

# **DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

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

**Kissné Boros-Oláh Beáta**

Témavezető: Dr. Székvölgyi Lóránt



**Debreceni Egyetem**

**Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola**

**Debrecen, 2024**

# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
1. Bevezetés.....	6
1.1. Bevezetés az R-hurkok biológiájába .....	6
1.1.1. Az R-hurok felfedezése.....	6
1.1.2. Az R-hurok képződése .....	7
1.2. Az R-hurok fiziológiai szerepe.....	10
1.2.1. Az R-hurok szerepe a génexpresszióban és a kromatinszerkezet változásban .....	11
1.2.2. Az R-hurok szerepe a DNS hibajavításban.....	12
1.3. R-hurok, mint genom instabilitást okozó struktúra .....	15
1.4. Az R-hurok kapcsolata humán betegségekkel.....	16
1.5. R-hurok vizsgáló módszerek .....	20
1.6. R-hurok szabályozó gének azonosítása .....	23
2. Célkitűzés.....	25
3. Anyagok és módszerek.....	26
3.1. Daganatos betegek génexpresszió és túlélés asszociációjának analízise.....	26
3.2. Sejtvonalak génexpresszió és drogszenzitivitás asszociációjának analízise .....	28
3.3. DRIP-BC-seq.....	28
3.3.1. Epi-ID library.....	29
3.3.2. Élesztők növesztése.....	30
3.3.3. DRIP .....	30
3.3.4. Bárkódok amplifikációja PCR-el.....	31
3.3.5. Könyvtárkészítés, szekvenálás.....	32
3.4. Teljes genomi DRIP-seq.....	33
3.5. Élesztő növekedési vizsgálat - spot assay.....	36
3.6. Az epi-ID törzsek génexpressziós vizsgálata (mRNS-seq) .....	36
3.6.1. RNS izolálás.....	37
3.6.2. mRNS szekvenálás, analízis .....	37
3.7. 4C-BC-seq .....	38
3.8. Arabidopsis Hi-C .....	41
4. Eredmények.....	43
4.1. R-hurok szabályozó gének farmakogenomikai vizsgálata - fókuszban a rákterápia.....	43
4.1.1. Daganatos betegek túlélése és a daganatok génexpressziója közötti összefüggés analízise.....	44

4.1.2. Sejtvonalak génexpressziója és a drogszenzitivitas közötti összefüggés analízise.	49
4.1.3. Túlélés és drog kölcsönhatások asszociációja .....	52
4.2. R-hurok szabályozó gének azonosítása élesztő gén deléciók könyvtár segítségével. ...	56
4.2.1. DRIP-BC-seq módszer beállítása .....	56
4.2.2. DRIP-BC-seq screen találatai .....	59
4.2.3. DRIP-BC-seq találatainak validálása teljes genom DRIP-seq-el és QPCR-el .....	62
4.2.4. Ígéretesnek tűnő DRIP-BC-seq találatok génexpressziós analízise.....	66
4.3 Gén deléciók hatásának vizsgálata a genom háromdimenziós szerkezetére .....	68
4.4. A teljes genom 3D interakciós profiljának vizsgálata genomkonformáció leképezéssel (Hi-C).....	72
5. Diskusszió.....	75
6. Felhasznált irodalom .....	78
7. Összefoglalás.....	86
8. Summary .....	87
9. Függelék .....	88
9.1. A génexpresszió és drogválasz asszociáció analízisben alkalmazott sejtvonalak.....	88
9.2. A gyógyszerérzékenység analízisben vizsgált drogok .....	92
9.3. DRIP-BC-seq találatainak funkcionális annotálása DAVID adatbázissal.....	101
10. Köszönetnyilvánítás .....	104
11. Közlemények listája .....	105

## Rövidítések jegyzéke

<b>AGS</b>	Aicardi-Goutières syndrome
<b>AID</b>	activation-induced cytidine deaminase (aktiváció által kiváltott citidin-deamináz)
<b>AIDS</b>	Acquired Immune Deficiency Syndrome (szerzett immunhiányos tünetegyüttes)
<b>ALS4</b>	amyotrophic lateral sclerosis type 4
<b>ALT</b>	alternative lengthening of telomeres (telomerek alternatív hosszabbítása)
<b>AOA2</b>	ataxia with oculomotor apraxia type 2
<b>APOBEC</b>	apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide-like (apolipoprotein B mRNS-szerkesztő katalitikus polipeptid)
<b>AQR</b>	aquarius intron-binding spliceosomal factor
<b>AtNDX</b>	Arabidopsis thaliana - Nodulin homeobox
<b>ATR</b>	ataxia telangiectasia and Rad3-related (ataxia teleangiectázia és RAD3 kapcsolt)
<b>AU</b>	adenin-uracil
<b>BSA</b>	bovine serum albumin (borjú szérum albumin)
<b>C. elegans</b>	Caenorhabditis elegans
<b>C9ORF72</b>	chromosome 9 open reading frame 72
<b>Cas9</b>	CRISPR-associated protein 9 (CRISPR asszociált 9-es protein)
<b>eDNS</b>	copy DNS (másolt DNS)
<b>CEN</b>	centromer
<b>CFS</b>	common fragile site (gyakori törékeny helyek)
<b>COOLAIR</b>	cold-induced antisense RNA (hideg indukált antiszensz RNS)
<b>CpG</b>	cytosine phosphate guanine
<b>CRISPR</b>	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
<b>CSB</b>	Cockayne syndrome group B
<b>DDX1</b>	DEAD-Box Helicase 1
<b>DNS</b>	dezoxiribonukleinsav
<b>DRIP</b>	DNS-RNS immunprecipitáció
<b>DRIPseq</b>	DNS-RNS immunprecipitációt követő szekvenálás
<b>DSB</b>	double strand break (DNS kettősszál törés)
<b>dsRNS</b>	dupla szálú RNS (dsRNA - double stranded RNA)
<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>EDTA</b>	ethylenediaminetetraacetic acid (etilén-diamin-tetraecetsav)
<b>FA</b>	Fanconi-anémia
<b>FANCD2</b>	Fanconi anemia, complementation group D2
<b>FANCM</b>	Fanconi anemia, complementation group M
<b>FDR</b>	false discovery rate (hamis felfedezési arány)
<b>FLC</b>	Flowering Locus C

<b>FMR1</b>	fragile X messenger ribonucleoprotein 1
<b>FPKM</b>	Fragments Per Kilobase of transcripts per Million mapped reads (a transzkriptek fragmentumainak száma 1000 bázisonként, egy millió bázispárra vetítve)
<b>FRDA</b>	Friedreich ataxia
<b>FTD</b>	frontotemporális demencia
<b>FXN</b>	frataxin
<b>FXS</b>	Fragile X Syndrome (Törékeny X szindróma)
<b>GDSC</b>	Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (adatbázis)
<b>GO</b>	Gene Ontology
<b>GTE<sub>x</sub></b>	Genotype-Tissue Expression
<b>gyrB</b>	DNS giráz B alegysége
<b>H2AK119</b>	hiszton H2A lizin 119
<b>H3K9me<sub>2/3</sub></b>	dimethylated or trimethylated histone H3 Lys9 (hiszton H3 lizin 9 di- vagy trimetiláció)
<b>HEPES</b>	hydroxyethyl-piperazineethane-sulfonic acid buffer
<b>HR</b>	homológ rekombináció
<b>IC<sub>50</sub></b>	half maximal inhibitory concentration (maximális gátlókoncentráció fele)
<b>ICF</b>	Immunodeficiency, Centromeric region instability, Facial anomalies syndrome (immunhiány, centromerikus instabilitás és arc anomáliák szindróma)
<b>IP</b>	immunprecipitáció
<b>KCl</b>	kálium-klorid
<b>KOH</b>	kálium-hidroxid
<b>MDS</b>	mielodiszpláziás szindróma
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	magnézium-klorid
<b>mRNS-seq</b>	messenger RNS szekvenálás
<b>NaAc</b>	nátrium-acetát
<b>NaCl</b>	nátrium-klorid
<b>NDX</b>	Nodulin homeobox
<b>NER</b>	nucleotide excision repair (nukleotidkivágó javítás)
<b>NHEJ</b>	non-homologous end joining (nem homológ DNS végek összekapcsolása)
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline (foszfáttal puffertelt sóoldat)
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction (polimeráz lánc reakció)
<b>PMSF</b>	phenylmethyl sulfonyl fluoride
<b>PRC1</b>	polycomb repressive complex 1
<b>PRC2</b>	polycomb repressive complex 2
<b>QPCR</b>	quantitative polymerase chain reaction (kvantitatív polimeráz láncreakció)
<b>RNAPII</b>	RNA polymerase II (RNS polimeráz II)
<b>RNáz</b>	ribonukleáz
<b>RNS</b>	ribonukleinsav

<b>RPA</b>	replication protein A (replikációs protein A)
<b>rRNS</b>	riboszómális RNS
<b>SAMHD1</b>	SAM and HD domain containing deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase 1
<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfate
<b>SETX</b>	Senataxin
<b>SNORD116</b>	small nucleolar RNAs, C/D boks 116
<b>ssDNS</b>	szimpla szálú DNS (ssDNA - single stranded DNA)
<b>TAM</b>	transcription associated mutagenesis (transzkripcióval kapcsolatos mutagenézis)
<b>TAR</b>	transformation-associated recombination (transzkripcióval kapcsolatos rekombináció)
<b>TBS</b>	tris-buffered saline (Tris-el pufferelt sóoldat)
<b>TCGA</b>	The Cancer Genome Atlas (adatbázis)
<b>TC-NER</b>	transcription-coupled nucleotide excision repair (transzkripcióhoz kapcsolt nukleotidkivágó javítás)
<b>TE puffer</b>	Tris-EDTA puffer
<b>TERRA</b>	telomeric repeat-containing RNA (ismétlődést tartalmazó telomerikus RNS)
<b>TET</b>	ten-eleven translocation (10-11 transzlokáció)
<b>topA</b>	DNS topoizomeráz 1
<b>TRD3</b>	T-cell receptor delta locus 3
<b>Tris-HCl</b>	tris-hydrochloride
<b>U2AF1</b>	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
<b>XPC</b>	xeroderma pigmentosum, complementation group C
<b>XPF</b>	xeroderma pigmentosum, complementation group F
<b>XPG1</b>	Xeroderma Pigmentosum group G 1
<b>YPD</b>	yeast extract peptone dextrose
<b>YPG</b>	yeast extract peptone glycerol
<b>γH2AX</b>	gamma H2A.X variáns hiszton (H2AX hiszton variáns Ser-139 foszforilációja)

# 1. Bevezetés

## 1.1. Bevezetés az R-hurkok biológiájába

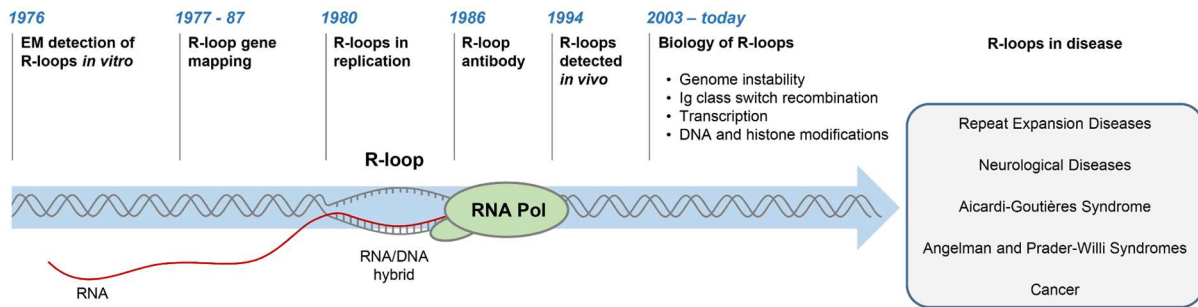
Az R-hurok egy háromszálú nukleinsav struktúra, mely egy DNS-RNS hibridből (egy RNS molekula DNS-el való komplementer bázispárosodásával létrejött duplex) és egy kiszorított szimpla szálú DNS-ből áll. R-hurkok viszonylag gyakran előfordulnak a genomban (a genom lefedettsége: élesztőben 8%, *Arabidopsis 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. Az 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 RNázH túlzott expressziója feloldotta a topA mutáns növekedési

rendellenességeit. Ezen kívül az RNázH deléciója 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. Ábra).

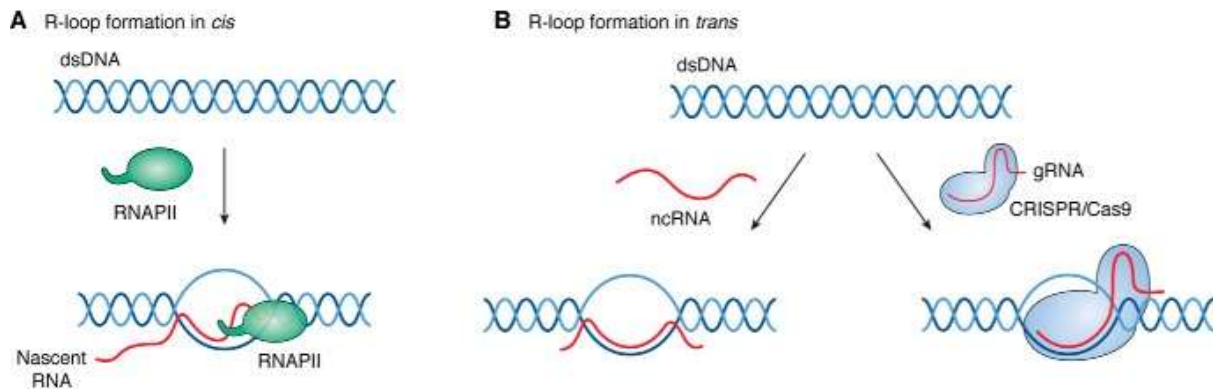


**1. Ábra** Az R-hurok kutatás főbb mérföldkövei és néhány példa az R-hurok diszfunkciójával kapcsolatos betegségekre (Groh & Gromak, 2014).

### 1.1.2. Az R-hurok képződése

Az R-hurok általában aktív gének közelében képződnek, különösen hajlamosak a promóter régiókban kialakulni. Bár DNS-RNS hibrid folyamatosan képződik az RNS-polimeráz transzkripció 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 transzkripció buborékban lévő R-hurok meghosszabbodjon (Westover et al., 2004). Ezt a fajta R-hurkot cisz R-huroknak nevezik.

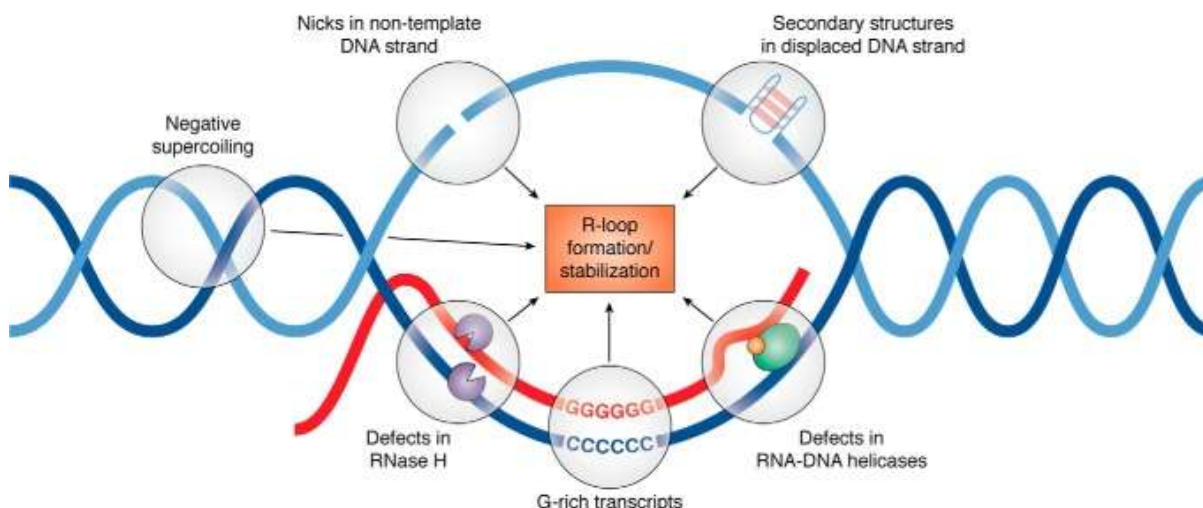
A másik típus, amikor transz módon képződik az R-hurok vagyis az RNS az átíródás helyétől távoli komplementer DNS szakaszhoz hibridizálódik. Például nem kódoló RNS-ek és a CRISPR/Cas9 proteinhez kapcsolódó guide RNS-ek képezhetnek ilyen R-hurokokat (2. Ábra).



2. Ábra R-hurok kialakulásának cisz és transz módja (Hegazy et al., 2020).

