívántuk (illetve közvetve egyúttal a DRIP-BC-seq eredményét), ezért két a bárkód közelébe tervezett primerrel QPCR-t végeztünk a DRIP mintákon. Az egyik primer pár a bárkódtól ~2 kb távolságra, míg a másik ~5 kb távolságra lett tervezve. A DRIP-BC-seq-nél a fragment méret átlagosan 3 kb volt, míg a teljes genom DRIP-seq-nél csak ~1 kb, ezért érdemes a teljes genom DRIP-seq-et egymástól ~3 kb távolságra lévő régiókon is vizsgálni a bárkód ~5 kb környezetében.

A DRIP-QPCR-el a DRIP-seq-ben a bárkód ~6 kb környezetében tapasztalt széles DNS tartományt lefedő vagy nagyobb fokú változásokat sikerült validálni. Ilyen például az *exo5Δ* és *pet20Δ* törzsekben megfigyelhető jelentős R-hurok szint növekedés, az *ung1Δ*, *met7Δ* törzsekben pedig a nagy mértékű RNS-DNS hibrid csökkenés a vad típushoz képest. Leginkább szembetűnő ellentétes eredményt az *rpo41Δ* törzs DRIP-QPCR eredményében láttunk a vizsgált két genomi régióban. Míg a PTP1 régióban nőtt a DRIP jel, az SSB1 régióban csökkent. A genome browserrel megjelenített DRIP-seq jelerősség alapján mindkét régióban csökkenés látható, de egy általános alacsony szintű jel is megfigyelhető a látómező teljes 14 kb hosszúságú szakaszán, ami miatt szabad szemmel nehéz a különbséget megítélni. A bárkód 10 kb környezetét vizsgálva az összesített DRIP jel mennyiség kvantitálása alapján nőtt az R-hurkok szintje a bárkód környezetében. Ehhez képest globálisan vizsgálva az *rpo41Δ* törzset azonban nagyfokú R-hurok szint csökkenést tapasztaltunk, ami eredménnyel összhangban állt a később elvégzett mRNA-seq eredménye is. Az R-hurkok dinamikája, illetve genom variabilitása okozhatja, hogy annak ellenére került néhány törzs a látókörünkbe a DRIP-BC-seq emelkedett R-hurok szintet mutató törzseit vizsgálva, hogy globálisan R-hurok depléción jellemzi őket.

Összességében elmondható, hogy a bárkód 10 kb környezetét DRIP-seq-el vizsgálva a törzsek többségében sikerült validálni a DRIP-BC-seq eredményét. Globálisan vizsgálva az R-hurok szint változást viszont jelentős eltérést detektáltunk a DRIP-BC-seq eredményéhez képest. Számos mutánsban nagymértékben csökkent a DRIP jel az egész genomot tekintve.

3.2.4. Ígéretesnek tűnő DRIP-BC-seq találatok génexpressziós analízise

A validációra kiválasztott élesztő törzseken génexpressziós analízist végeztünk mRNA-seq használatával. Globálisan vizsgálva a génexpressziós szinteket nem látható nagyobb eltérés a különböző mutáns törzsek és a vad típusú élesztő között. A vad típushoz képest alul és felülexpresszált gének annotálását nézve viszont 3 génmutáns törzs génexpresszió változása nagyon érdekesnek bizonyult és egybeesik a teljes genom DRIP-seq-el kapott eredményekkel. A *met7Δ* törzsben 33 transzpozonnal kapcsolatos gén magasan expresszálódik, melyek közül 29 RNS-DNS hibrid ribonukleáz aktivitással is rendelkezik. Ezzel jól korrelál, hogy a *met7Δ* mutánsban globálisan kb. ötödére csökken az R-hurkok mennyisége. Ehhez képest a *dss1Δ* élesztőkben 12 transzpozon gén alul expresszálódik, melyek közül 11 gén RNS-DNS hibrid ribonukleáz aktivitással bír. Ezzel szintén szinkronban áll, hogy a *dss1Δ*-ban az R-hurkok szintje csaknem duplájára nő a vad típushoz képest. A *met7Δ* és *rpo41Δ* törzsekben a csökkent R-hurok szinttel párosul, hogy számos riboszómával és ribonukleoprotein komplexel

kapcsolatos gén expressziója alacsonyabb a vad típushoz képest. A *rpo41Δ*-ban a *met7Δ*-hoz hasonlóan jelentősen lecsökken az R-hurkok előfordulása. A *dss1Δ*-ban viszont az emelkedett R-hurok szinttel a riboszómával és ribonukleoprotein komplexel kapcsolatos gének expressziójának a növekedése társul.

3.3 Gén deléciók hatásának vizsgálata a genom háromdimenziós szerkezetére

A géndelécióknak az R-hurkokra való hatásán túl kíváncsiak voltunk a genom háromdimenziós szerkezetére való hatására is, ezért kifejlesztettük a 4C-BC-seq-nek elnevezett technikát. A módszer során az epi-ID library élesztő törzsein a bárkódnak a kromatin interakcióit vizsgáljuk. Azt reméljük, hogy sikerül eddig nem ismert kromatin szerkezet módosító géneket azonosítani, illetve, ha kapunk közös találatokat a DRIP-BC-seq és 4C-BC-seq vizsgálattal akkor potenciális R-hurok és egyben kromatin szerkezetet is szabályozó géneket is felfedezhetünk.

3.3.1 A 4C-BC-seq módszer beállítása

Rengeteg optimalizáció eredményeként sikerült beállítani a módszert. Megmutattuk, hogy az in situ proximity ligálással majdnem intakt genomi DNS méretű fragmenteket kaptunk. A második, izolált DNS-en végzett restriktív enzimes emésztést követő ligálással pedig a fragmentek mérete nem változott. Ezt vártuk, mert ekkor a DNS daraboknak csak körré kell záródniuk, ekkor már nem akarjuk, hogy különböző fragmentek összeligálódjanak és így a méretük megnövekedjen. Az inverz PCR szintén sikeresnek mondható, az elmosódott sávok azt jelzik, hogy kellően változatos fragmentek képződtek a PCR során. A néhány erősebb sáv, pedig azoknak a fragmenteknek a terméke, melyek önmagukba záródtak közbülső hozzájuk ligálódott fragment nélkül. A 4C-BC mintákon végeztünk úgynevezett input PCR-t is, ami a DRIP-BC-seq-nél végzett szimpla PCR-el azonos, bárkódokat amplifikáló mérés. Ezzel vizsgáljuk, hogy a különböző törzsek milyen arányban vannak jelen a minta poolban és ezáltal tudjuk normalizálni a megszekvenált inverz PCR minta eredményét. Így kivédve, hogy ne detektáljunk fals interakciós dúsulást amiatt, hogy egy törzs erősebben vagy gyengébben reprezentált a minta elegyben.

A megszekvenált kiméra fragmentek eredménye alapján, az eddig vizsgált közel 400 törzs közül 6 gén mutánst találtunk melyeknél az intra-kromoszómális interakciók gyakorisága és/vagy erőssége magasabb az átlagnál és 3 gént, ahol az inter-kromoszómális interakciónál figyeltünk meg több és/vagy erősebb kölcsönhatásokat.

Az ígéretesnek mondható kísérlet folyamatban van az epi-ID library többi tagjával. A teljes élesztő könyvtár eredménye alapján néhány ígéretes törzsnél, teljes genom szinten szeretnénk majd vizsgálni a kromatin interakciós hálózatot, Hi-C módszer segítségével.

3.4. Genomkonformáció leképezés (Hi-C) módszer beállítása teljes genom interakciós profil vizsgálathoz.

A 4C-BC-seq kísérlet által talált potenciálisan genomkonformáció változást okozó génmutáns törzseket a későbbiekben teljes genom szinten szeretnénk vizsgálni Hi-C módszer segítségével. Ehhez elsőként egy másik project keretén belül állítottuk be a magas komplexitású bioinformatikai elemzést igénylő kromatin háromdimenziós szerkezet vizsgáló módszert. Célunk az összes intra- és interkromoszómális kapcsolat térképezése volt.

Arabidopsis thaliana modellnövényben vizsgáltuk a korábbi tanulmányok alapján feltételezhetően R-hurok stabilizáló szereppel bíró NDX (Nodulin homeobox) fehérje hiányának a hatását a kromatin háromdimenziós szerkezetére. A vizsgálathoz 10 napos *ndx1-4* mutáns és Col-0 vad típusú növényekből izolált sejtmagokat használtunk. A sejtmagokon in situ Hi-C-t végeztünk és újgenerációs szekvenálással 200 millió read-el megszekvenáltuk a mintákat. A normalizált kontakt mátrixok 25 kb felbontással vizsgálva nagyon hasonló képet mutattak az *ndx1-4* és Col-0 növényekben. Ez arra utal, hogy az NDX fehérje hiánya nem vezet az *Arabidopsis* háromdimenziós kromoszóma architektúrájának kiterjedt átstrukturálásához. Azonban figyelemre méltó kvantitatív változásokat találtunk a két Hi-C térkép között a kontaktmátrixok differenciálanalízisét elvégezve. Az *ndx1-4* mutánsban számos genomi régió felerősödött (vörös) vagy csökkent (kék), ami a térbeli kapcsolatok globális átrendeződését jelzi NDX hiányában. Az azonosított differenciális kontaktok circos diagramja a csökkent (kék) és emelkedett (piros) Hi-C interakciós kapcsolatokat jelölve, rávilágít arra, hogy az intrakromoszómális kontaktusok többnyire csökkennek, míg az interkromoszómális kontaktusok az *ndx1-4* mutánsban általában növekednek. Főként a centromerek és a csomósodással jellemzett régiók - knot engaged elements (KEE)-ek között fokozódott a kapcsolatok száma. Ez alapján úgy tűnik, hogy az NDX hiánya távoli kromatin kölcsönhatásokat mediál kromocentereken és transzkripciósan csendes kromatinon (KNOT régiókon) keresztül.

4. Diszkusszió

Az R-hurkok az emberi genom jelentős részében elhelyezkedő dinamikus struktúrák (Sanz et al., 2016). A tumorgenomokkal kapcsolatos új ismereteink arra engednek következtetni, hogy az R-hurkok genomi pozíciója, élettartama és funkciója zavart szenved a legtöbb rák esetében. Kísérleti adatok bizonyítják, hogy az R-hurok homeosztázis megváltozása kóros epigenetikai fenotípushoz vezet, amely megzavarhatja a telomerek működését vagy DNS-replikációs stresszt és mutagenezist idézhet elő. Azonban kevés ok-okozati információ áll rendelkezésre azokkal a rákspecifikus változásokkal kapcsolatban, amelyekben az R-hurkok közvetlenül befolyásolják az onkogenezishez vezető mutagenezist és kromoszóma-instabilitást. Az R-hurkok kimutatására és genetikai vagy kémiai perturbációjára alkalmas módszerek az elmúlt időben folyamatosan fejlődtek, ami lehetőséget nyújthat az R-hurkok rákos sejtekben való szabályozására is. Fontos tudnunk, hogy a rákos sejtek R-hurok szint változása pusztán a sejtranszformáció tünete vagy a rákos fenotípus tényleges mozgatórugója, hogy el lehessen dönteni, hogy terápiás célzásuknál milyen megközelítés alkalmazható. Amennyiben a rákban az R-hurkok felhalmozódása szenzitív sejtállapotot tükröz, akkor az R-hurkok fokozása terápiás előnyökhöz vezethet. Ugyanakkor az R-hurkok globális vagy bizonyos típusú R-hurkok (például telomer R-hurkok) gátlása is terápiás eszköz lehet (Wells et al., 2019). Jelenleg nyitott kérdés, hogy melyik út lesz használható a rákterápiák terén.

A humán RNS-DNS hibrid kötő fehérjét vizsgáló farmakogenomikai metaanalízisünk megerősíti az R-hurok gének asszociációját a tumorgenezissel és a lehetséges tumorterápiák felé irányítják a figyelmet. Humánspecifikus R-hurok regulátor fehérjékkel végzett farmakogenomikai vizsgálatainkban megmutattuk, hogy R-hurok regulátorok expressziós szintje kihasználható a rákos sejtek kemoterápiás kezelésekkal szembeni érzékenyétére. Tehát az R-hurok gének expressziós szintjének modulálása befolyásolhatja a rákellenes gyógyszeres kezelésekre adott klinikai válaszokat, és ezek az expressziós változások felhasználhatók azon betegcsoportok meghatározására, akik a legnagyobb valószínűséggel reagálnak jól a terápiára. Emellett számos olyan tumor típust azonosítottunk, amely szignifikáns R-hurok regulátor-függő túlélés asszociációt mutatott, vagyis az R-hurok regulátorokat magasan expresszáló és az alacsonyan expresszáló betegcsoportok túlélési esélyei szignifikánsan elváltak egymástól.