### 1.1.2.1. Az R-hurok keletkezését elősegítő tényezők

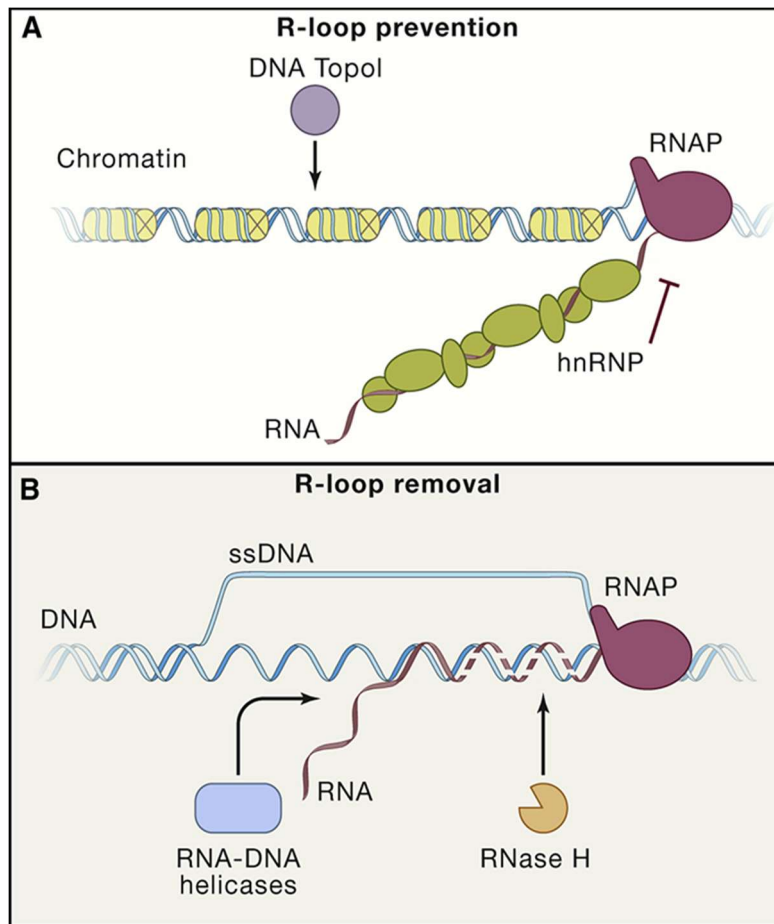
Számos faktor ismert, melyek növelik az R-hurok előfordulásának a valószínűségét. Ilyen például a guanin gazdag transzkript képződése a citozin gazdag templát DNS-ről, a képződő DNS-RNS hibrid fokozott stabilitása miatt. A DNS másodlagos szerkezete a kiszorított szimpla szálon, mint például a guanin kvadruplex vagy DNS-t kötő fehérjék szintén stabilizálhatják az R-hurok szerkezetet. A negatív superhelicitás szintén elősegítheti az R-hurok kialakulását. Az éppen átíródó géneknél a nem templát DNS számban, ha az RNS polimeráz tovább haladását követően egyszál törés (nick) alakul ki, szintén nagyobb eséllyel képződhet R-hurok. Az egyszál törés 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) (3. Ábra).



**3.Ábra R-hurkok kialakulását segítő és stabilizáló faktorok** (Hegazy et al., 2020).

### 1.1.2.2. Az R-hurok keletkezését gátló tényezők

Az R-hurkokat promotáló 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<sub>2/3</sub>) 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 (**4. Ábra**).



4. Ábra R-hurok felhalmozódást gátló faktorok (García-Muse & Aguilera, 2019).

## 1.2. Az R-hurok fiziológiai szerepe

Az R-hurok 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-hurok szerepet játszanak a centromer működésében, a pontos kromoszóma szegregációban, ami kulcsfontosságú a stabil genom fenntartásához. A centromer lokuszok R-hurokakat (CEN R-hurok) is tartalmaznak, amelyek evolúciósan konzerváltan sejtciklus-függő módon szabályozódnak. Emberi sejtekben a CEN R-hurokban a kiszorított szimpla szálú DNS-t az RPA megköti, és a DNS-károsodásra válaszadó ATR kináz 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).

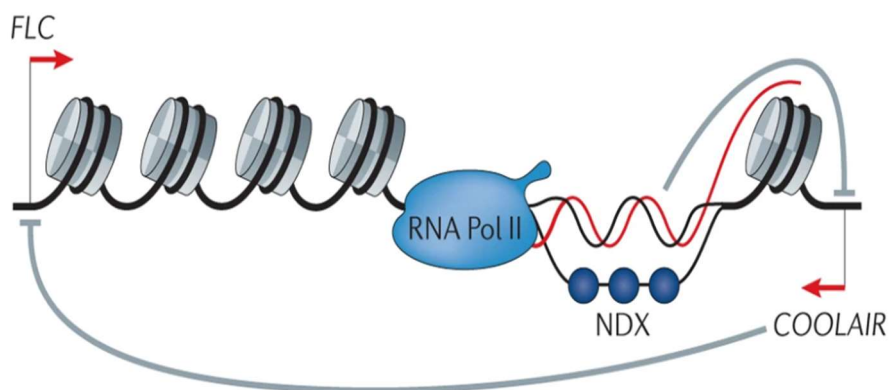
### 1.2.1. Az R-hurok szerepe a géneexpresszióban és a kromatinszerkezet változásban

Az R-hurkok szerepet játszhatnak a géneexpresszióban, erre bizonyítékkal szolgál, hogy az R-hurkok a gének promóterénél és terminációs régiójánál dúsulnak (Skourti-Stathaki & Proudfoot, 2014). A promótereknél elhelyezkedő R-hurkok a transzkripció faktorok kötődésének gátlásával a transzkripció gátlásához vezethetnek. Ugyanakkor más transzkripció 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) (5. **Ábra**).

### c Transcription activation at the *FLC* locus



**5.Ábra** Az *FLC* lókuszt szabályozása a *COOLAIR* lncRNA és *NDX* fehérje hatására (Santos-Pereira & Aguilera, 2015).

Továbbá az R-hurokok kromatin dekondenzációt válthatnak ki, de elősegíthetik a heterokromatikus állapot létrejöttét, a kromatin tömörödését is (Skourti-Stathaki et al., 2014, Castellano-Pozo et al., 2013.).

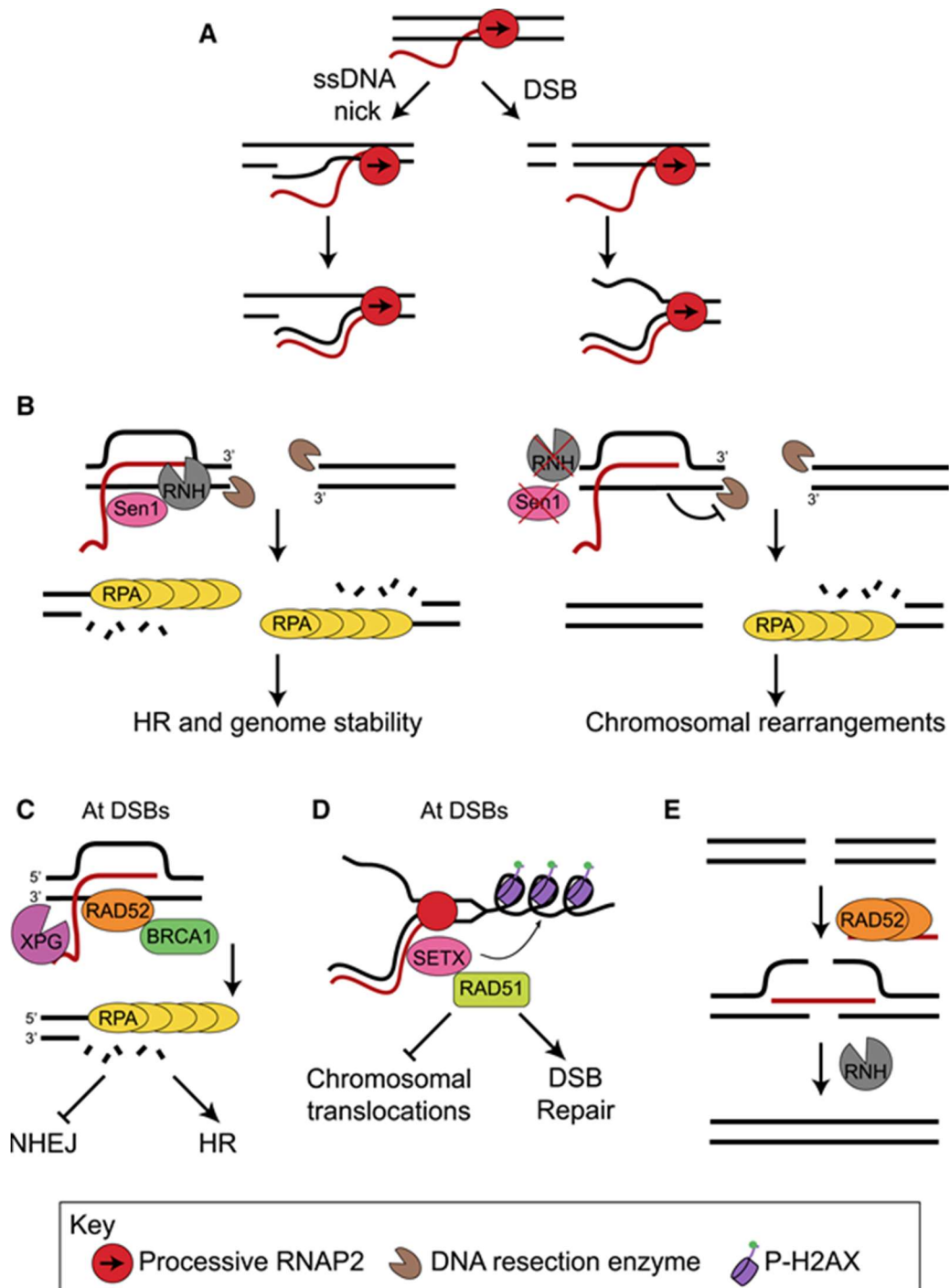
#### 1.2.2. Az R-hurok szerepe a DNS hibajavításban

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 RNázH1, az RNázH2 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) (6. Ábra).



**6. Ábra** Az R-hurkok részvétele a DNS javításban DNS törés esetén (Crossley et al., 2019)

(A) A DNS-törések, akár a ssDNS-bevágások (balra), akár a DSB-k (jobbra), szabad 3'-DNS-végeket hoznak létre, elősegítve az RNS-nek a DNS-hez való kapcsolódását és a hibridek létrejöttét. (B) Élesztőben R-hurkok képződnek a DSB-kenél, ami iniciálja a DNS javítást a homológ rekombináción keresztül. A Sen1 vagy RNázH általi R-hurok felbontás szabályozza a DNS-vég reszekció mértékét és az azt követő RPA kötődést (balra). Sen1 vagy RNázH hiányában (jobbra) az RNS-DNS hibridek fennmaradnak, blokkolva a DNS-reszekciót és az RPA-kötést, ami

*kromoszóma-átrendeződéshez vezet. (C) Az emberi sejtekben a DSB-k egy részénél, az RNS-DNS hibridek toborozzák a Rad52-t, amely tovább toborozza az XPG-t és a BRCA1-et. Az XPG által közvetített R-hurok feldolgozás elindítja a DNS-reszekciót és a HR általi javítást, és elnyomja az aberráns NHEJ-t. (D) A SETX-et a DSB-khez toborozzák, ami feloldja az RNS-DNS hibrideket az aktív géneknél. A SETX szabályozza a  $\gamma$ H2AX terjedését és a Rad51 góccok képződését, elősegíti a DSB javítását és elnyomja a kromoszómális transzlokációkat. (E) A Rad52 elősegíti az RNS-DNS hibridek képződését, amelyek elősegítik az RNS-templált HR-t a két DNS-vég összekötésével. A DNS-végek ligálódnak, és az RNS-szálat RNázH eltávolítja.*

### **1.3. R-hurok, mint genom instabilitást okozó struktúra**

Az R-hurokok számos mechanizmus révén okozhatnak DNS-károsodást. Az R-hurokok exponált ssDNS szakaszokat eredményeznek, amelyek kémiaiilag instabilabbak, mint a dsDNS, és hajlamosabbak a transzkripció mutagenézisére (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 bázissubsztitúciókhoz 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-hurokok 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 részt 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-hurkok hatalmas fizikai akadályt jelenthetnek a replikációs villában viszonylag stabil másodlagos DNS szerkezetük, illetve a transzkripció apparátus és más RNS-feldolgozó enzimek jelenléte miatt. Az R-hurkok közvetlenül okozhatják a villa összeomlását és a DSB képződését, még a nukleázok, például XPF és XPG beavatkozása nélkül is (Sollier & Cimprich, 2015).

#### **1.4. Az R-hurok kapcsolata humán betegségekkel**

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

Az R-hurkok 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-hurkok képződnek, az ebből fakadó DNS-replikációs villa és transzkripció gépezet közötti ütközések hozzájárulnak a CFS lókuszok instabilitásához. Az R-hurkok 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).

Madzia P. Crossley és munkatársai számos példát felsorakoztattak az R-hurkok és humán betegségek kapcsolatára a 2019-ben közölt tanulmányukban, ezeket átemeltem a disszertáció 1. Táblázatába.

## 1. Táblázat Az R-hurkok és betegségek kapcsolata

Betegségek megnevezése	R-hurok faktor / lókus	Az R-hurkok és a betegségek kapcsolatának mechanizmusai	Referencia
Emlő / petefészek daganat	ösztrogén	Az ösztrogén által indukált R-hurkok DNS-károsodást és genom instabilitást okoznak.	Stork et al., 2016
	BRCA1	A BRCA1 kölcsönhatásba lép a SETX-szel, és gátolja az R-hurkokat és a DNS-töréseket a gének terminációs régiójánál.	Hatchi et al., 2015
		Az RNAPII várakozása (pausing) hozzájárul a BRCA1-hez kapcsolódó R-hurok felhalmozódásához és az emlőrák kialakulásához.	Zhang et al., 2017
		Szatellit RNS-ek expressziója DNS-károsodási választ és kromoszóma-instabilitást vált ki azáltal, hogy a BRCA1-hez kapcsolódó fehérjehálózat faktorait leköti, ami a DNS-replikációs villák destabilizálódásához, R-hurkok kialakulásához és DNS-károsodáshoz vezet.	Zhu et al., 2018
	BRCA2	A BRCA2 fehérje csökkenése megemeli az R-hurkok szintjét és a genom instabilitását okozza.	Bhatia et al., 2014
		Az aldehidek csökkentik a BRCA2 szintjét, és R-hurok-függő genom instabilitást okoznak.	Tan et al., 2017
		A BRCA2 kimerülése transzkripciós stresszt okoz a gének promoterénél és R-hurok által közvetített DNS-károsodáshoz vezet	Shivji et al., 2018
Ewing-szarkóma	EWS-FLI, BRCA1	Az R-hurkok transzkripciós stresszt okoznak, ami a BRCA1 funkcionális kimerülését, majd DNS-károsodást eredményez.	Gorthi et al., 2018
Mielodiszpláziás szindróma (MDS)	SRSF2, U2AF1	A splicing faktor mutációi által kiváltott R-hurkok replikációs stresszt okoznak és rontják a csontsejtek működését.	Chen et al., 2018

Betegségek megnevezése	R-hurok faktor / lókuszt	Az R-hurkok és a betegségek kapcsolatának mechanizmusai	Referencia
Myeloma multiplex és Burkitt-limfóma	TRD3-TOP3B	A TRD3-TOP3B komplex csökkenti a negatív szuperhelicítást, és csökkenti az R-hurkok szintjét a c-MYC és Igh régióban, így szupresszálja a kromoszómális transzlokációkat.	Yang et al., 2014
ALT (Alternative lengthening of telomeres) - függő rákok	TERRA (Telomeric repeat containing RNA)	A TERRA R-hurkok magas mennyiségben vannak jelen a rákos sejtekben, és elősegítik a homológ rekombinációt a telomerek megőrzése érdekében az ALT útvonalon keresztül.	Arora et al., 2014
Fanconi-anémia (FA)	FANCM, FANCD2	Az FA-faktor hiánya az R-hurok szintjének növekedéséhez vezet, fokozza a transzkripció és replikáció ütközését és a genom instabilitását okozza.	Schwab et al., 2015; García-Rubio et al., 2015
AOA2	SETX	A SETX feloldja az R-hurkokat az idegsejtekben; a SETX mutációval rendelkező AOA2 betegek idegi progenitor sejtjeiben az R-hurkok szintje emelkedett.	Becherel et al., 2015
ALS4		A funkciónövekedéses SETX mutáció, ALS4-ben csökkenti az R-hurkok szintjét, növeli a DNS-metilációt és szabályozza a gyulladáshoz vezető géneket.	Grunseich et al., 2018
Terméketlenség	SETX	A SETX szükséges az egerek meióziséhoz; a SETX <sup>-/-</sup> egerek terméketlenek, és R-hurkok halmozódnak fel az ivar sejtjeikben.	Becherel et al., 2013
Prader-Willi szindróma	SNORD116	Az R-hurok képződés csökkenése a neuronok SNORD116 lókusztán az imprintált gének expressziójának megváltozásához vezet.	Powell et al., 2013
Amiotróf laterális szklerózis (ALS) és frontotemporális demencia (FTD)	C9ORF72 (C9)	Az ismétlődő expanziós helyeken képződő R-hurkok, transzkripciós interferenciát és abortív transzkriptumokat okoznak, amelyek fehérjéket kötnek meg és celluláris stresszt okoznak vagy a DNS ismétlődések instabilitását okozzák.	Haeusler et al., 2014; Reddy et al., 2014

Betegségek megnevezése	R-hurok faktor / lókusz	Az R-hurkok és a betegségek kapcsolatának mechanizmusai	Referencia
Friedreich ataxia (FRDA) és Törékeny X szindróma (FXS)	FXN, FMR1	Az ismétlődő expanszió helyeken kialakuló R-hurkok akadályozzák az RNAPII-t, gécensendesítést okozva és elősegítik a heterokromatin állapotot.	Groh et al., 2014; Colak et al., 2014; Loomis et al., 2014
Aicardi-Goutières szindróma (AGS)	RNase H2, SAMHD1, TREX1	Az emelkedett R-hurok szint DNS-metilációval asszociál az AGS sejtekben.	Lim et al., 2015
ICF szindróma (immunhiány, centrimerikus instabilitás és arc anomáliák szindrómája)	TERRA	A TERRA-R-hurkok diszregulációja telomer eróziót okoz.	Sagie et al., 2017
AIDS-szel összefüggő rosszindulatú daganatok	TREX complex	A Kaposi-szarkómával összefüggő herpeszvírus megköti a TREX transzkripció- és export faktort, megemeli az R-hurkok mennyiségét, ami genom instabilitáshoz vezet.	Jackson et al., 2014

## 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-hurkok kimutatására és izolálására a DNS-RNS immunprecipitációnak (DRIP) nevezett módszerrel, immunfluoreszcencia jelölésekkel vagy dot blot technikával.