A feltárt farmakogenomikai kölcsönhatások alapján úgy gondoljuk, hogy az R-hurkok és az R-hurok kötő fehérjék releváns új epigenetikai markerek és terápiás célpontok lehetnek több rákos megbetegedésben. Eredményeink egyelőre hipotézis szintjén állnak, természetesen *in vitro* és

in vivo kísérleteket igényel a validálásuk. Az azonosított összefüggések további vizsgálata reményeink szerint javítja a gyógyszerek és kombinációs terápiák hatékonyságát.

A potenciális tumorterápiás célpontok bővítéséhez kifejlesztettük a DRIP-BC-seq módszert, amivel lehetőségünk nyílt eddig ismeretlen R-hurok szabályozó géneket azonosítani. Az epi-ID gendelációs élesztő könyvtár ~4300 mutáns törzse közül 110 törzsben a vizsgált genomi régió - bárkód ~10 kb környezetében R-hurok szint növekedést, míg 89 mutánsban csökkenést tapasztaltunk. A szűrő módszerek nagyfokú bizonytalansága miatt az eredmények megerősítése validációs kísérleteket igényel. Erre a feladatra bevezettük a spike-in DRIP-seq technikát, melyben fragmentált *E. coli* DNS-t használunk belső kontrollként az immunprecipitáció során, a minták pontosabb összehasonlítása érdekében. 11 élesztő mutánst választottunk ki validálásra, melyekben a DRIP-BC-seq alapján nőtt az R-hurok mennyisége a vizsgált genomi régió körül és a gének mitokondriális funkcióval rendelkeznek. A 11 mutáns spike-in DRIP-seq eredménye, 8 törzsben megerősítette, hogy a DRIP-BC-seq-el vizsgált régió környékén magasabb az R-hurok szint a vad típusú törzshöz képest a mutáns törzsekben (*ung1Δ*, *rpo41Δ*, *oye2Δ*, *pet20Δ*, *met7Δ*, *gas1Δ*, *mgm101Δ*, *mss116Δ*), 3 törzs (*exo5Δ*, *mgm1Δ*, *dss1Δ*) esetén ellentétes eredményt kaptunk (29. ábra). Ehhez képest a teljes genomot tekintve pont az *exo5Δ*, *dss1Δ* mutánsokban jelentős R-hurok dúsulás tapasztalható és bár kisebb mértékben, de az *mgm1Δ* törzsben is nőtt az R-hurok száma (3. táblázat). Továbbá olyan mutánsokban melyekben a DRIP-BC-seq-el vizsgált bárkód régió környékén megnőtt az R-hurok szintje, globálisan épp ellenkezőleg nagymértékű csökkenést figyeltünk meg (*ung1Δ*, *rpo41Δ*, *oye2Δ*, *met7Δ*, *gas1Δ*), ezek közül is a legnagyobb eltérést az *rpo41Δ* és *met7Δ* mutánsoknál detektáltunk (3. táblázat). Az mRNA-seq adatok alapján a *met7Δ* és *dss1Δ* mutánsok esetén egyértelmű összefüggést találtunk a transzpozonokkal kapcsolatos gének expressziója és a globális R-hurok szint között. Ehhez hasonlóan a *dss1Δ* és *rpo41Δ* mutánsoknál a riboszómával, ribonukleoprotein komplexszel kapcsolatos gének expressziója állt jelentős összhangban az R-hurok szint változással. Eredményeink alapján mind a 11 vizsgált gendeláció hatással van az R-hurok előfordulására. Legérdekesebbnek a MET7, RPO41 és DSS1 gén mutánsok eredményeit találtuk. A MET7 és RPO41 gének úgy tűnik elősegítik az R-hurok kialakulását és/vagy stabilizálását, míg a DSS1 gén feltételezhetően csökkenti az R-hurok szintjét a DRIP-seq és mRNA-seq eredmények alapján.

Egyre több bizonyíték utal arra, hogy az R-hurok részt vesznek a kromatin háromdimenziós szerkezetének szabályozásában. Biokémiai jellemzőik és genetikai szabályozásuk azonban továbbra sem ismert. A 4C-BC-seq technika kifejlesztésével, a 4C-BC-seq és DRIP-BC-seq

eredményeinek összevetésével és további kísérletek elvégzésével lehetőségünk nyílik jobban megérteni, hogy az R-hurkoknak milyen szerepük van a kromatin térszerkezetének alakulásában. Ezen kísérletek validációjához Magyarországon elsőként bevezettük a Hi-C háromdimenziós kromatin szerkezet vizsgáló módszert. A Hi-C, a 4C-BC-seq-hez hasonlóan, sok enzimatikus lépésből álló labormunkát és bonyolult bioinformatikai elemzést igényel. A Hi-C módszerrel *Arabidopsis thaliana* modellnövényen vizsgáltuk az NDX transzkripció faktor kromatin szerkezetre gyakorolt hatását. Eredményeink szerint NDX hiányában az intrakromoszómális kontaktusok száma csökken, míg az interkromoszómális kontaktusoké növekszik. Az eredmények alapján az NDX hiánya elősegíti a 3D kromatin kölcsönhatások létrejöttét a kromocentereken és transzkripciósan csendes heterokromatinon keresztül.

Legfőbb eredményeink: rávilágítottunk, hogy az R-hurkokat szabályozó gének számos daganat esetén biomarkerként és terápiás célpontként hasznosíthatók, továbbá módszer fejlesztéseinknek köszönhetően növeltük a potenciálisan R-hurok/kromatin-hurok szabályozó gének listáját, miáltal új utak nyílnak az R-hurok kutatás és az epigenetikai daganatterápiák területén.

5. Összefoglalás

PhD munkám középpontjában az R-hurkok és kromatin hurkok vizsgálata állt. Ennek keretén belül farmakogenetikai metaanalízissel vizsgáltuk az R-hurkok szerepét a daganat terápiában. Kifejlesztettünk két új módszert (DRIP-BC-seq, 4C-BC-seq), melyek R-hurkokat, illetve kromatin hurkokat szabályozó gének azonosítására szolgálnak. Továbbá Hi-C módszerrel vizsgáltuk *Arabidopsis thaliana* modellnövényben az NDX gén hatását a genom térbeli konformációjára.

A farmakogenomikai elemzések eredményei arra utalnak, hogy a rákos sejtekben zajló R-hurok képződési folyamatok biomarkerként, terápiás célpontként hasznosíthatók, valamint bizonyos daganatok kemoterápiás kezelésekkel szembeni érzékennyé tételére használhatók. A feltárt összefüggések új utakat kínálnak az epigenetikai terápiákhoz, amelyek a daganatok R-hurok szintjének módosításán alapulnak.

A barcode-olt élesztő géndeléciós könyvtáron végrehajtott, DRIP-BC-seq-nek elnevezett R-hurok szabályozó gének azonosítására kifejlesztett módszerrel számos potenciális R-hurok regulátor gént azonosítottunk. A 11 gén közül melyeket kiválasztottunk validálásra, öt mutánsnál - *exo5Δ*, *pet20Δ*, *dss1Δ*, *mgm1Δ*, *mss116Δ* - melyek a DRIP-BC-seq alapján R-hurok növekedést mutattak, a DRIP-seq össz peak számát tekintve is nagymértékű globális R-hurok növekedést detektáltunk. Az mRNA-seq analízis alapján három gén esetében - MET7, DSS1, RPO41 - egyértelmű összefüggést találtunk a gén deléciója és az R-hurkok mennyiségi eltérése között.

A kromatin konformáció szabályozó gének feltérképezésére fejlesztett 4C-BC-seq módszerrel reményeink szerint sikerül eddig még nem ismert genomkonformációval kapcsolatos géneket azonosítani. Továbbá, amennyiben a DRIP-BC-seq-nek és 4C-BC-seq-nek lesznek közös találatai, az R-hurkok kromatinszerkezet szabályozásra gyakorolt hatásának a megértéséhez is közelebb kerülhetünk.

A Hi-C módszer laborunkba való bevezetésével lehetőségünk nyílt teljes genom szintjén vizsgálni a genom háromdimenziós szerkezetét. Az *ndx1-4* mutáns és vad típusú *Arabidopsis thaliana* modellnövényen elvégzett Hi-C kísérlet alapján az NDX globális genom átrendeződést okoz. Az intrakromoszómális kontaktusok csökkennek NDX hiányában, míg az interkromoszómális kontaktusok általában növekednek. Megállapítottuk, hogy az NDX távoli kromatin kölcsönhatásokat mediál kromocenterek és transzkripciósan csendes kromatinon keresztül.

6. Referenciák

- Aguilera, A., & Gómez-González, B. (2017). DNA–RNA hybrids: The risks of DNA breakage during transcription. *Nature Structural & Molecular Biology*, *24*(5), 439–443. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3395>
- Arab, K., Karaulanov, E., Musheev, M., Trnka, P., Schäfer, A., Grummt, I., & Niehrs, C. (2019). GADD45A binds R-loops and recruits TET1 to CpG island promoters. *Nature Genetics*, *51*(2), 217–223. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0306-6>
- Arora, R., Lee, Y., Wischniewski, H., Brun, C. M., Schwarz, T., & Azzalin, C. M. (2014). RNaseH1 regulates TERRA-telomeric DNA hybrids and telomere maintenance in ALT tumour cells. *Nature Communications*, *5*(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms6220>
- Aymard, F., Bugler, B., Schmidt, C. K., Guillou, E., Caron, P., Briois, S., Iacovoni, J. S., Daburon, V., Miller, K. M., Jackson, S. P., & Legube, G. (2014). Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nature Structural & Molecular Biology*, *21*(4), 366–374. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2796>
- Barroso, S., Herrera-Moyano, E., Muñoz, S., García-Rubio, M., Gómez-González, B., & Aguilera, A. (2019). The DNA damage response acts as a safeguard against harmful DNA–RNA hybrids of different origins. *EMBO Reports*, *20*(9). <https://doi.org/10.15252/embr.201847250>
- Becherel, O. J., Sun, J., Yeo, A. J., Nayler, S., Fogel, B. L., Gao, F., Coppola, G., Criscuolo, C., De Michele, G., Wolvetang, E., & Lavin, M. F. (2015). A new model to study neurodegeneration in ataxia oculomotor apraxia type 2. *Human Molecular Genetics*, *24*(20), 5759–5774. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv296>
- Becherel, O. J., Yeo, A. J., Stellati, A., Heng, E. Y. H., Luff, J., Suraweera, A. M., Woods, R., Fleming, J., Carrie, D., McKinney, K., Xu, X., Deng, C., & Lavin, M. F. (2013). Senataxin plays an essential role with DNA damage response proteins in meiotic recombination and gene silencing. *PLoS Genetics*, *9*(4), e1003435. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003435>
- Bhatia, V., Barroso, S. I., García-Rubio, M. L., Tumini, E., Herrera-Moyano, E., & Aguilera, A. (2014). BRCA2 prevents R-loop accumulation and associates with TREX-2 mRNA export factor PCID2. *Nature*, *511*(7509), 362–365. <https://doi.org/10.1038/nature13374>
- Boguslawski, S. J., Smith, D. E., Michalak, M. A., Mickelson, K. E., Yehle, C. O., Patterson, W. L., & Carrico, R. J. (1986). Characterization of monoclonal antibody to DNA · RNA and its application to immunodetection of hybrids. *Journal of Immunological Methods*, *89*(1), 123–130. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90040-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90040-2)
- Chédin, F., Hartono, S. R., Sanz, L. A., & Vanoosthuyse, V. (2021). Best practices for the visualization, mapping, and manipulation of R-loops. *The EMBO Journal*, *40*(4). <https://doi.org/10.15252/embj.2020106394>
- Chen, L., Chen, J.-Y., Huang, Y.-J., Gu, Y., Qiu, J., Qian, H., Shao, C., Zhang, X., Hu, J., Li, H., He, S., Zhou, Y., Abdel-Wahab, O., Zhang, D.-E., & Fu, X.-D. (2018). The augmented r-loop is a unifying mechanism for myelodysplastic syndromes induced by high-risk splicing factor mutations. *Molecular Cell*, *69*(3), 412–425.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.029>
- Chen, L., Chen, J.-Y., Zhang, X., Gu, Y., Xiao, R., Shao, C., Tang, P., Qian, H., Luo, D., Li, H., Zhou, Y., Zhang, D.-E., & Fu, X.-D. (2017). R-ChIP using inactive rnase H reveals dynamic coupling of r-loops with transcriptional pausing at gene promoters. *Molecular Cell*, *68*(4), 745–757.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.008>
- Colak, D., Zaninovic, N., Cohen, M. S., Rosenwaks, Z., Yang, W.-Y., Gerhardt, J., Disney, M. D., & Jaffrey, S. R. (2014). Promoter-Bound Trinucleotide Repeat mRNA Drives Epigenetic Silencing in Fragile X Syndrome. *Science*, *343*(6174), 1002–1005. <https://doi.org/10.1126/science.1245831>
- Costantino, L., & Koshland, D. (2015). The Yin and Yang of R-loop biology. *Current Opinion in Cell Biology*, *34*, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.04.008>
- Crossley, M. P., Bocek, M., & Cimprich, K. A. (2019). R-Loops as cellular regulators and genomic threats. *Molecular Cell*, *73*(3), 398–411. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.024>
- Csorba, T., Questa, J. I., Sun, Q., & Dean, C. (2014). Antisense COOLAIR mediates the coordinated switching of chromatin states at FLC during vernalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(45),