Az S9.6 monoklonális antitestet 1986-ban egerekben állították elő  $\Phi$ 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 RNáz 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 RNázT1, RNázIII vagy magas só mellett (300 mM NaCl) RNázA 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 DRIP-seq (Ginno et al., 2012) (7. **Ábra**), amely új generációs szekvenálást használ az S9.6 immunprecipitációval izolált R-hurkok térképezésére. A DRIP-seq-ben nukleinsavat izolálnak a sejtekből, majd restrikciós enzimekkel vagy szonikálással fragmentálják azt. A genom restrikciós 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 restrikciós 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) (7. **Ábra**). 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) (7. **Ábra**). 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) (7. **Ábra**).

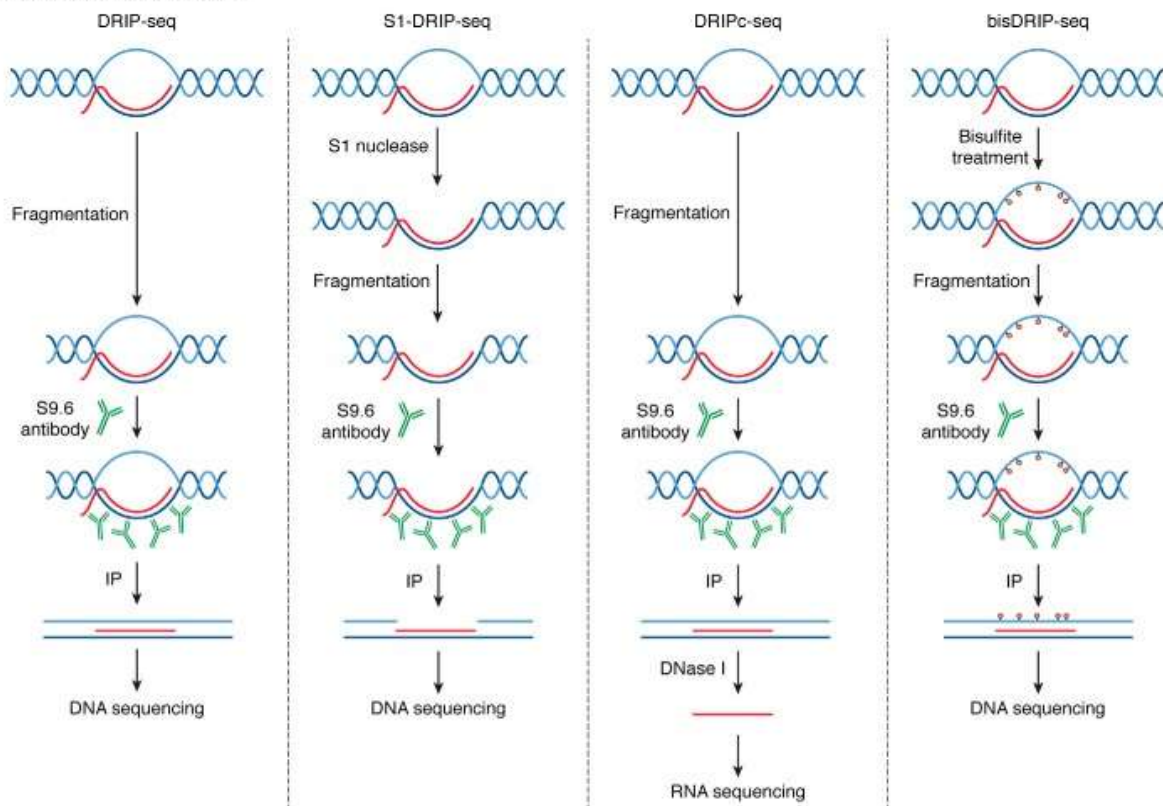
Másik megközelítés a katalitikusan inaktív, tagelt RNázH1 transzfekciója sejtekbe és ezen a módosított RNázH1-en keresztüli immunprecipitáció, amely képes felismerni a DNS-RNS hibrideket, de nem tudja lebontani a hibrid RNS szálát. Ezt a módszert R-ChIP-nek nevezték el (Chen et al., 2017) (7. **Ábra**). 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 RNázH1 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 RNázH1 megfelelő szinten expresszálódjon: túl magas expresszió esetén fennáll a domináns-negatív hatás 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 RNázH1 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 RNázH1 által lebontott rendkívül dinamikus R-hurkok észlelésére (Vanoosthuyse, 2018).

Az egyik legújabb, S9.6 antitest független módszer, a biszulfid kezeléssel kombinált technika továbbfejlesztése, az SMRF-seq. Gyengéd DNS izolálás és restriktív enzim emésztést

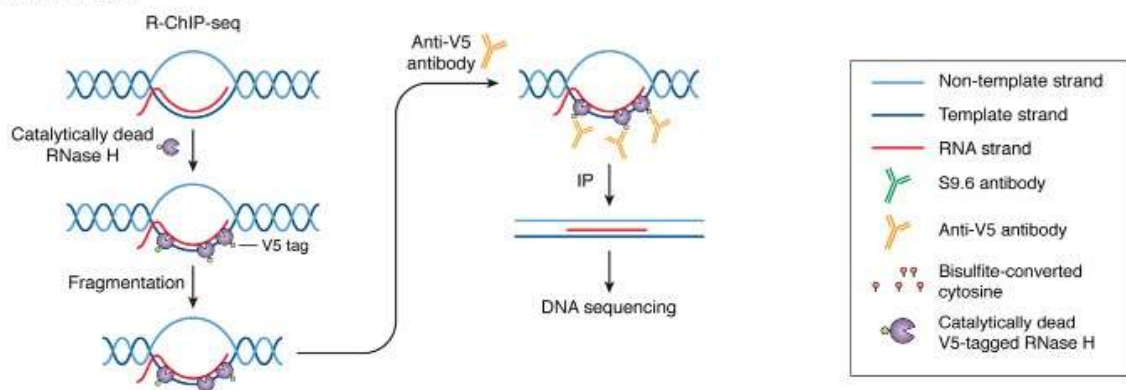
követően végzik nem denaturált környezetben a biszulfid kezelést. A hosszú leolvasású, egyedi molekulákat szekvenáló PacBio szekvenálás lehetővé teszi az R-hurok „lábnyomok” azonosítását közel nukleotid pontosságú felbontással, szálspecifikus módon a hosszú egyedi DNS-molekulákon, ultramély lefedettség 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).

**A** S9.6 antibody-based methods



**B** RNase H IP method



7. Ábra R-hurok térképező módszerek (Hegazy et al., 2020)

## 1.6. R-hurok szabályozó gének 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-eket 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 sejtteni funkció jellemzi, beleértve az RNS-feldolgozás legtöbb lépését. A fehérjék jelentős része K-homológ (KH) és helikáz doménekkel 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 sejt vonalat 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 út vonalat 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 expresszáldó 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 genomon 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 találatával 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. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Daganatos betegek génexpresszió és túlélés asszociációjának analízise

Elemzésünkhöz a Cancer Genome Atlas (TCGA) <https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga> 33 különböző ráktípusának génexpressziós adatait használtuk (Weinstein et al., 2013) (2. Táblázat).

#### 2. Táblázat Génexpressziós adatokhoz felhasznált Cancer Genome Atlas (TCGA) 33 ráktípusának neve és rövidítése

Daganat típus neve	Daganat típus rövidítése
adrenocortical carcinoma/adrenocorticalis carcinoma	ACC
bladder urothelial carcinoma/ húgyhólyag urothelialis carcinoma	BLCA
breast invasive carcinoma/invasiv emlő carcinoma	BRCA
cervical and endocervical cancers/cervicalis és endocervicalis daganatok	CESC
cholangiocarcinoma	CHOL
colon adenocarcinoma	COAD
lymphoid neoplasm diffuse large B-cell lymphoma/diffúz nagy B-sejtes lymphoma	DLBC
esophageal carcinoma/oesophagealis carcinoma	ESCA
glioblastoma multiforme	GBM
kidney chromophobe/chromophob vesecarcinoma	KICH
kidney renal clear cell carcinoma/világossejtes vesecarcinoma	KIRC
kidney renal papillary cell carcinoma/papilláris vesecarcinoma	KIRP
acute myeloid leukaemia/acut myeloid leukaemia	LAML
brain lower grade glioma/low-grade glioma	LGG
liver hepatocellular carcinoma/hepatocelluláris carcinoma	LIHC
lung adenocarcinoma/ tüdő adenocarcinoma	LUAD
lung squamous cell carcinoma/ tüdő laph mcarcinoma	LUSC
myeloid-derived suppressor cell/mieloid eredetű szuppresszor sejt	MDSC
mesothelioma	MESO
ovarian serous cystadenocarcinoma/petefészek serosus cystadenocarcinoma	OV
pancreatic adenocarcinoma/ hasnyálmirigy adenocarcinoma	PAAD
pheochromocytoma and paraganglioma/ pheochromocytoma és paraganglioma	PCPG
prostate adenocarcinoma/prosztata adenocarcinoma	PRAD
rectum adenocarcinoma/végbél adenocarcinoma	READ
sarcoma	SARC
skin cutaneous melanoma/ melanoma	SKCM
stomach adenocarcinoma/gyomor adenocarcinoma	STAD
testicular germ cell tumours/here csírasejtes daganatai	TGCT
thyroid carcinoma/pajzsmirigy carcinoma	THCA
thymoma	THYM

Daganat típus neve	Daganat típus rövidítése
uterine corpus endometrial carcinoma/méhtest endometriumcarcinoma	UCEC
uterine carcinosarcoma/méh carcinosarcoma	UCS
uveal melanoma/uvealis melanoma	UVM

Ezután az elérhető (publikált) R-hurok regulátor screen-ek (Wang et al. 2018; Cristini et al. 2018) és releváns szakirodalmi adatok alapján kiválasztottuk azokat a teszt géneket az elemzéseinkhez, amelyek nagy valószínűségű R-hurok regulátorok gének. Ehhez vettük az R-hurok screen-ek közös metszetét (közös találatokat) és a halmazt tovább szűkítettük az R-hurok szakirodalom alapján, amely végül 36 nagy megbízhatóságú R-hurok regulátort eredményezett. A kiválasztott gének különféle biokémiai útvonalakat és funkciókat fednek le, amelyet táblázatos formában összefoglaltunk (**3. Táblázat**).

### 3. Táblázat A farmakogenomikai elemzésekhez kiválasztott R-hurok regulátor gének listája

R-hurok regulátor gén	Ensemble ID	Funkció
<b>BRCA1</b>	ENSG00000012048	DNS károsodás és hibajavítás
<b>BRCA2</b>	ENSG00000139618	DNS károsodás és hibajavítás
<b>FANCD2</b>	ENSG00000144554	DNS károsodás és hibajavítás
<b>FANCM</b>	ENSG00000187790	DNS károsodás és hibajavítás
<b>GADD45A</b>	ENSG00000116717	DNS károsodás és hibajavítás
<b>TOP1</b>	ENSG00000198900	DNS topológia
<b>TOP3B</b>	ENSG00000100038	DNS topológia
<b>AQR</b>	ENSG00000021776	Helikáz
<b>ATXN1</b>	ENSG00000124788	Helikáz
<b>ATXN2</b>	ENSG00000204842	Helikáz
<b>BLM</b>	ENSG00000197299	Helikáz
<b>DDX19, DDX19A</b>	ENSG00000168872	Helikáz
<b>DHX9</b>	ENSG00000135829	Helikáz
<b>PIF1</b>	ENSG00000140451	Helikáz
<b>RTEL1</b>	ENSG00000258366	Helikáz
<b>SETX</b>	ENSG00000107290	Helikáz
<b>CARM1</b>	ENSG00000142453	Hisztin arginin-metiláz
<b>PRMT1</b>	ENSG00000126457	Hisztin arginin-metiláz
<b>BUB3</b>	ENSG00000154473	Mitotikus regulátor
<b>BUGZ, ZNF207</b>	ENSG00000010244	Mitotikus regulátor
<b>RNASEH1</b>	ENSG00000023191	Ribonukleáz
<b>RNASEH2A</b>	ENSG00000104889	Ribonukleáz
<b>RNASEH2B</b>	ENSG00000136104	Ribonukleáz
<b>RNASEH2C</b>	ENSG00000172922	Ribonukleáz
<b>EWSR1</b>	ENSG00000182944	RNS kötő fehérje
<b>SRSF1</b>	ENSG00000136450	RNS splicing

R-hurok regulátor gén	Ensemble ID	Funkció
SRSF2	ENSG00000161547	RNS splicing
THOC1	ENSG00000079134	RNS splicing
THOC2	ENSG00000125676	RNS splicing
THOC3	ENSG00000051596	RNS splicing
THOC4	ENSG00000183684	RNS splicing
THOC5	ENSG00000100296	RNS splicing
THOC6	ENSG00000131652	RNS splicing
THOC7	ENSG00000163634	RNS splicing
TREX1	ENSG00000213689	RNS splicing
U2AF1	ENSG00000160201	RNS splicing

A tumormintákból származó génexpressziós adatokat (mRNS-szekvenálás) és a túlélési időt a TCGA adatbázisból töltöttük le (Weinstein et al., 2013; Robert L. Grossman et al., 2016). Az egészséges szöveti génexpressziókat pedig a Genotype-Tissue Expression (GTEx) projekt weboldaláról szereztük be (eGTEx Project, 2017). Túlélési elemzést végeztünk, és Kaplan-Meier plot-okat készítettünk az R szoftver „survival” csomagjával. A szignifikancia szint  $p < 0,05$  volt. Minden p-érték korrigálva lett többszörös összehasonlításra a Benjamini-Hochberg módszerrel.

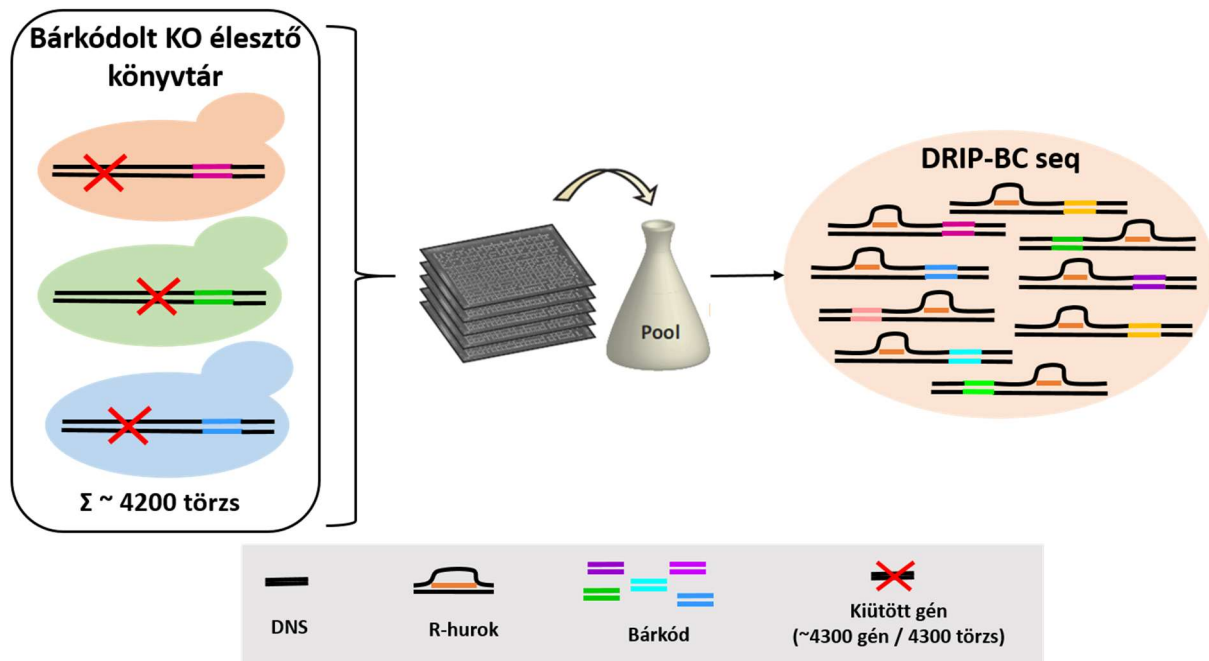
### 3.2 Sejtvonalak génexpresszió és drogszenzitivitás asszociációjának analízise

1065 rákos sejtvonalnak (1. Függelék) 297 daganatellenes droggal (2. Függelék) szembeni IC50-értékeit a Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC) adatbázisból töltöttük le (W. Yang et al., 2013) és Yong Qin és munkatársai által leírtak alapján végeztük az analízist (Qin et al., 2017). A rákos sejtvonalak gyógyszerérzékenység és génexpresszió asszociációit az IC50 értékek és az mRNS expressziós értékek Spearman-korrelációjaként mutatjuk be. Negatív és pozitív korrelációkat is figyelembe vettünk, amennyiben a p-érték  $< 0,05$  volt. Minden p-érték és korrigált p-érték Benjamini-Hochberg korrekció alá lett vonva.