16160–16165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419030111>

- Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Masse, E., Liu, L. F., & Crouch, R. J. (1995). Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta topA mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(8), 3526–3530. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3526>
- Dumelic, J. G., & Jaffrey, S. R. (2017). Defining the location of promoter-associated R-loops at near-nucleotide resolution using bisDRIP-seq. *ELife*, *6*. <https://doi.org/10.7554/elife.28306>
- eGTEx Project. (2017). Enhancing GTEx by bridging the gaps between genotype, gene expression, and disease. *Nature Genetics*, *49*(12), 1664–1670. <https://doi.org/10.1038/ng.3969>
- El Hage, A., Webb, S., Kerr, A., & Tollervey, D. (2014). Genome-Wide Distribution of RNA-DNA Hybrids Identifies RNase H Targets in tRNA Genes, Retrotransposons and Mitochondria. *PLoS Genetics*, *10*(10), e1004716. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004716>
- Fournier, L.-A., Kumar, A., Smith, T., Su, E., Moksa, M., Hirst, M., & Stirling, P. C. (2021). *Global prediction of candidate R-loop binding and R-loop regulatory proteins*. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/2021.08.09.454968>
- García-Muse, T., & Aguilera, A. (2019). R loops: From physiological to pathological roles. *Cell*, *179*(3), 604–618. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.055>
- García-Rubio, M. L., Pérez-Calero, C., Barroso, S. I., Tumini, E., Herrera-Moyano, E., Rosado, I. V., & Aguilera, A. (2015). The fanconi anemia pathway protects genome integrity from r-loops. *PLoS Genetics*, *11*(11), e1005674. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005674>
- Ginno, P. A., Lott, P. L., Christensen, H. C., Korf, I., & Chédin, F. (2012). R-Loop formation is a distinctive characteristic of unmethylated human cpg island promoters. *Molecular Cell*, *45*(6), 814–825. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.017>
- Glover, T. W. (2006). Common fragile sites. *Cancer Letters*, *232*(1), 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.08.032>
- Gorthi, A., Romero, J. C., Loranc, E., Cao, L., Lawrence, L. A., Goodale, E., Iniguez, A. B., Bernard, X., Masamsetti, V. P., Roston, S., Lawlor, E. R., Toretsky, J. A., Stegmaier, K., Lessnick, S. L., Chen, Y., & Bishop, A. J. R. (2018). EWS-FLI1 increases transcription to cause R-loops and block BRCA1 repair in Ewing sarcoma. *Nature*, *555*(7696), 387–391. <https://doi.org/10.1038/nature25748>
- Groh, M., & Gromak, N. (2014). Out of Balance: R-loops in human disease. *PLoS Genetics*, *10*(9), e1004630. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004630>
- Groh, M., Lufino, M. M. P., Wade-Martins, R., & Gromak, N. (2014). R-loops associated with triplet repeat expansions promote gene silencing in friedreich ataxia and fragile X syndrome. *PLoS Genetics*, *10*(5), e1004318. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004318>
- Grossman, R. L., Heath, A., Murphy, M., Patterson, M., & Wells, W. (2016). A case for data commons: Toward data science as a service. *Computing in Science & Engineering*, *18*(5), 10–20. <https://doi.org/10.1109/mcse.2016.92>
- Grunseich, C., Wang, I. X., Watts, J. A., Burdick, J. T., Guber, R. D., Zhu, Z., Bruzel, A., Lanman, T., Chen, K., Schindler, A. B., Edwards, N., Ray-Chaudhury, A., Yao, J., Lehky, T., Piszczek, G., Crain, B., Fischbeck, K. H., & Cheung, V. G. (2018). Senataxin mutation reveals how r-loops promote transcription by blocking DNA methylation at gene promoters. *Molecular Cell*, *69*(3), 426–437.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.030>
- Haeusler, A. R., Donnelly, C. J., Periz, G., Simko, E. A. J., Shaw, P. G., Kim, M.-S., Maragakis, N. J., Troncoso, J. C., Pandey, A., Sattler, R., Rothstein, J. D., & Wang, J. (2014). C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature*, *507*(7491), 195–200. <https://doi.org/10.1038/nature13124>
- Halász, L., Karányi, Z., Boros-Oláh, B., Kuik-Rózsa, T., Sipos, É., Nagy, É., Mosolygó-L, Á., Mázló, A., Rajnavölgyi, É., Halmos, G., & Székvölgyi, L. (2017). RNA-DNA hybrid (R-loop) immunoprecipitation mapping: An analytical workflow to evaluate inherent biases. *Genome Research*, *27*(6), 1063–1073. <https://doi.org/10.1101/gr.219394.116>

- Hatchi, E., Skourti-Stathaki, K., Ventz, S., Pinello, L., Yen, A., Kamieniarz-Gdula, K., Dimitrov, S., Pathania, S., McKinney, K. M., Eaton, M. L., Kellis, M., Hill, S. J., Parmigiani, G., Proudfoot, N. J., & Livingston, D. M. (2015). BRCA1 recruitment to transcriptional pause sites is required for r-loop-driven DNA damage repair. *Molecular Cell*, *57*(4), 636–647. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.011>
- Hegazy, Y. A., Fernando, C. M., & Tran, E. J. (2020). The balancing act of R-loop biology: The good, the bad, and the ugly. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(4), 905–913. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)49903-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)49903-0)
- Helmrich, A., Ballarino, M., & Tora, L. (2011). Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. *Molecular Cell*, *44*(6), 966–977. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.013>
- Jackson, B. R., Noerenberg, M., & Whitehouse, A. (2014). A novel mechanism inducing genome instability in kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infected cells. *PLoS Pathogens*, *10*(5), e1004098. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004098>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-rna-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, *337*(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- König, F., Schubert, T., & Längst, G. (2017). The monoclonal S9.6 antibody exhibits highly variable binding affinities towards different R-loop sequences. *PLOS ONE*, *12*(6), e0178875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178875>
- Li, X., & Manley, J. L. (2005). Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability. *Cell*, *122*(3), 365–378. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.008>
- Lim, Y. W., Sanz, L. A., Xu, X., Hartono, S. R., & Chédin, F. (2015). Genome-wide DNA hypomethylation and RNA:DNA Hybrid accumulation in Aicardi–Goutières syndrome. *ELife*, *4*. <https://doi.org/10.7554/elife.08007>
- Loomis, E. W., Sanz, L. A., Chédin, F., & Hagerman, P. J. (2014). Transcription-Associated r-loop formation across the human FMR1 cgg-repeat region. *PLoS Genetics*, *10*(4), e1004294. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004294>
- Malig, M., Hartono, S. R., Giapfaglione, J. M., Sanz, L. A., & Chedin, F. (2020). Ultra-deep coverage single-molecule r-loop footprinting reveals principles of r-loop formation. *Journal of Molecular Biology*, *432*(7), 2271–2288. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.02.014>
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(3), 220–228. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>
- Niehrs, C., & Luke, B. (2020). Regulatory R-loops as facilitators of gene expression and genome stability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(3), 167–178. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0206-3>
- Petropavlovskiy, A. A., Tauro, M. G., Lajoie, P., & Duennwald, M. L. (2020). A quantitative imaging-based protocol for yeast growth and survival on agar plates. *STAR Protocols*, *1*(3), 100182. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100182>
- Phillips, D. D., Garboczi, D. N., Singh, K., Hu, Z., Leppla, S. H., & Leysath, C. E. (2013). The sub-nanomolar binding of DNA-RNA hybrids by the single-chain Fv fragment of antibody S9.6. *Journal of Molecular Recognition*, *26*(8), 376–381. <https://doi.org/10.1002/jmr.2284>
- Pohjoismäki, J. L. O., Holmes, J. B., Wood, S. R., Yang, M.-Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Bailey, L. J., Cluett, T. J., Goffart, S., Willcox, S., Rigby, R. E., Jackson, A. P., Spelbrink, J. N., Griffith, J. D., Crouch, R. J., Jacobs, H. T., & Holt, I. J. (2010). Mammalian mitochondrial DNA replication intermediates are essentially duplex but contain extensive tracts of RNA/DNA hybrid. *Journal of Molecular Biology*, *397*(5), 1144–1155. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.02.029>
- Powell, W. T., Coulson, R. L., Gonzales, M. L., Crary, F. K., Wong, S. S., Adams, S., Ach, R. A., Tsang, P., Yamada, N. A., Yasui, D. H., Chédin, F., & LaSalle, J. M. (2013). R-loop formation at Snord116 mediates topotecan inhibition of Ube3a-antisense and allele-specific chromatin decondensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(34), 13938–13943. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305426110>