### 3.3 DRIP-BC-seq

R-hurok szabályozó gének azonosítása érdekében egy bárkódolt, gén deléciós élesztő könyvtáron (epi-ID library) kifejlesztettük a DRIP-BC-seq-nek elnevezett bárkód szekvenálással egybe kötött DNS-RNS hibrid immunprecipitációs technikát. Ezzel a

módszerrel a különböző mutáns törzsek azonos genomi pontján elhelyezkedő bárkód környezetében tudjuk vizsgálni az R-hurkok mennyiségbeli különbségét.



**8. Ábra DRIP-BC-seq kísérleti elrendezése** A bárkódoknak köszönhetően a különböző gén deléciókat tartalmazó élesztő törzseket poolozni tudjuk, ezen a poolon vizsgáltuk a bárkódok környékén az R-hurkok előfordulását.

### 3.3.1. Epi-ID library

Az epi-ID library egy élesztő könyvtár, melynek minden tagjában más-más nem eszenciális gén van kiütve és minden törzs egyedi DNS bárkód szekvenciával van ellátva. A DNS bárkódok, azonosítóként szolgálhatnak, lehetővé téve a különböző törzsek együttes vizsgálatát. Mivel minden vonalkód egy géndelíciónak felel meg, a vonalkód feldúsulása jelzi a géndelíció hatását, mely újgenerációs szekvenálással kitűnően kvantitálható. A vonalkóddal ellátott törzsek két egyedi, 20 bázispárból álló vonalkódot tartalmaznak. A vonalkódok a szelektációs marker (KanMX) előtt (UpTag) és után (DownTag) találhatóak, amely a jól tanulmányozott HO-génbe integrálódott. A HO gént minden labor élesztő törzsben deletálják. Az UpTag és DownTag genomialis kontextusában különbözik, promóterek vagy terminátorok veszik körül. A könyvtár körülbelül 4200 törzsből áll, 14 darab 384 lyukú plateben helyezkednek el a törzsek. Egy kísérletben 3-3 platet lehet összevonni, mivel a könyvtár öt egyedi vonalkóddal rendelkező részhalmazra van osztva (Vlaming et al., 2016).

### 3.3.2. Élesztők növesztése

Az epi-ID library 384 lyukú glicerol stock platjeiból 5 - 5 ul-t vittünk át több csatornás pipettával egy új, 75 ul YPD tápoldatot tartalmazó 384 lyukú platebe. A platet levegőzős fóliával lefedve, ~16-18 órát 30°C -on 250 rpm rázatás mellett inkubáltuk a sejteket. Ezt követően a plateben felnőtt sejt kultúrákat összepooloztuk, OD600-on lemértük az abszorbanciáját a poolozott tenyészetnek. Kihígítottuk a poolozott sejt kultúrát OD600 =0,125-re 2-300 ml térfogatban és lombikban 30°C -on 200 rpm rázatás mellett OD600 =1 körülire (0.9-1.1) növesztettük őket. A felnőtt tenyészetet 50 ml-s centrifuga csövekbe alikvotoltuk, a sejteket 4000 rpm 5 perc centrifugálással összegyűjtöttük, szárazjégben fagyasztottuk és -70 °C-on tároltuk őket.

### 3.3.3. DRIP

DNS izolálás:

Egy reakcióban ~300-500 millió sejtől indult a DNS izolálás. A fagyasztott sejt pelletet 4,9 ml szorbitol-EDTA oldatban (0,9M szorbitol, 0,1M EDTA) felszuszpendáltuk, hozzáadtunk 100 ul zymolyase (1 mg/ml) enzimet és 50 ul  $\beta$ -merkaptoetanolt, 37°C -on 200 rpm rázatás mellett ~45 percig sejt falemésztettük a sejteket. A sejt falemésztés sikerességének ellenőrzése céljából 3 ul sejt hez 3 ul 1% SDS-t adtunk és konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk, hogy a kezelés hatására a sejtek kipukkadnak-e. Sikeres sejt falemésztés esetén buborékszerűek a sejtek, ha még nem volt teljes a sejt falemésztés, folytattuk az inkubációt. Majd kétszer mostuk a sejteket szorbitol-EDTA-val (centrifugálások: 10 perc, 4000g, 4°C), miközben átvittük a sejteket eppendorf csőbe. Innentől az izolálás a Macherey Nagel NucleoSpin Tissue - Genomic DNA from tissue kittel történt egy kis változtatás mellett. 180 ul Buffer T1-ben felszuszpendáltuk a sejteket, hozzáadtunk 25 ul Proeináz K-t és 1,5 órán át 56°C -on 500 rpm rázatással lizáltuk a sejteket. Ezt követően 200 ul B3 puffert adtunk a mintákhoz, alaposan vortexeltük, majd 10 percig 65°C -on inkubáltuk. A sejt törmeléktől 5 perc 11000g centrifugálással megváltunk, a felülúszóhoz egy új csőben 210 ul abszolút etanolt adtunk, alaposan vortexeltük, majd a kit szilika membrán oszlopára vittük a mintát. Az oszlopot mostuk a BW, majd B5 pufferrel, üresen is centrifugáltuk az oszlopokat és néhány percig nyitva hagytuk, hogy az etanol biztosan elpárologjon. Az oszlopról a DNS eluálását 50 ul 65°C-ra felmelegített elúciós pufferrel végeztük 3 percig inkubáltuk így az oszlopot, centrifugálást követően megismételtük az elúciót. Koncentráció mérést Qubit készülékkel és reagenssel végeztünk. A DNS intaktságát 1% agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

DNS szonikálása:

Egy plate gDNS pooljából ~17,5 ug-ot szonikáltunk összesen, ebből egy reakcióba ~2,5 ug DNS-t helyeztünk 100 ul térfogatban, Low EDTA TE (10mM Tris pH 8, 0,1mM EDTA pH 8) pufferrel kiegészítve a DNS-t. Körülbelül 5 kb fragment méret alá szonikáltuk a DNS-t Bioruptor UCD-300 (Diagenode) készülékkel, "low" erősségű fokozaton, átlagosan 5 másodperc alatt, 1%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük a fragment méretet. Azért fragmentáltuk enyhén, nagy fragment méretre, hogy a bárkód szélesebb környezetének R-hurok profilját tudjuk vizsgálni. A szonikálást követően az egy mintához tartozó osztérfogat mennyiség nagysága miatt Kapa Pure Beaddal DNS töményítést végeztünk 1,5x-es bead:minta aránnyal.

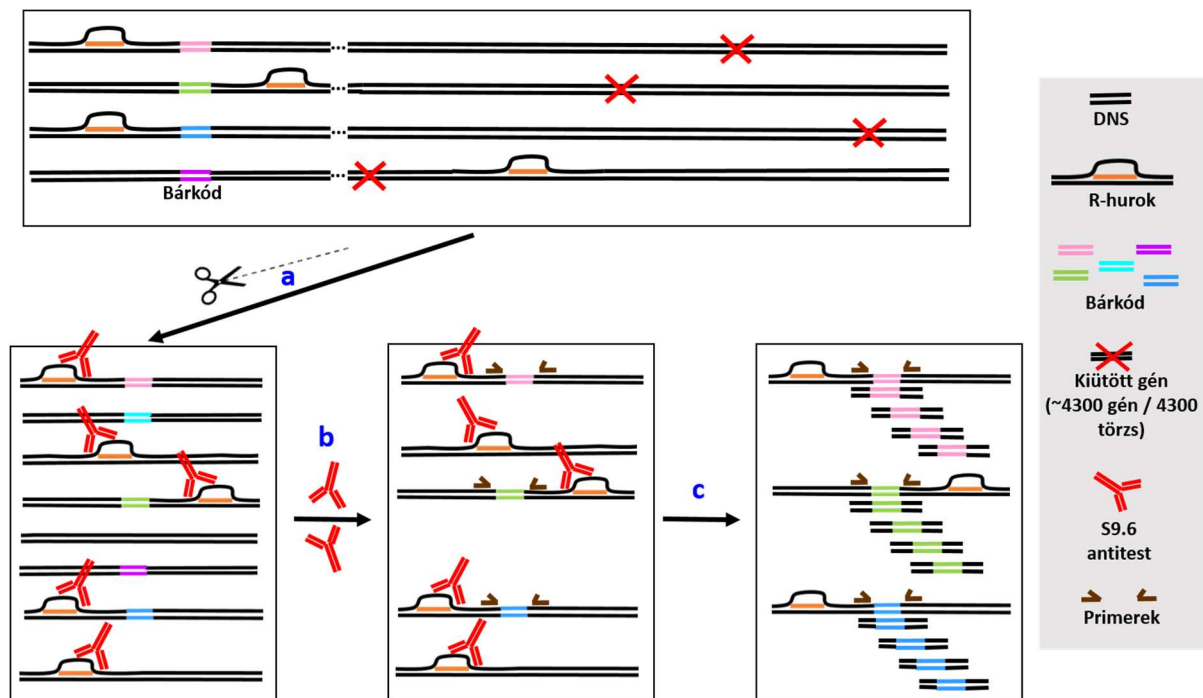
Immunprecipitáció (IP):

Egy IP reakcióban maximum 6 ug DNS volt a bemenő DNS mennyiség, minden lépést DNA LoBind (Eppendorf) csőben végeztünk és a mágneses beadek kifogásához mágneses eppendorf cső tartót használtunk. Egy IP reakcióhoz 50 ul blokkolt DynaBead Protein G beadet (ThermoFisher 1004D) használtunk. A blokkoláshoz kétszer, 2 percig rotátoron inkubáltuk a beadeket 1 ml 0,5% BSA/PBS/EDTA pufferrel. Majd 1 ml 0,5% BSA/PBS/EDTA pufferrel 15 ug S9.6 antitest mellett, ~4 órán át rotálva 4°C-on inkubáltuk a bead-antitest elegyet. Ezt követően újra mostuk a beadeket kétszer, 2 percig inkubáva 1 ml 0,5% BSA/PBS/EDTA pufferrel, hogy eltávolítsuk a beadhez nem kötött antitesteket. A mosás után IP pufferben (50 mM Hepes/KOH at pH7,5; 0,14 M NaCl; 5 mM EDTA; 1% Triton X-100; 0,1% Nadeoxycholate, ddH<sub>2</sub>O + proteáz inhibitor tabletta (1db/10ml)) vettük fel a beadeket. Hozzáadtuk a bead-antitest-IP puffer elegyhez a DNS mintákat, a végtérfogat 500 ul volt. Minimum 12 órán át 4°C-on rotálva inkubáltuk így a mintákat. Másnap háromszor mostuk 1 ml hideg IP pufferrel és háromszor 1 ml hideg TE pufferrel (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH8.0) a beadeket (2 perc rotálás/mosás). 100 ul elúciós pufferrel (50mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA, 1% SDS) eluáltuk a DNS-t, 65°C - 15 perc inkubációval, közben 2 percenként vortexelve a beadeket. Az eluátumot új LoBind csőbe helyeztük, majd a Zymo ChIP DNA Clean and Concentration Kittel tisztítottuk a gyári protokoll szerint, 30 ul-ben eluálva a mintákat az oszlopokról. Koncentráció mérés Qubit készülékkel és reagenssel történt.

### 3.3.4. Bárkódok amplifikációja PCR-el

A bárkódok mellé tervezett primer párral PCR-t végeztünk 50-50 ng IP és input (IP reakció előtti DNS) mintán. A PCR-t a Kapa Hifi Hot Start Master Mix-el végeztük gyári

protokoll szerint, az alábbi primerekkel - Forward primer:AATGGATGTCCACGAGGTCT, Reverse primer:GTATTCTGGGCCTCCATGTC. A primer hibridizációs hőmérséklet 63°C volt, 17 PCR ciklust végeztünk összesen. A PCR amplikon hossza 152 bp méret volt. A PCR terméket Kapa Pure Beaddal méretszelektációs tisztítással tisztítottuk úgy, hogy a 100 - 250 bp méret közötti fragment méretek maradjanak csak meg (először 0,9x-es bead:minta, majd 3x-os bead:minta arányt alkalmaztunk). Koncentráció mérés Qubit készülékkel, reagenssel történt. A tisztított PCR termékek Agilent Bioanalyzer készülékkel DNA High Sensitivity Chippel ellenőrizve lettek, hogy jó fragment méretnél jönnek-e. A könyvtárkészítés előtt a lehetőségeknek megfelelően, ahol nem volt átfedés a bárkódok szekvenciájában, 2-3 plate DRIP-BC PCR termékét pooloztuk egyenlő arányban.



9. Ábra DRIP-BC kísérlet főbb lépései a, izolált gDNS szonikálása b, immunoprecipitáció S9.6 antitesttel c, bárkódok amplifikációja PCR-el

### 3.3.5. Könyvtárkészítés, szekvenálás

A könyvtárkészítés előtt a lehetőségeknek megfelelően, ahol nem volt átfedés a bárkódok szekvenciájában, 2-3 plate DRIP-BC PCR termékét pooloztuk egyenlő arányban. A könyvtárkészítést a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriuma végezte Nugen Ovation Ultralow System V2

könyvtárkészítő kit használatával. A szekvenálás a Novogene vállalat cambridge-i székhelyén lett elvégezve, 3-4 millió 150 bp paired end read lett szekvenálva platenként az IP és input mintákból is. A readok illesztése egy virtuális referencia genomra történt, melyben a bárkódok környezete van összefűzve egy mesterséges szekvencia sorrá. Könyvtárméretre normalizálás történt és 5% percentilis alatt az input minta alapján kihagytuk a kevésbé reprezentált bárkódokat az elemzésből. Végül az IP/input arányt vizsgáltuk mutánsenként. A legalább másfélszeres DRIP jel (IP/input arány) csökkenést vagy növekedést ( $<0.67$  ill  $>1.5$ ) tekintettük szignifikáns változásnak.

### 3.4. Teljes genomi DRIP-seq

A DRIP-BC-seq eredménye alapján kiválasztott 11 élesztő törzsből teljes genomi DRIP-seq-et végeztünk. Az egyedi törzsek az epi-ID library platje pooljaival egyező módon lettek növesztve. Glicerol stockból leoltott over night előtenyészetből OD600 = 0,125-re kihígítottuk a sejteket és OD600 ~1-ig (OD600 = 0,9 - 1,1) növesztettük őket, majd begyűjtöttük a sejtlepletet és a DNS izolálásig -70 °C-on tároltuk őket.

DNS izolálás:

A sejtlepletet mostuk 1 ml hideg TBS pufferrel (centrifugálás: 3200 g, 1 perc, 4 °C), majd felszuszpendáltuk 200 µl lízis pufferben (2% (v/v) Triton X-100; 1% (v/v) SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0). Hozzáadtunk 0,3g üveggyöngyöt és 200 µl fenol/kloroform/izoamil-alkoholt (ThermoFisher, 15593031), majd 3 percig vortexeltük a mintákat. Kiegészítettük 200 µl TE pufferrel, rövid vortexeléssel elegyítettük. Centrifugálást (16000 g, szobahő, 5 perc) követően a felső vizes fázist új eppendorf csőbe tettük, majd hozzáadtunk a leszívott mennyiséggel megegyező térfogatú kloroformot (Sigma, C2432-1L). Centrifugálást (16000 g, szobahő, 5 perc) követően a felső vizes fázist új eppendorf csőbe tettük és 1 ml hideg 100%-os etanolt (Molar Chemicals Kft., 02910) és 10 µl 4 M ammónium-acetátot adtunk hozzá, összeforgattuk és 1 óra hosszát -20 °C-on inkubáltuk a mintákat. Centrifugálást (20000 g, 4 °C, 3 perc) követően a felülúszót eltávolítottuk, a DNS pelletet szárítottuk, majd 100µl low EDTA-TE pufferben beoldottuk 37 °C-on 30 percig inkubálva. A DNS koncentrációját Qubit készülékkel és reagenssel mértük meg.

Szonikálás, RNázA emésztés:

Törzsenként összesen 42 µg DNS-t szonikáltunk 6µg-onként szétszedve őket és 250 µl térfogatra kiegészítve low EDTA-TE pufferrel. Átlagosan 1-2 kb fragment méret alá szonikáltuk a DNS-eket Bioruptor UCD-300 készülékkel 5-ször 30 mp ON/OFF programozással, 1%-os

agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük a fragment méretet. Mivel a fenollal való DNS izolálás után rengeteg RNS marad a mintában, RNázA emésztést végeztük 300 mM NaCl mellett. 6 µg DNS-t 2 µl RNázA (10 mg/ml, ThermoFisher, EN0531) enzimmel emésztettünk 300 µl térfogatban, 18 µl 5 M NaCl-ot hozzáadva, 1 órán át 37 °C-on inkubálva a mintákat, majd a Machery Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kittel tisztítottuk a DNS-eket, low EDTA TE pufferrel végezve az eluálást az oszlopkokról.