- Qin, Y., Conley, A. P., Grimm, E. A., & Roszik, J. (2017). A tool for discovering drug sensitivity and gene expression associations in cancer cells. *PLOS ONE*, *12*(4), e0176763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176763>
- Reddy, K., Schmidt, M. H. M., Geist, J. M., Thakkar, N. P., Panigrahi, G. B., Wang, Y.-H., & Pearson, C. E. (2014). Processing of double-R-loops in (CAG)_n(CTG)_n and C9orf72 (GGGGCC)_n(GGCCCC)_n repeats causes instability. *Nucleic Acids Research*, *42*(16), 10473–10487. <https://doi.org/10.1093/nar/gku658>
- Repana, D., Nulsen, J., Dressler, L., Bortolomeazzi, M., Venkata, S. K., Tourna, A., Yakovleva, A., Palmieri, T., & Ciccarelli, F. D. (2019). The Network of Cancer Genes (NCG): A comprehensive catalogue of known and candidate cancer genes from cancer sequencing screens. *Genome Biology*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1612-0>
- Roy, R., Chun, J., & Powell, S. N. (2012). BRCA1 and BRCA2: Different roles in a common pathway of genome protection. *Nature Reviews Cancer*, *12*(1), 68–78. <https://doi.org/10.1038/nrc3181>
- Sagie, S., Toubiana, S., Hartono, S. R., Katzir, H., Tzur-Gilat, A., Havazelet, S., Francastel, C., Velasco, G., Chédin, F., & Selig, S. (2017). Telomeres in ICF syndrome cells are vulnerable to DNA damage due to elevated DNA:RNA Hybrids. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms14015>
- Santos-Pereira, J. M., & Aguilera, A. (2015). R loops: New modulators of genome dynamics and function. *Nature Reviews Genetics*, *16*(10), 583–597. <https://doi.org/10.1038/nrg3961>
- Sanz, L. A., Hartono, S. R., Lim, Y. W., Steyaert, S., Rajpurkar, A., Ginno, P. A., Xu, X., & Chédin, F. (2016). Prevalent, dynamic, and conserved r-loop structures associate with specific epigenomic signatures in mammals. *Molecular Cell*, *63*(1), 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.032>
- Schwab, R. A., Nieminuszczy, J., Shah, F., Langton, J., Lopez Martinez, D., Liang, C.-C., Cohn, M. A., Gibbons, R. J., Deans, A. J., & Niedzwiedz, W. (2015). The fanconi anemia pathway maintains genome stability by coordinating replication and transcription. *Molecular Cell*, *60*(3), 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.09.012>
- Shivji, M. K. K., Renaudin, X., Williams, C. H., & Venkitaraman, A. R. (2018). BRCA2 regulates transcription elongation by RNA polymerase II to prevent r-loop accumulation. *Cell Reports*, *22*(4), 1031–1039. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.086>
- Skourti-Stathaki, K., Kamieniarz-Gdula, K., & Proudfoot, N. J. (2014). R-loops induce repressive chromatin marks over mammalian gene terminators. *Nature*, *516*(7531), 436–439. <https://doi.org/10.1038/nature13787>
- Skourti-Stathaki, K., & Proudfoot, N. J. (2014). A double-edged sword: R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression. *Genes & Development*, *28*(13), 1384–1396. <https://doi.org/10.1101/gad.242990.114>
- Skourti-Stathaki, K., Proudfoot, N. J., & Gromak, N. (2011). Human senataxin resolves RNA/DNA hybrids formed at transcriptional pause sites to promote xrn2-dependent termination. *Molecular Cell*, *42*(6), 794–805. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.026>
- Sollier, J., & Cimprich, K. A. (2015). Breaking bad: R-loops and genome integrity. *Trends in Cell Biology*, *25*(9), 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.05.003>
- Sollier, J., Stork, C. T., García-Rubio, M. L., Paulsen, R. D., Aguilera, A., & Cimprich, K. A. (2014). Transcription-Coupled nucleotide excision repair factors promote r-loop-induced genome instability. *Molecular Cell*, *56*(6), 777–785. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.020>
- Stork, C. T., Bocek, M., Crossley, M. P., Sollier, J., Sanz, L. A., Chédin, F., Swigut, T., & Cimprich, K. A. (2016). Co-transcriptional R-loops are the main cause of estrogen-induced DNA damage. *ELife*, *5*. <https://doi.org/10.7554/elife.17548>
- Sun, Q., Csorba, T., Skourti-Stathaki, K., Proudfoot, N. J., & Dean, C. (2013). R-Loop Stabilization Represses Antisense Transcription at the Arabidopsis FLC Locus. *Science*, *340*(6132), 619–621. <https://doi.org/10.1126/science.1234848>
- Tan, S. L. W., Chadha, S., Liu, Y., Gabasova, E., Perera, D., Ahmed, K., Constantinou, S., Renaudin, X., Lee, M., Aebersold, R., & Venkitaraman, A. R. (2017). A class of environmental and endogenous toxins induces BRCA2 haploinsufficiency and genome instability. *Cell*, *169*(6), 1105–1118.e15.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.010>

- Thomas, M., White, R. L., & Davis, R. W. (1976). Hybridization of RNA to double-stranded DNA: Formation of R-loops. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(7), 2294–2298. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.7.2294>
- Vanoosthuysse, V. (2018). Strengths and weaknesses of the current strategies to map and characterize r-loops. *Non-Coding RNA*, 4(2), 9. <https://doi.org/10.3390/ncrna4020009>
- Wahba, L., Costantino, L., Tan, F. J., Zimmer, A., & Koshland, D. (2016). S1-DRIP-seq identifies high expression and polyA tracts as major contributors to R-loop formation. *Genes & Development*, 30(11), 1327–1338. <https://doi.org/10.1101/gad.280834.116>
- Wang, I. X., Grunseich, C., Fox, J., Burdick, J., Zhu, Z., Ravazian, N., Hafner, M., & Cheung, V. G. (2018). Human proteins that interact with RNA/DNA hybrids. *Genome Research*, 28(9), 1405–1414. <https://doi.org/10.1101/gr.237362.118>
- Weinstein, J. N., Collisson, E. A., Mills, G. B., Shaw, K. R. M., Ozenberger, B. A., Ellrott, K., Shmulevich, I., Sander, C., & Stuart, J. M. (2013). The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nature Genetics*, 45(10), 1113–1120. <https://doi.org/10.1038/ng.2764>
- Wells, J. P., White, J., & Stirling, P. C. (2019). R loops and their composite cancer connections. *Trends in Cancer*, 5(10), 619–631. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.08.006>
- Westover, K., Bushnell, D., & Kornberg, R. (2004). Structural basis of transcription: nucleotide selection by rotation in the RNA polymerase II active center. *Cell*, 119(7), 1055. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)01206-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)01206-1)
- Wu, T., Nance, J., Chu, F., & Fazzio, T. G. (2021). Characterization of R-Loop-Interacting Proteins in Embryonic Stem Cells Reveals Roles in rRNA Processing and Gene Expression. *Molecular & Cellular Proteomics*, 20, 100142. <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2021.100142>
- Xu, B., & Clayton, D. A. (1996). RNA-DNA hybrid formation at the human mitochondrial heavy-strand origin ceases at replication start sites: An implication for RNA-DNA hybrids serving as primers. *The EMBO Journal*, 15(12), 3135–3143. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00676.x>
- Xu, W., Xu, H., Li, K., Fan, Y., Liu, Y., Yang, X., & Sun, Q. (2017). The R-loop is a common chromatin feature of the Arabidopsis genome. *Nature Plants*, 3(9), 704–714. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0004-x>
- Yang, W., Lightfoot, H., Bignell, G., Behan, F., Cokelear, T., Haber, D., Engelman, J., Stratton, M., Benes, C., McDermott, U., & Garnett, M. (2016). Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC): a resource for biomarker discovery in cancer cells. *European Journal of Cancer*, 69, S82. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(16\)32839-8](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(16)32839-8)
- Yang, Y., McBride, K. M., Hensley, S., Lu, Y., Chedin, F., & Bedford, M. T. (2014). Arginine methylation facilitates the recruitment of TOP3B to chromatin to prevent R loop accumulation. *Molecular Cell*, 53(3), 484–497. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.011>
- Yu, K., Chedin, F., Hsieh, C.-L., Wilson, T. E., & Lieber, M. R. (2003). R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nature Immunology*, 4(5), 442–451. <https://doi.org/10.1038/ni919>
- Zeller, P., Padeken, J., van Schendel, R., Kalck, V., Tijsterman, M., & Gasser, S. M. (2016). Histone H3K9 methylation is dispensable for *Caenorhabditis elegans* development but suppresses RNA:DNA Hybrid-associated repeat instability. *Nature Genetics*, 48(11), 1385–1395. <https://doi.org/10.1038/ng.3672>
- Zhang, X., Chiang, H.-C., Wang, Y., Zhang, C., Smith, S., Zhao, X., Nair, S. J., Michalek, J., Jatoi, I., Lautner, M., Oliver, B., Wang, H., Petit, A., Soler, T., Brunet, J., Mateo, F., Angel Pujana, M., Poggi, E., Chaldeckas, K., ... Li, R. (2017). Attenuation of RNA polymerase II pausing mitigates BRCA1-associated R-loop accumulation and tumorigenesis. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms15908>
- Zhu, Q., Hoong, N., Aslanian, A., Hara, T., Benner, C., Heinz, S., Miga, K. H., Ke, E., Verma, S., Soroczynski, J., Yates, J. R., III, Hunter, T., & Verma, I. M. (2018). Heterochromatin-Encoded satellite rnas induce breast cancer. *Molecular Cell*, 70(5), 842–853.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.04.023>

7. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Székvölgyi Lórántnak a kifogyhatatlan türelméért, támogatásáért a PhD munkám során. Szakmai és személyes támogatása nélkül ez a munka nem valósult volna meg.

Szeretném megköszönni a Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola korábbi és jelenlegi vezetőjének Prof. Dr. Fésüs Lászlónak, Prof. Dr. Tózsér Józsefnek és Prof. Dr. Balogh Istvánnak, hogy PhD tanulmányaimat a doktori iskola keretein belül végezhettem.

Köszönöm a Lendület Genomszerkezet és Rekombináció Kutatócsoport korábbi és jelenlegi tagjainak (Nagy Éva, Fillér Csaba, Horváth Adrienn, Dr. Szabóné Varga Dóra, Feró Orsolya, Karányi Zsolt, Dr. Hetey Szabolcs, Dr. Halász László, Dr. Mosolygó-Lukács Ágnes, Dr. Nagy Dénes, Tóth Erzsébet, Bukó Zsanett, Fürtös Ibolya) a labormunkák, csoport megbeszélések során nyújtott segítségüket és hogy színesebbé tették a mindennapokat is.

Nagy köszönettel tartozok a kutatáshoz kapcsolódó bioinformatikai elemzések elvégzéséért Dr. Roszik Jánosnak (The University of Texas MD Anderson Cancer Center), Karányi Zsoltnak és Feró Orsolyának.

Köszönöm a társszerzőimnek nagyon színvonalas munkájukat, miáltal a tudományosan legelismertebb lapokban sikerült publikálnunk közös munkáinkat.

Hálásan köszönöm Dr. Ozgyin Lillának, hogy beavatott a 4C-seq rejtjelmeibe, megosztotta gyakorlati tapasztalatait a technikával kapcsolatban.

Továbbá köszönettel tartozom Dr. Póliska Szilárdnak és Mátyás Erzsébetnek a szekvenálásokban nyújtott segítségükért, munkájukért.

Nem utolsó sorban hálás köszönettel tartozom családomnak, férjemnek, kislányomnak, szüleimnek, barátaimnak, hogy mindvégig bátorítottak, támogattak az úton.

8. Közlemények listája



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/404/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kissné Boros-Oláh Beáta
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10071902

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Karányi, Z., Mosolygó, Á., Feró, O., Horváth, A., **Boros-Oláh, B.**, Nagy, É., Hetey, S., Holb, I., Szaker, H., Miskei, M., Csorba, T., Székvölgyi, L.: NODULIN HOMEBOX is required for heterochromatin homeostasis in Arabidopsis.
Nat Comms. 13, 1-20, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-022-32709-y>
IF: 17.694 (2021)
2. **Boros-Oláh, B.**, Dobos, N., Hornyák, L., Szabó, Z., Karányi, Z., Halmos, G., Roszik, J., Székvölgyi, L.: Drugging the R-loop interactome: RNA-DNA hybrid binding proteins as targets for cancer therapy.
DNA Repair. 84, 1-10, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102642>
IF: 3.339

További közlemények

3. Karányi, Z., Halász, L., Acquaviva, L., Jonás, D., Hetey, S., **Boros-Oláh, B.**, Peng, F., Chen, D., Klein, F., Géli, V., Székvölgyi, L.: Nuclear dynamics of the Set1C subunit Spp1 prepares meiotic recombination sites for break formation.
J. Cell Biol. 217 (10), 3398-3415, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201712122>
IF: 8.891
4. Hetey, S., **Boros-Oláh, B.**, Kuik-Rózsa, T., Li, Q., Karányi, Z., Szabó, Z., Roszik, J., Szalóki, N., Vámosi, G., Tóth, K. Á., Székvölgyi, L.: Biophysical characterization of histone H3.3 K27M point mutation.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 490 (3), 868-875, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.133>
IF: 2.559





5. Halász, L., Karányi, Z., **Boros-Oláh, B.**, Kuik-Rózsa, T., Sipos, É., Nagy, É., Mosolygó, Á., Türk-Mázió, A., Rajnavölgyi, É., Halmos, G., Székvölgyi, L.: RNA-DNA hybrid (R-loop) immunoprecipitation mapping: an analytical workflow to evaluate inherent biases. *Genome Res.* 27, 1063-1073, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/gr.219394.116>
IF: 10.101
6. Szénási, T., Kénesi, E., Nagy, A., Molnár, A., Bálint, B. L., Zvara, Á., Csabai, Z., Deák, F., **Boros-Oláh, B.**, Mátés, L., Nagy, L., Puskás, L. G., Kiss, I.: Hmgb1 can facilitate activation of the matrilin-1 gene promoter by Sox9 and L-Sox5/Sox6 in early steps of chondrogenesis. *Biochim. Biophys. Acta. Gene. Regul. Mech.* 1829 (10), 1075-1091, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.07.004>
IF: 5.44
7. Franyó, D., **Boros-Oláh, B.**, Ozgyin, L., Bálint, B. L.: Befolyásolja-e az életmód génjeink működését?: az epigenetikai kutatások irányvonalai és eredményei. *LAM KID.* 2 (1), 37-42, 2012.

A közzétett folyóiratok összesített impakt faktora: 48,024

A közzétett folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 21,033

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, 2022.08.30.