Spike-in kontroll izolálása:

Az immunoprecipitációhoz belső kontrollként szonikált *E. coli* DNS-t (spike-in kontroll) használtunk. Kompetens *E. coli* (DH5α) glicerol stockból leoltottunk 50 µl-t 5 ml LB tápoldatba és egy éjszakán át 37 °C-on 200 rpm rázatás mellett növesztettük a sejteket. Másnap 1,5 ml sejt kultúrából izoláltunk DNS-t. A sejteket összegyűjtöttük 16000g 1perc centrifugálással, majd 600 µl lízis pufferben (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH8.0, 0,6% SDS, 0,12 mg/ml ProtK) felfuszpendáltuk, vortexeltük őket és 1 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. Hozzáadtunk 600 µl fenol/kloroform/izoamil-alkoholt, vortexeltük és centrifugálást (16000 g, 5 perc, szobahő) követően a felső vizes fázist átvittük egy új csőbe. A fenol/kloroform/izoamil-alkoholos tisztítást még kétszer megismételtük. Ezt követően az átvitt vizes fázissal megegyező térfogatban kloroformot adtunk a mintához, vortexeltünk, majd centrifugáltuk (16000 g, 5 perc, szobahő). A felső vizes fázist ismét új csőbe vittük át és 1/10 térfogat 3 M Na-acetáttal és 2,5 térfogat jéghideg abszolút etanollal elegyítettük, -20 °C-ra helyeztük 30 percre. Centrifugálást (18000 g, 15 perc, 4 °C) követően a DNS pelletet mostuk kétszer 1ml hideg 70%-os etanollal (centrifugálás: 18000 g, 5 perc, 4 °C) és miután a maradék etanol elpárolgott, 60 µl nukleáz mentes vízben oldottuk be a DNS-t 4 °C-ra helyezve egy éjszakára.

Spike-in kontroll hozzáadása az élesztő DNS-hez:

Minden törzsből összesen 24 µg DNS-t használtunk fel, az élesztő DNS mennyiségnek a 2%-ával egyenlő mennyiségű *E. coli* szonikált DNS-t adtunk az élesztő mintákhoz, ez 480 ng *E. coli* DNS-t jelentett.

RNázH emésztés:

A spike-in kontroll hozzáadása után 4 µg mintán RNázH emésztést végeztünk. Ez a minta negatív kontrollja lett a kísérletnek, a kezelt mintában azt vártuk, hogy csökken az R-hurok jel, a kezeletlenhez képest. Az emésztéshez 6 µl RNázH enzimet (NEB M0297L) használtunk 100 µl reakció térfogatban 10 µl 10x RNázH puffer jelenlétében. 2 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk a reakciót, majd a Zymo ChIP DNA Clean & Concentrator kittel tisztítottuk a DNS-t a gyári protokoll szerint.

Immunoprecipitáció:

Az immunoprecipitációhoz az RNázH kezelt mintához 50 µl-t, a maradék 20 µg kezeletlen DNS-hez kétszer 100 µl blokkolt Dynabead Protein G beadet használtunk. (100 µl beadhez 10 µg kezeletlen DNS-t adtunk.) A beadek blokkolását és az immunoprecipitációt a DRIP-BC-seqnél leírtakkal azonos módon végeztük. Mivel itt az IP minta egyenesen a könyvtárkészítés bemenő anyaga, a DRIP-BC-seqell ellentétben, ahol a brákód PCR termék volt az, a nagyobb tisztaság érdekében az IP eluátumokat Ampure beaddal tisztítottuk 1,8x-os bead:minta aránnyal.

Kvantitatív polimeráz lánreakció (QPCR):

R-hurok szempontjából pozitív és negatív genomi régiókon QPCR-t végeztünk az RNázH kezelt és kezeletlen IP mintákon és a kiindulási input mintán egyaránt. Az IP/input arányokat hasonlítottuk össze az egyes minták, régiók között.

1 PCR reakció - plate lyuk összetétele: 5 µl Roche LightCycler 480 Sybr Green I Master Mix, 0,03 µl Kapa Rox High (passzív referencia festék), 0,25 µl 10 µM FW primer, 0,25 µl 10 µM Rev primer, 0,47 µl nukleáz mentes víz és 4 µl DNS minta vagy víz a háttér detektálásához.

PCR program:

	5 perc	95°C
40 ciklus	10 sec	95°C
	20 sec	primer hibridizációs hőmérséklete (53-60 °C)
	30 sec	72°C
	PCR termék olvadáspont analízise	

Használt primerek:

pozitív kontroll régiók:

18S-pos-ctrl-FW: TCCAATTGTTCTCGTTAAG

18S-pos-ctrl -Rev ATTCAGGGAGGTAGTGACAA

DRIP\_sc\_pos\_1\_FW: TGCATATCGAGTCGAAGCCC

DRIP\_sc\_pos\_1\_REV: CCATTACGTTGTGTGCGAGC

negatív kontroll régió:

CEN16-neg-ctrl-FW: TGAGCAAACAATTTGAACAG

CEN16-neg-ctrl-Rev: CCGATTTTCGCTTTAGAAC

Bárkód közelébe tervezett primerek:

DRIP\_sc\_PTP1\_FW: TGGGGGTCAGCATAGAACCT

DRIP\_sc\_PTP1\_REV: AGTTTTACGCGTGGGACCTT  
DRIP\_sc\_SSB1\_FW: TGCCAAGAAGCACGAAGCTA  
DRIP\_sc\_SSB1\_REV: GTGATGAATGCAGTCTTAACGAG

Könyvtárkészítés, szekvenálás:

A könyvtárkészítés az Accel-NGS 2S Plus DNA Library Kittel és az Accel-NGS 2S Indexing Kittel (Swift Biosciences) lett elvégezve a könyvtárkészítés végén a szükséges PCR ciklus szám a KAPA Library Quantification Kittel (Roche) lett meghatározva. A szekvenálás mélysége az IP minták esetén 5-6 millió read, RNázH kezelt IP mintáknál 2-3 millió read, input mintáknál ~2 millió read volt.

### **3.5. Élesztő növekedési vizsgálat - spot assay**

Szaturált előtenyészeteket mostuk (2000 rpm, 2 perc, szobahőm) klávozott MiliQ vízzel, majd megmértük OD600-on az abszorbanciájukat. Kihígítottuk mindegyik vizsgálni kívánt törzset OD600 = 0,5-re, majd 10-szeres hígítási sort készítettünk (1000x-es hígításig) 96 lyukú plateben az élesztő kultúrákból. A hígítási sorból több csatornás pipettával 4 - 4 ul-t csepegtettünk YPD (1% élesztő extraktum, 2% pepton, 2% D-glükóz, 2% agar) illetve YPG (1% élesztő extraktum, 2% pepton, 3 v/v% glicerol, 2% agar) agar plate-re. Naponta ellenőriztük a sejtek növekedését és fotóztuk őket. YPD-n kb. 2 napra, a YPG-n kb. 5 napra van szükség, hogy megfelelően látszódjanak a különböző törzsek között a növekedési különbségek.

A képelemzést Petropavlovskiy és munkatársai cikke alapján végeztük az ImageJ szoftver segítségével (Petropavlovskiy et al., 2020). A kép típusát 8 bitesre állítottuk és a legnagyobb élesztő telep átmérőjénél lemértük a pixelek számát. Az előbbi pixel számhoz hozzáadva 20 pixelt, háttérkivonást végeztünk "sliding parabolid" módszerrel. A legkisebb élesztő telep köré kört rajzoltunk és ezzel a körrel a kép 5 pontján lemértük a háttérrel és ebből átlagot számoltunk. Majd ugyanazzal a körmérettel lemértük az élesztő telepeken a pixelek számát és ezekből kivontuk a háttér átlagát. Az így kalkulált értékeket végül Excel programmal, oszlop diagramon ábrázoltuk.

### **3.6. Az epi-ID törzsek génexpressziós vizsgálata (mRNS-seq)**

Annak érdekében, hogy megtudjuk az emelkedett R-hurok szint az egyes mutáns törzsekben milyen gének génexpressziójának a megváltozásával jár együtt, mRNS-seq-et végeztünk néhány számunkra érdekesnek bizonyuló mutáns törzsből és vad típusú élesztő törzsből.

### 3.6.1. RNS izolálás

Az RNS izoláláshoz az élesztő törzseket ugyanúgy növesztettük, mint a teljes genomi DRIP-seq esetében, viszont Trizol reagensben (MRC, TR118/200) gyűjtöttük be a sejteket. Az izolálást 10 ml OD<sub>600</sub> ~1-re felnőtt tenyészetből indítottuk, megmostuk (centrifugálás: 3000 g, 3 perc, szobahőn) a sejteket 1 ml 1x TBS pufferrel (20 mM Tris, 150 mM NaCl), majd 500 µl Trizol reagensben felfuszpendáltuk és 200 µl üvegyöngy jelenlétében 5 percig vortexeltük a mintákat, majd -20 °C-on tároltuk őket az izolálás folytatásáig. A kiolvasztást követően 1 percig vortexeltük a mintákat, hozzáadtunk 100 µl kloroformot és 5 percig újból vortexeltük őket. Centrifugálást (12000 g, 15 perc, 4 °C) követően a felső vizes fázist új eppendorf csőbe vittük át, hozzáadtunk 250 µl izopropanolt, összeforgattuk és szobahőmérsékleten 10 percig inkubáltuk így a mintát. Centrifugálást (12000 g, 10 perc, 4 °C) követően a felülúszót eltávolítottuk, az RNS pelletet kétszer mostuk (centrifugálás: 7500 g, 5 perc, 4 °C) 1 ml hideg 75%-os etanollal, majd miután megvártuk, hogy a maradék etanol elpárologjon 40 µl DEPC-kezelt nukleáz mentes vízben oldottuk be az RNS-t. Koncentráció mérést Nanodrop spektrofotométerrel végeztünk és 1%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük az RNS-ek intaktságát.

### 3.6.2. mRNS szekvenálás, analízis

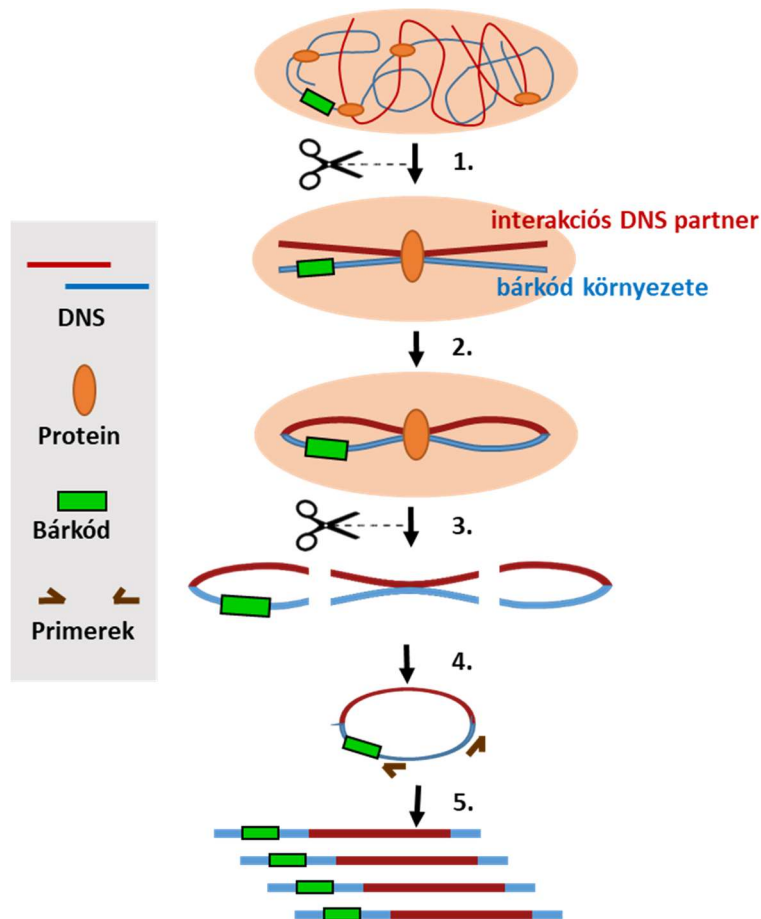
Az NGS könyvtárkészítést és mRNS szekvenálást a Novogene cég végezte. Az mRNS dúsítása poliA szelekcióval, a cDNS szintézis random hexamerek segítségével történt. Nem-szál-specifikus könyvtár készült standard Illumina könyvtárkészítéssel, mely állt végreparálásból, túlnyúló A nukleotid képzésből, adapter ligálásból, méretszelekcióból és a könyvtár PCR amplifikációjából. A szekvenálás 150 bp paired end read leolvasásával történt.

Az analízist szintén a Novogene cég végezte. A génexpresszió szint méréshez a Counts v1.5.0-p3 programot használták, megszámozták az egyes génekre eső read számot, majd génenként FPKM-et számoltak a génhossz alapján. Az FPKM, a transzkriptek kilobázisonkénti fragmentumainak száma, egy millió bázispárra vetítve.

A differenciálisan expresszált gének annotációját (Gene Ontology - GO) a clusterProfiler R csomaggal végezték, amellyel a génhossz torzítást korrigálták. A 0,05-nél kisebb korrigált P-értékkel rendelkező GO kifejezéseket tekintették szignifikánsan dúsultnak.

### 3.7. 4C-BC-seq

A DRIP-BC-n kívül az epi-ID libraryt egy másik nagy volumenű screening jellegű vizsgálatra is felhasználtuk, melyben a bárkód régió kromatin interakciót vizsgáltuk. A módszert 4C-BC-seq-nek neveztük el (**10. Ábra**).



**10. Ábra 4C-BC seq módszer főbb lépései.** 1. első restrikciós enzimes emésztés sejtmagon belül, 2. in situ proximity ligálás (sejtmagon belül), 3. második restrikciós enzimes emésztés a tisztított DNS-en, 4. ligálás híg környezetben, 5. inverz PCR

A különböző élesztő törzseket szintén poolozva vizsgáltuk, 384 well platenként haladtunk a kísérlettel. A növesztés a DRIP-BC-nél leírtakkal egyező módon történt, viszont a 4C-BC-seq-hez a sejteket 2% formaldehiddel fixáltuk (20 perc, 25°C, 200 rpm), majd a fixálást 0,26M glicint (20 perc, 25°C, 200 rpm) használva állítottuk le.

Sejtmag izolálás:

2-400 millió sejten, szorbitol-EDTA pufferben (1 M sorbitol, 0,1 M EDTA pH 8.0), 5 ml térfogatban, zymolyase (100T, 25 µg/ml) és 50 µl β-merkaptóetanol jelenlétében

sejtfalemésztést végeztünk 37°C-on ~50 percig 200 rpm rázatás mellett. A sejtfalemésztés hatékonyságát 1% SDS : minta 1:1 arányú keverékével ellenőriztük. Sikeres sejtfalemésztésnél SDS hatására már csak a sejtmag látható egy halvány “buborékban”. Mostuk a sejteket 5 ml hideg szorbitol-EDTA-val, majd áthelyeztük eppendorfesőbe a sejteket (centrifugálások: 4000 g 10 perc 4°C). A sejtpelletet 500 µl Hi-C lízis pufferben (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM NaCl, 0.2 % Igepal + 1 db proteáz inhibitor tabletta 10 ml puffer) szuszpendáltuk fel és 30 percig rotátoron inkubáltuk 4°C –on. Mostuk a pelletet Hi-C lízis pufferrel (centrifugálások: 4500 g 10 perc 4°C), majd 1x NEB Cut Smart pufferben szuszpendáltuk fel a pelletet, kiegészítettük SDS-el 0,1% végkoncentrációban és 62°C-on 10 percig inkubáltuk a mintát. Inkubáció lejártát követően rögtön jégre tettük a csöveket, hogy elkerüljük a magas hőmérsékleten bekövetkező formaldehides keresztkötés felbomlást. 1% végkoncentrációban TritonX-100-al egészítettük ki a szuszpenziót és 15 percig 37°C-on rotálva inkubáltuk őket. Így a sejtmagok épségben kiszabadulnak a sejtől. 100g 5 perc 4°C centrifugálással megváltunk a sejttörmelékeltől, a felülúszót tartottuk meg. Majd a sejtmagokat 4500 g 10 perc 4°C centrifugálással gyűjtöttük be. Ezen a ponton a sejtmagok szárazjégben fagyaszthatóak és -70°C-on tárolhatóak.

Első restriktív emésztés, proximity ligálás:

NEB 1x Cut Smart pufferben felsuszpendáltuk a sejtmagot, DraI és SspI restriktív enzimekkel 1 órán keresztül 37°C-on rotálva emésztettük őket. Az enzimeket 62°C-on 20 perc alatt hőinaktiváltuk. Centrifugáltuk (4500 g, 4°C, 5 min) a sejtmagokat puffercsere céljából. NEB 1x Cut Smart pufferben szuszpendáltuk fel a mintát és kiegészítettük NEB Quick Ligase Reaction Buffer-rel (1x végkoncentráció), TritonX-100-al (0,83% végkoncentráció), BSA-val (0,1 mg/ml végkoncentráció) és 4500 Unit NEB Quick Ligase-al. 1 órán keresztül szobahőmérsékleten lassú rotálás mellett zajlott a ligálás, majd 4500g 10 perc 4°C centrifugálással összegyűjtöttük a sejtmagokat és megkezdtük a DNS izolálást. A sejtmagokat 200 µl breaking pufferben (2% (v/v) Triton X-100; 1% (v/v) SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0) lizáltuk 68°C-on 1,5 órán keresztül, ezalatt a formaldehides keresztkötések felbontása is megtörtént. 15 µl RNázA-val (10 mg/ml) emésztettük az RNS-eket 37°C-on 30 percig, 20 µl proteináz K-val (20mg/ml) 55°C-on 30 percig emésztettük a fehérjéket. Ezt követően Kapa Pure beaddal 0,4x-es bead-minta aránnyal tisztítottuk a DNS-t.

Második restriktív emésztés, végfeltörlés, 2. ligálás:

Mintánként kétszer 2 µg DNS-en végeztük el a második restriktív emésztést. A 2-2 µg DNS-t restriktív enzimenként 20-20 Unit HindIII, AseI, BsrGI, MscI, NcoI, FspI enzimmel

hasítottuk NEB2.1 pufferben 37°C -on 2 órát inkubálva. A restriktációs enzim emésztés után Zymo ChIP DNA Clean & Concentrator Kittel tisztítottuk ki a DNS-t. Mivel a restriktációs enzim emésztés többféle túlnyúló DNS véget eredményezett szükség volt végfeltöltésre is a ligálás előtt. Egy reakcióban ~1 ug DNS-en végeztük a végfeltöltést 1x NEB 2.1 pufferben 3,3 - 3,3 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 1 Unit Klenow enzim hozzáadásával 25°C-on 15 percig, majd a Zymo ChIP DNA Clean & Concentrator Kittel kitisztítottuk a DNS-t. A második ligálást híg körülmények között 7 ml térfogatban végeztük, 1x -re hígítva a 10x ligáz puffert, enzimből 100 Unit Quick ligáz használtunk. Egy éjszakán át 16°C-on inkubáltuk a mintát. A DNS tisztítást 2,5x térfogatú 100% etanol, 1/10 térfogat 2M NaAc (pH 5,6)-al való kicsapással végeztük. -80°C-ra helyeztük az így kapott oldatot és megvártuk, hogy szilárdra fagyjon a folyadék, miután ezt elértük 20 perc 7200 g 4°C centrifugálással pelleteltük a kicsapott DNS-t. Hideg 70% -os etanollal mostuk a pelletet (15 perc 3300g 4°C), majd a pelletet szobahőmérsékleten szárítottuk. 10mM Tris-ben (pH 7,5) oldottuk fel a pelletet 15 perc 37°C inkubálással és a Zymo ChIP DNA Clean & Concentrator Kittel tisztítottuk a DNS-t.

Inverz PCR, input PCR:

Az inverz PCR során a normál PCR-hez képest a primerek tervezése egymással ellentétes irányban történik, így az ismert DNS szakaszhoz ligált ismeretlen DNS szakaszokat fel tudjuk amplifikálni, majd később megszekvenálni. Ehhez a Roche Expand Long Template System DNS polimerázát használtuk, ami egyforma hatékonysággal képes a kisebb és nagyobb fragmenteket is amplifikálni, így a különböző templát méret nem visz torzítást a kísérletbe. 1 PCR reakció 100 ng ligált mintán lett elvégezve. 1 reakció összetétele: 5 µl Expand Long Template System 10x buffer 1, 4 µl 2,5 mM dNTP mix, 1-1 µl 25 µM primer1 (ATCCGTCGACCTGCAGCGTA) - primer 2 (GAATACCCTCCTTGACAGTCTTGAC) , 0,75 µl polimeráz (5U/µl), 50 µl-re kiegészítve a DNS templáttal.

inverz PCR program:

1 ciklus	94°C	2 perc
30 ciklus	94°C	15 mp
	63°C	1 perc
	68°C	3 perc
1 ciklus	68°C	7 perc

A PCR terméket Kapa Pure beaddal 100 - 1000 bp közé méretszelektálva tisztítottuk ki.

A különböző törzsek reprezentáltságának az ellenőrzésére úgynevezet input PCR-t is végeztünk, ahol szimpla PCR-el dúsítottuk a bárkód szakaszt, majd szekvenálással kvantitáltuk az egyes bárkódok mennyiségét. 1 input PCR reakció 50 ng DNS-en ment, 25 UL TÉRFOGATBAN, 1 reakció összetétele: 12,5 µl 2x Kapa Hifi Hot Start Master Mix, 0,75 - 0,75 µl 10 µM forward primer (GTATTCTGGGCCTCCATGTC) - reverse primer (AATGGATGTCCACGAGGTCT).

input PCR program:

1 ciklus	95°C	3 perc
15 ciklus	98°C	20 mp
	63°C	15 mp
	72°C	15 mp
1 ciklus	72°C	1 perc

A PCR terméket szintén Kapa Pure beaddal 100 - 250 bp közötti méret szelekcióval tisztítottuk.

Könyvtárkészítés, szekvenálás:

A könyvtárkészítést 2-3 db 384 well epi-ID plateből származó 4C mintát ekvimolárisan poolozva végeztük el, a teljes genomi DRIP-seq-re készült mintákkal azonos módon. Az inverz PCR termékekből készült könyvtárakat 35 millió 150 bp paired end readdal, míg az input PCR termékekből készült könyvtárakat 8 millió readdal szekvenáltattuk újgenerációs szekvenálással.

### 3.8. Arabidopsis Hi-C

A Hi-C kísérletek Arima HiC Kittel (Arima Genomics) lettek végezve. 10 napos Columbia vad típusú (Col-0) és *ndx1-4* mutáns csíranövények 1% formaldehidet tartalmazó foszfáttal pufferezt sódoldattal lettek fixálva (PBS) 2x5 perces inkubációval vákuumkamrában. A formaldehid feleslegét 0,125 M glicin hozzáadásával kötöttük le. Ezt követően az Arima Kit növényekre specializált használati útmutatóját (<https://arimagenomics.com/>) követve 1 gramm fixált növényt használtunk a sejtmag izolálásához. A növényi mintát folyékony nitrogénben dörzsmozgás segítségével tártuk fel, majd PTNI puffer (250 mM szukróz, 20 mM HEPES pH 8,0, 5 mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 40% glicerol, 0.1 mM PMSF, 1% proteáz inhibitor koktél

(Sigma), 0.25% Triton X-100, 0.1% merkaptoetanol) hozzáadását követően kétrétegű Mirachlot (Merk) szűrőn kétszer átszűrtük. A sejtmagokat háromszor mostuk PTNI pufferrel, miközben aliquotoltuk a sejtmagokat ~125 mg-onként. Az in situ proximity ligált Hi-C könyvtárakat az Arima felhasználói kézikönyve szerint állítottuk elő. A Hi-C mintákat 400 bp körülire fragmentáltuk szonikátorral (Bioruptor UCD-300, Diagenode; “low” erősségű fokozat, 3 x 5 perc; 30 mp ON, 30 mp OFF). A könyvtárkészítés a DRIP-seq illetve 4C-BC-seq módszernél leírtakkal egyező módon történt annyi különbséggel, hogy itt nem volt szükség a minta mágneses gyöngyöz való PEG-NaCl-os visszakötésére, mivel a DNS biotinon keresztül volt kikötve a sztreptavidinnel borított mágneses gyöngyökhöz, a biotin - sztreptavidin kötődése nagyon nehezen felbontható, stabil kötés. A könyvtár amplifikációjához az elegendő PCR ciklus számot és az Arima-QC2 értékeit a KAPA Library Quantification Kittel (Roche) határoztuk meg. Az NGS-könyvtár amplifikációit a becsült PCR-ciklusszámokkal (általában 5-9 között) a Kapa Library Amplification Kit (Roche) segítségével végeztük el. Végül az NGS könyvtárakat Illumina NextSeq 500 platformon (2x150 nt, paired end reads) NextSeq 500 High Output v2 kittel (Illumina) szekvenáltuk meg. A nyers Hi-C könyvtárakat (.fastq fájlok) a Juicer eszköztárral (Durand et al. 2016) dolgoztuk fel alapértelmezett paraméterek használatával, kivéve, hogy a használt restriktív enzimek vágóhelyeit (GATC és GANTC) adtuk meg a szkriptfájlokban. A Hi-C readeket az *A. thaliana* TAIR10 referenciagenomhoz térképeztük, és a MAPQ $\geq$ 30 readeket tartottuk meg a további elemzéshez. Az interakciós térképek vizuális ábrázolására és elemzésére a HiGlass eszköztárat (Kerpedjiev, 2018) használtuk. A Hi-C interakciók mennyiségi különbségeit (Col-0 (vad típusú) vs. ndx1-4 mutáns) 25 kb-os felbontásnál a Slitherine pipeline (<https://gitlab.pasteur.fr/gmillot/slitherine>) segítségével vizsgáltuk. A Slitherine a Serpentine eszközt (Baudry, 2020) futtatja a zaj csökkentésére a Hi-C interakciós térképeken, és azonosítja a statisztikailag szignifikáns különbségeket a Hi-C mátrixok között.

## 4. Eredmények

### 4.1. R-hurok szabályozó gének farmakogenomikai vizsgálata - fókuszban a rákterápia

Humánspecifikus R-hurok regulátorokat egyáltalán nem ismertünk a közelmúltig. Ekkor jelent meg egy tanulmány (Wang et al. 2018), amelyben több száz potenciális R-hurok-kötő fehérjét azonosítottak *in vitro*, amely megnyitotta az utat az R-hurok regulátor gének vizsgálatához különféle fiziológiás és patológiás folyamatokban. A rákos megbetegedések kapcsán az elmúlt évek kutatásában világossá vált, hogy az R-hurok kontrollálatlan keletkezése és a tumorokra jellemző genom instabilitás között van valamilyen mechanikai kapcsolat, azonban a résztvevő faktorokat és funkcionális kölcsönhatásokat nem tudták azonosítani. A legtöbb onkogén fehérje a sejtciklus beindítása mellett a transzkripció gépezetét is erősen aktiválja, beleértve például mindhárom RNS polimerázt és az általános transzkripció faktorokat (Kotsantis et al. 2016). Ez fokozott R-hurok képződéshez és replikációs stresszhez vezet (a repliszóma és az R-hurok összeütközése révén), amely a replikációs apparátus szétesése miatt nagymennyiségű DSB-t generál (Gan et al. 2011). A DSB-k rekombinációs folyamatokat indítanak el, amelyek kromoszómaaberrációt és hibás testvérkromatid szegregációt okoznak. E folyamatokat a tumorsejtek meglehetősen jól tolerálják (pl. az apoptózis gátlása révén), ami összességében elősegíti a kontrollálatlan sejtburjánzást és a metasztázisok keletkezését.

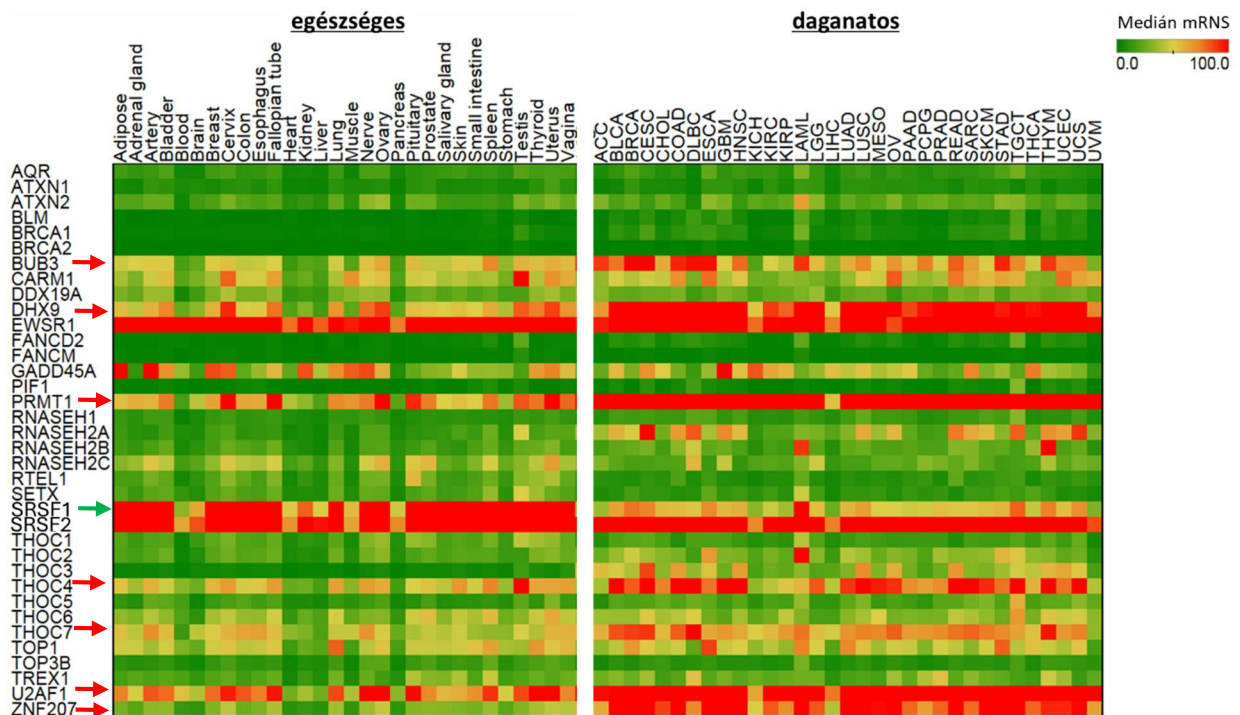
A fenti összefüggések mélyebb megértéséhez farmakogenomikai vizsgálatokat végeztünk a szakirodalomban azonosított (és kísérletesen validált) R-hurok regulátor fehérjékkel, amely azon az elképzelésen alapult, hogy a daganatok permanensen magas R-hurok szintje kihasználható a rákos sejtek kemoterápiás kezelésekkal szembeni érzékenyítésére. A tumorsejtek R-hurok struktúrákra adott endogén válaszát felerősítve ugyanis sebezhetőbbé tehetők bizonyos citosztatikumokkal szemben, amely végsősoron új R-hurok alapú kombinációs terápiák kifejlesztéséhez vezethet.

Elemzéseink során azt vizsgáltuk, hogy a kulcsfontosságú R-hurok kötő fehérjék összefüggésben állnak-e a rák túlélésével és a gyógyszerérzékenységgel. Ehhez elsőként statisztikai asszociációt kerestünk a potenciális R-hurok gének és a daganatképződés között. Meghatároztuk, hogy a Wang et al. tanulmányában azonosított RNS-DNS hibrid kötő fehérjék (Wang et al., 2018) közül hány szerepel a tumorgének regiszterben (Repana et al. 2019). A tumorgén regiszter 2372 gént tartalmaz <http://network-cancer-genes.org/>, amelyek szomatikus mutációi bizonyítottan tumor driver szereppel bírnak. A vizsgált 448 R-hurok kötő fehérje közül 92 volt tumor driver gén, amely statisztikailag szignifikáns dúsulást jelent a véletlen

asszociációhoz képest ( $p = 0,005792$ ; 2-prop z teszt). A statisztikai asszociáció bizonyítása után az elérhető R-hurok regulátor screen-ek (Wang et al. 2018; Cristini et al. 2018) és releváns szakirodalmi adatok alapján kiválasztottuk azokat a teszt géneket az elemzéseinkhez, amelyek nagy valószínűségű R-hurok regulátor gének. Ehhez vettük az R-hurok screen-ek közös metszetét (közös találatokat) és a halmazt tovább szűkítettük az R-hurok szakirodalom alapján, amely végül 36 nagy megbízhatóságú R-hurok regulátort eredményezett. A kiválasztott gének fontos molekuláris útvonalakban és biokémiai folyamatokban játszanak szerepet (3. Táblázat; Anyagok és Módszerek fejezet), melyeknek szerepe lehet a rák kialakulásában (pl. DNS-topológia; RNS- DNS hibrid ribonukleázok és helikázok; RNS érés, splicing és export; DNS károsodás; kromatin módosítások).

#### 4.1.1. Daganatos betegek túlélése és a daganatok génexpressziója közötti összefüggés analízise

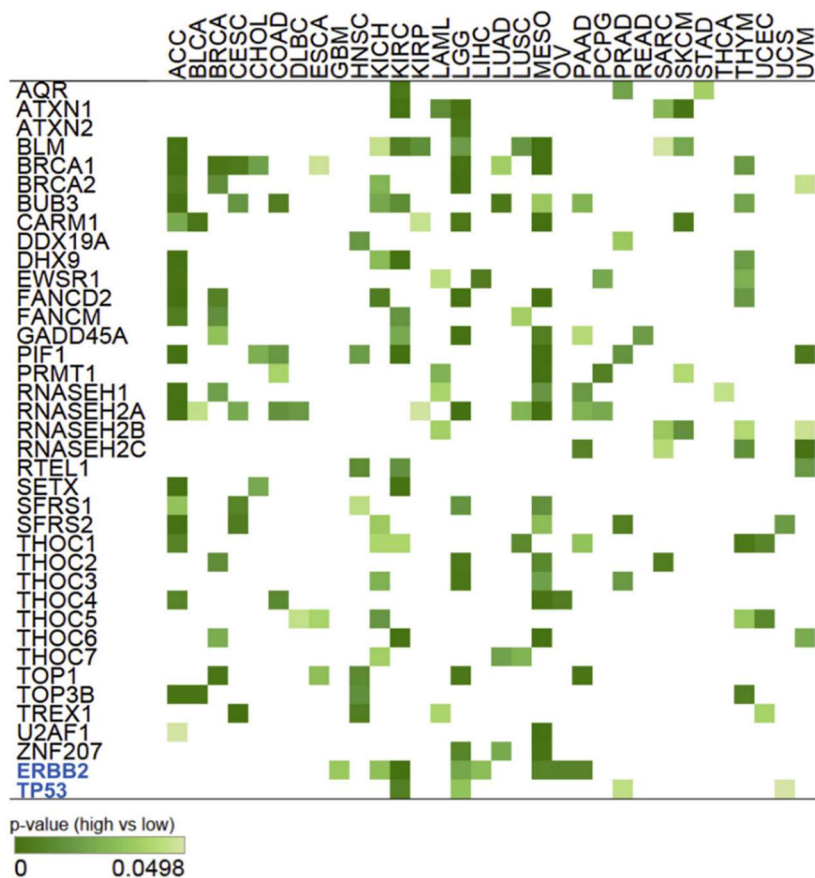
Az R-hurok gének mRNS-expresszióját a Cancer Genome Atlas (TCGA) adatbázisból töltöttük le, összehasonlítottuk az egészséges szövetek és a primer tumorok génexpressziós értékeit (11. Ábra).



11. Ábra Az R-hurok gének mRNS expressziós szintjének medián értékei egészséges szövetekben és primer daganatokban. Az adatok több ezer betegből illetve szövetmintából

meghatározott mRNS-seq értékek (medián), amelyet a Cancer Genome Atlas (TCGA) adatbázis alapján számítottunk ki. A zöld és piros cellák intenzitása arányos a mRNS expresszió mértékével. Az R-hurok gének sorok szerint, míg a szövet, illetve tumor típusok oszlopok szerint vannak rendezve. Nyilakkal kiemeltük azokat a géneket, amelyek szignifikánsan emelkedett vagy csökkent expressziót mutatnak a daganatokban a normál szövetekhez képest.

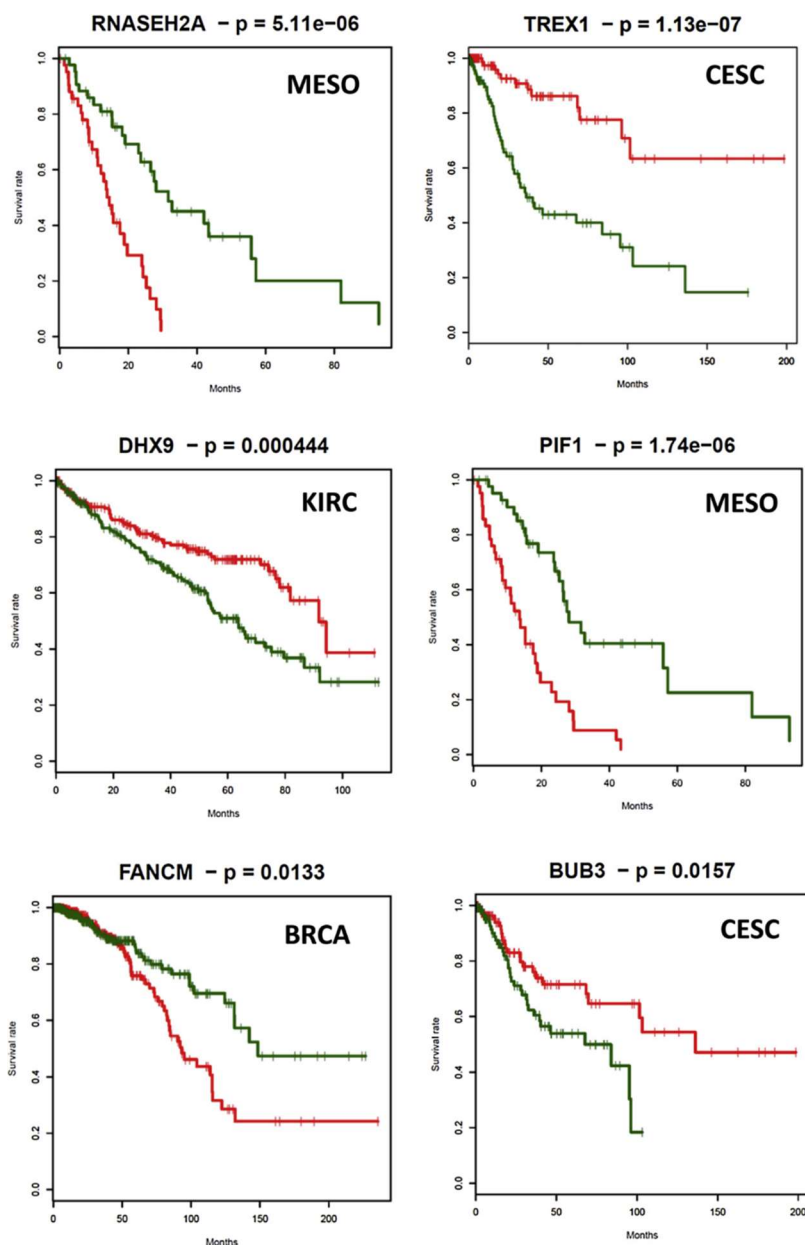
A 11. Ábrán látható, hogy a BUB3, DHX9, PRMT1, THOC4, THOC7, U2AF1 és ZNF207 (BUGZ) expressziója több primer daganatban megnövekedett a normál szövetekhez képest, míg az SRSF1 (ASF/SF2) a legtöbb daganat esetén csökkent (kivéve az akut myeloid leukémiát; LAML). Ezt követően a primer tumorokban mért génexpressziós értékeket nagyszámú rákos betegcsoport túlélési adataival kapcsoltuk össze, majd megvizsgáltuk, hogy az R-hurok regulátorok transzkripció szintje korrelál-e a betegek túlélési arányával. A TCGA génexpressziós (RNS-seq) és túlélési adatait felhasználva 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; 12. Ábra).



12. Ábra Az R-hurok regulátorok expressziója és túlélés asszociációi primer tumorokban. Asszociációs hőterkép, amely a szignifikáns túlélés asszociációt mutató R-hurok regulátorokat

mutatja (zöld színű cellák). Túlélési elemzést Kaplan-Meier plotter-rel készítettünk az R szoftver „survival” csomagjával. A szignifikancia szint  $p < 0,05$  volt. Minden  $p$ -érték korrigálva lett többszörös összehasonlításra a Benjamini-Hochberg módszerrel. Az R-hurok gének sorok szerint, míg a tumor típusok oszlopok szerint vannak rendezve. A zöld szín árnyalata fordítottan arányos a túlélési arány (overall survival: OS)  $p$  értékével. A szignifikáns asszociációk száma: 179. Az utolsó két sorban pozitív kontrollként kék színnel kiemeltünk egy onkogént (ERBB2 - HER2) és egy tumorszuppresszort (TP53), amelyek rák asszociációja közismert és jól dokumentált, viszont nincs ismert R-hurok funkciójuk. Ezekhez hasonlítva az R-hurok regulátorokra kapott asszociációkat meg lehet ítélni a számításaink biológiai relevanciáját. Az R-hurok regulátorok hasonló mértékű vagy magasabb túlélés asszociációt mutattak a daganatokban, mint a pozitív kontroll gének.

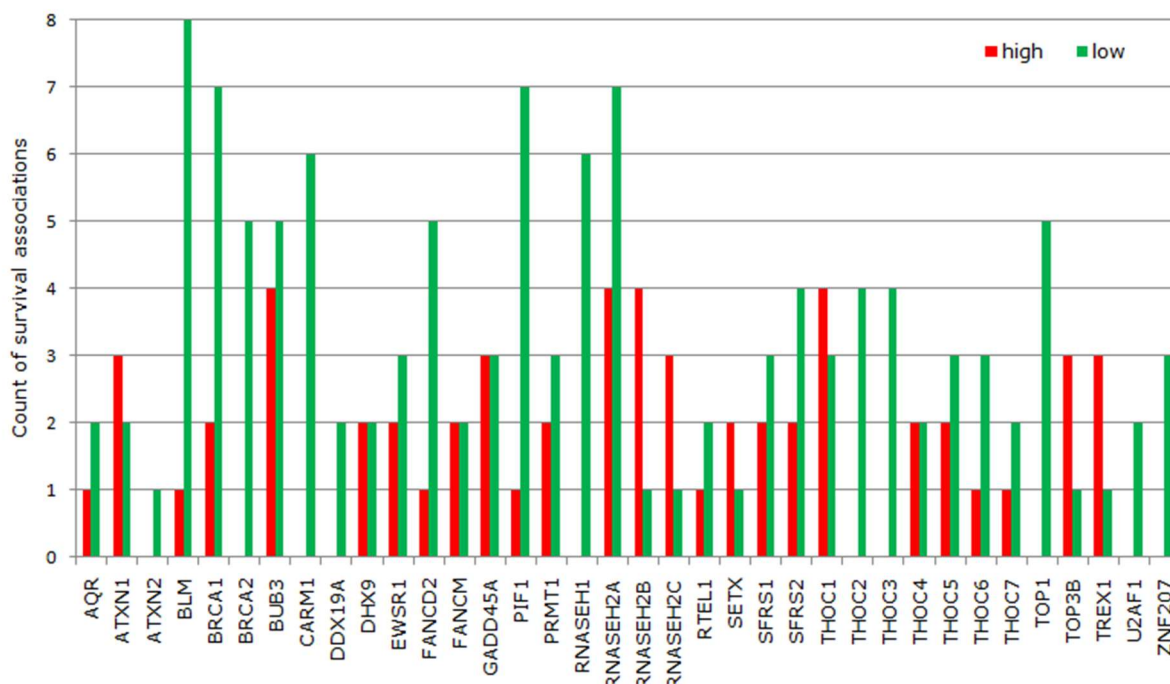
Az R-hurok regulátorokat magasan expresszáló és alacsonyan expresszáló betegcsoportok túlélési esélyei szignifikánsan és egyértelműen elváltak egymástól, és az esetek 70%-ában ( $n=123$ ,  $p < 0,05$ ) az R-hurok gének alacsony expressziója mutatott összefüggést a rákos betegek hosszabb túlélésével: az RNASEH2A, PIF1 (**13. Ábra**), THOC6 és PRMT1 alacsony expressziója például a túlélési idő szignifikáns meghosszabodását eredményezte mesotheliomában (MESO), míg az alacsony FANCM mRNS-szint előnyös volt az emlőrákos betegek (BRCA) túlélése szempontjából (**13. Ábra**). 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 30%-ában ( $n=52$ ,  $p < 0,05$ ) az R-hurok gének magas expressziója társult a jobb túlélési aránnyal; például a TREX1 és a BUB3 magas expressziója előnyös volt a méhnyakrákos betegeknél (CESC; **13. Ábra**).



**13. Ábra** Reprezentatív túlélési görbék különböző daganattípusokban. A túlélési görbék a magas expressziójú (piros) és alacsony expressziójú (zöld) csoportok túlélési arányát (overall survival: OS) mutatják különböző daganattípusokban. Az elemzést Kaplan-Meier plotter-rel készítettük az R szoftver „survival” csomagjával. Szignifikancia szint:  $p < 0,05$ . Minden  $p$ -érték korrigálva lett többszörös összehasonlításra a Benjamini-Hochberg módszerrel. Az R-hurok gének rövidítése és a  $p$ -értékek a diagramok felett, míg a daganatok rövidítése a négyzetek belül kerültek feltüntetésre. Rövidítések: MESO - mesothelioma, CESC - méhnyakrák, KIRC - vesesejtes karcinóma, BRCA - emlő invazív karcinóma.

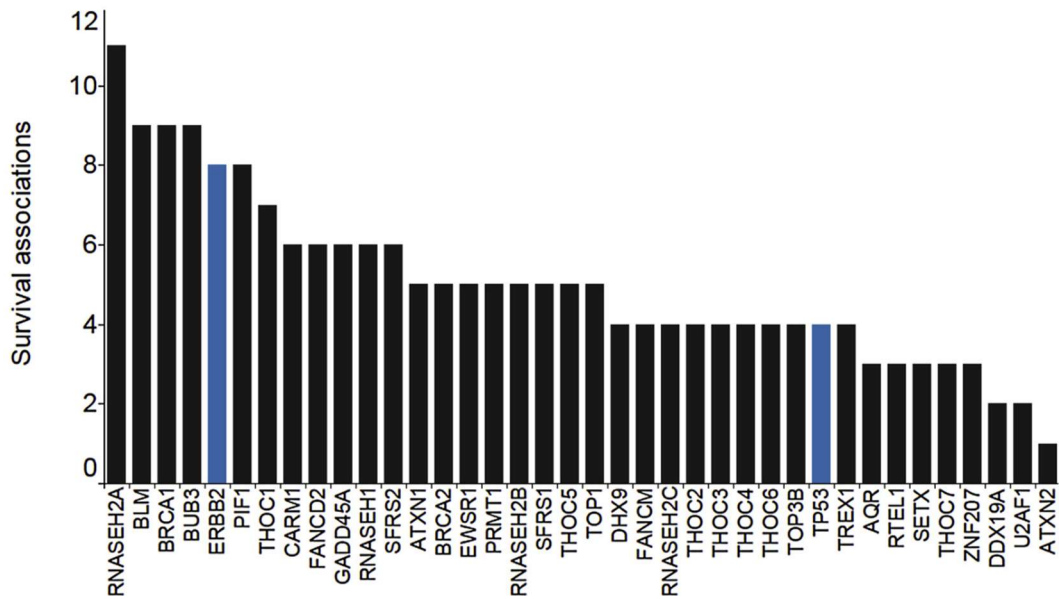
Tíz R-hurok gén esetében a hosszú távú túlélés kizárólag azoknak a betegeknek a csoportjában volt megfigyelhető, akinek a daganatai alacsony génextpressziót mutattak, függetlenül a daganat típusától (ATXN2 (n=1) , BRCA2 (n=5), CARM1 (n=6), DDX19A (n=2), RNASEH1 (n=6),

THOC2 (n=4), THOC3 (n=4), TOP1 (n=5), U2AF1 (n=2), ZNF207 (n=3)). A többi 26 R-hurok gén esetén a magas vagy alacsony expressziójú csoportok túlélésszociációja ráktípusonként változó (14. Ábra).



**14. Ábra** Az R-hurok regulátorok túlélés asszociációinak száma a vizsgált daganattípusokban a génexpresszió változása szerint csoportosítva. Az R-hurok regulátor géneket két csoportra osztottuk aszerint, hogy azok csökkent (zöld oszlopok) vagy emelkedett (piros oszlopok) mRNA expressziója mutat szignifikáns túlélés asszociációt a vizsgált daganatokban.

A szignifikáns túlélésszociációk száma  $n=179$  (14. Ábra); ha ezek számossága szerint csökkenő sorrendbe rendezzük az R-hurok géneket, az RNASEH2A, BLM, BRCA1, BUB3 és PIF1 gének szerepe több ráktípus esetében is kiemelkedik a túlélés szempontjából. Ezzel szemben az ATXN2, DDX19A és U2AF1 hatása csak a daganatok néhány típusára korlátozódik. Annak bizonyítására, hogy az analízisünk képes azonosítani a valós génexpresszió - rák túlélés összefüggéseket, elemzésünkbe egy onkogén (ERBB2 - HER2) és egy tumorsuppresszor (TP53) gént is bevontunk, amelyek ismert pozitív kontrollok a rák asszociációjára, és nincs ismert R-hurok funkciójuk (15. Ábra - kékkel kiemelve). Az R-hurok gének génexpressziója 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 fehérjékkel kapcsolatos megfigyeléseink relevanciáját erősíti.

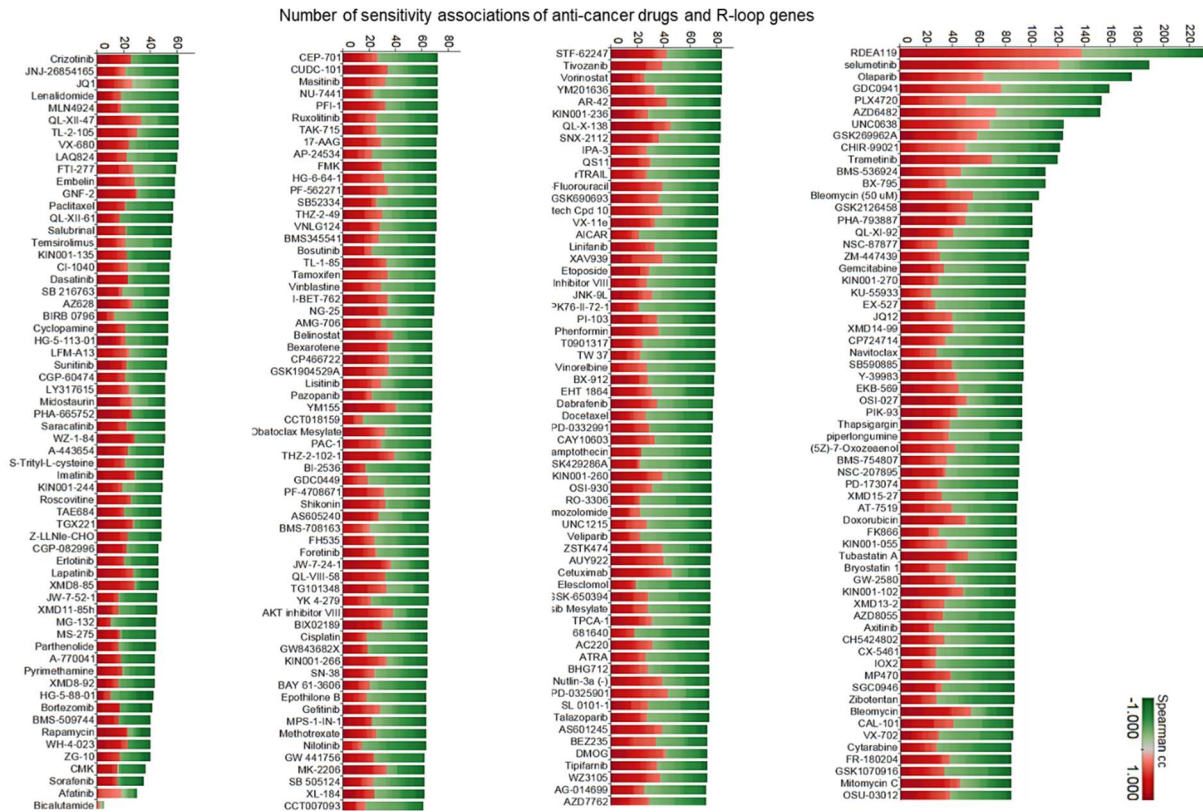


**15. Ábra** Az R-hurok regulátorok túlélés asszociációinak száma a vizsgált daganattípusokban, csökkenő sorrendben. A hisztogram a túlélési asszociációk számának eloszlását mutatja a vizsgált R-hurok gének között. Az ERBB2 (HER2) onkogén és a TP53 tumorszuppresszor gén ismert pozitív kontrollok (kék színnel kiemelve) daganatos megbetegedésekben, mutációjuk daganatok kialakulásához vezet és nincs megállapított R-hurok funkciójuk. Az R-hurok regulátorok (fekete oszlopok) hasonló mértékű túlélés asszociációt mutattak, mint a pozitív kontroll gének.

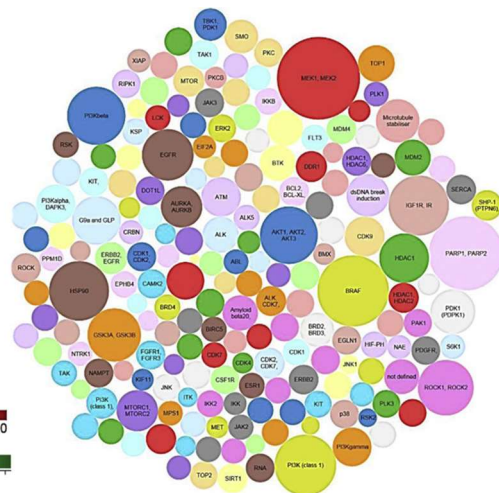
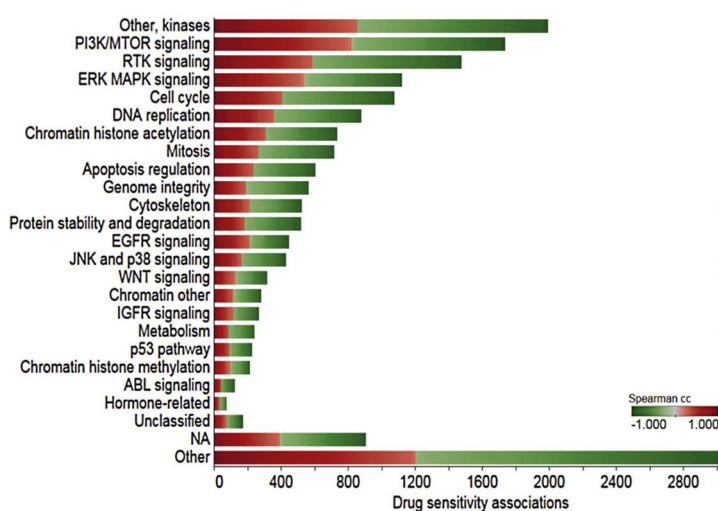
#### 4.1.2. Sejtvonalak génexpressziója és a drogszenzitivitás közötti összefüggés analízise

A következő lépésben szinergisztikus gyógyszer kölcsönhatásokat kerestünk a túlélés asszociációt mutató primer tumorokkal szövettanilag és genetikailag egyező tumorsejtvonalakban. Vizsgálatunkban 297 FDA (US Food and Drug Administration) által engedélyezett terápiás készítmény érzékenységi interakcióit határoztuk meg 1065 tumorsejtvonal farmakogenomikai adatai alapján (GDSC, (Yang et al. 2013)). A vizsgált drogok a biológiai útvonalak széles skáláját fedik le, beleértve a protein kináz jelátvitelt, a citoskeleton működését, a DNS-replikációt, a DNS-javítást és sejtciklus szabályozást.

Számításainkban azonosítottuk azokat a tumor típusokat, amelyek érzékenyebben reagálnak (vagy rezisztenssé válnak) bizonyos terápiákra egy adott R-hurok regulátor expressziójának függvényében. Összesen 22414 drog-érzékenység és génexpresszió asszociációt azonosítottunk (22414 -  $p < 0,05$ ; 508 -  $FDR < 0,05$ ). A szignifikáns kölcsönhatások teljes száma jelentős eltérést mutat gyógyszerenként (70–230 kölcsönhatás gyógyszerenként; **16. Ábra**) és a drogok által megcélzott molekuláris útvonalak szerint csoportosítva is (**17. Ábra**).



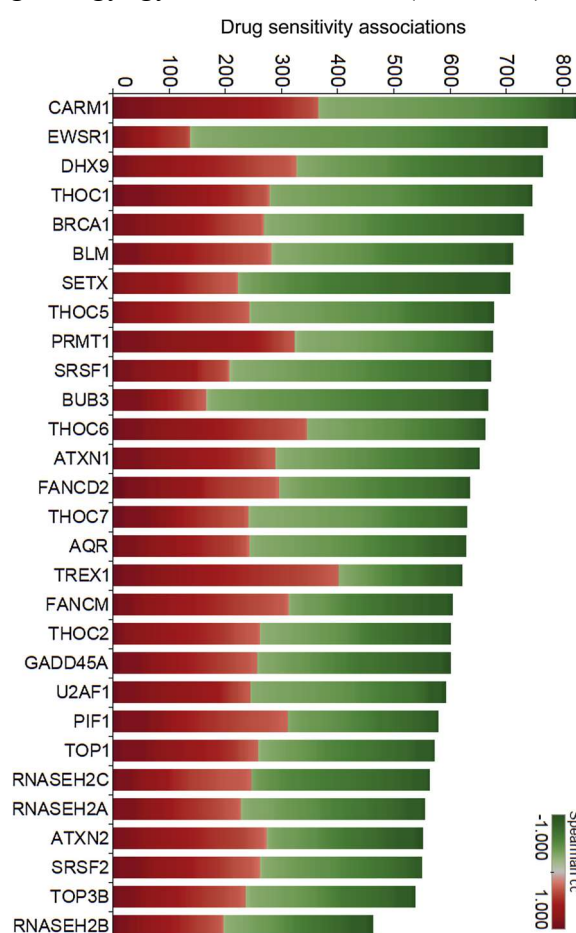
16. Ábra Az R-hurok gének génexpressziójának gyógyszer érzékenységgel való összefüggései drogok szerint csoportosítva. A szignifikáns pozitív (piros) és negatív (zöld) génelcsönhatások a gyógyszer  $IC_{50}$ -értékeinek és az R-hurok gén mRNS-szintjének korrelációján alapulnak. Drogonként van csoportosítva az összes vizsgált sejtvonalból származó asszociáció az összes vizsgált R-hurok génre vonatkozóan.



17. Ábra Az R-hurok gének génexpressziójának gyógyszerérzékenységgel kapcsolatos összefüggései molekuláris útvonalak és gyógyszer-célpontok szerint csoportosítva. Bal oldalon: A gyógyszerkölsönhatások megoszlása a molekuláris útvonalakon. A piros és zöld szín a pozitív illetve a negatív asszociációkat jelzi. A szignifikancia szintje  $p < 0,05$ . Jobb oldalon: A

vizsgált R-hurok regulátorok gyógyszerérzékenységi kölcsönhatásai a gyógyszercélpontok (targetek) szerint csoportosítva. A körök mérete arányos a gyógyszercélpontok előfordulási gyakoriságával. Az Ábra az R szoftver ggplot csomagjával készült.

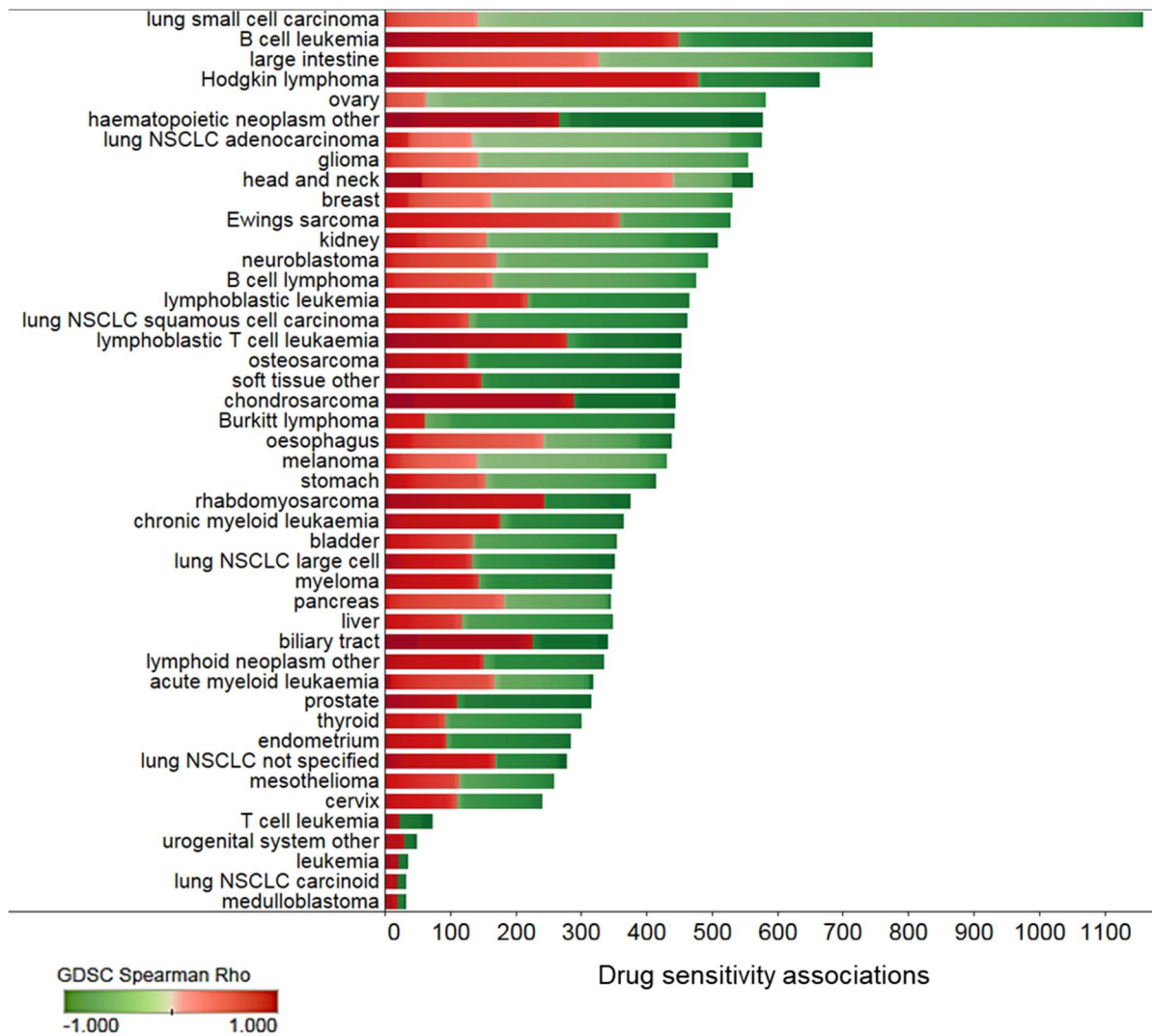
A leginkább reprezentált útvonalak közé tartozott a Ser/Thr protein kináz útvonal és a PI3K/RTK/MAPK jelátvitel (17. Ábra, bal oldali panel), míg a leggyakoribb gyógyszercélpontok a MEK1/2, BRAF, PARP1/2, HSP90, AKT1/3, GSK-k, PI3K-k, IGF1R, ROCK1/3 és EGFR voltak (17. Ábra, jobb oldali panel). A vizsgált R-hurok gének 80%-ánál találtunk szignifikáns gyógyszerérzékenységi asszociációt (29  $p < 0,05$ ; kivéve a BRCA2, BUGZ, DDX19, RNASEH1, RTEL1, THOC3 és THOC4), ebből a CARM1, EWSR1, DHX9 és a THOC1 mutatta a legtöbb gyógyszerkölsönhatást (18. Ábra).



**18. Ábra** Az R-hurok gének gyógyszerérzékenységi kölcsönhatásai különböző daganatok sejtvonalalaiban. A zöld és a piros színek szignifikáns negatív/pozitív korrelációt mutatnak az R-hurok gének expressziója és a gyógyszerérzékenység között. A szignifikancia szintje  $p < 0,05$ .

Jelentős eltéréseket figyeltünk meg a különböző rákos sejtvonalak közötti gyógyszerkölsönhatások 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 (19. Ábra). Ezek a különbségek arra utalnak, hogy az RNS-DNS hibrid kötő fehérjék hatása eltérő kimenetelű lehet a különböző kemoterápiás kezelésekre adott válaszokban a genomiális kontextustól/ráktípustól függően.

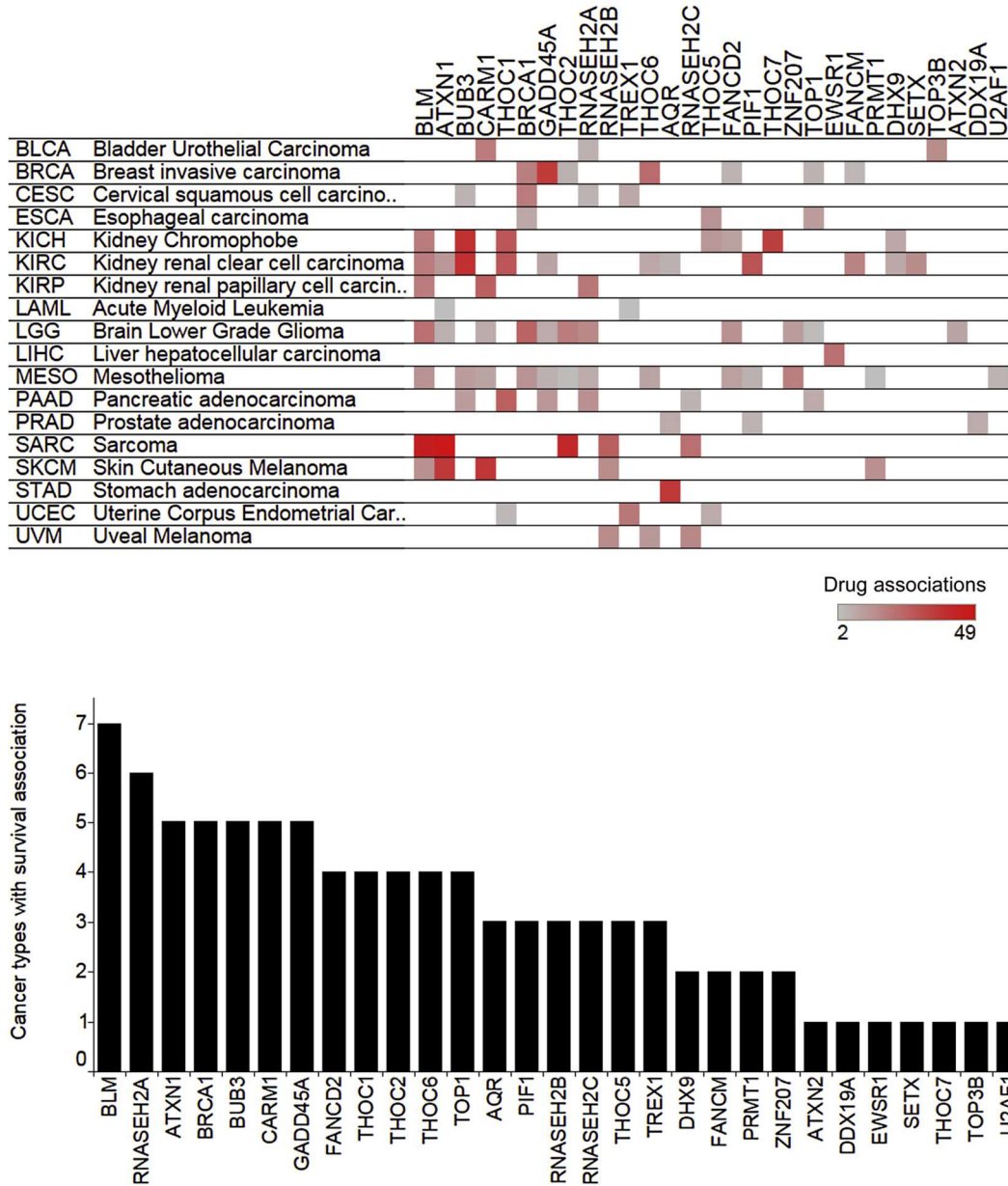


19. Ábra Az R-hurok gének gyógyszerérzékenységi kölcsönhatásai tumor sejtvonalak szerint csoportosítva. A zöld a negatív, míg a piros a pozitív génexpresszió - drog szenzitivitás asszociációt jelzi.

#### 4.1.3. Túlélés és drog kölcsönhatások asszociációja

Mivel a természetes daganatokból származó tumorsejtvonalak jól tükrözik a primer rákok genetikáját/epigenetikáját és szövettípusát, az azonosított gyógyszerkölcsönhatásokat leszűkítettük azon R-hurok génekre, amelyek szignifikáns túlélési asszociációkat mutattak a megfelelő primer tumor esetében. Ezáltal 1630 szignifikáns túlélés és gyógyszerkölcsönhatást

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 gyógyszerkölsönhatás asszociációja, vagy a vizsgált sejtvonalak között nem szerepelt a primer daganatnak megfelelő sejtvonal) (20. Ábra).



**20. Ábra** Az R-hurok gének túlélési összefüggései azokban a primer daganatos megbetegedésekben, melyek jelentős gyógyszerérzékenységi összefüggéseket mutattak az azonos típusú tumor sejtvonalakban. *Felső panel: A szignifikáns túlélés-asszociációt mutató tumorok gyógyszerkölsönhatásai. Sorok: tumor típusok. Oszlopok: R-hurok regulátor gének. A cellák a szignifikáns gyógyszerkölsönhatások számát mutatják. A piros szín árnyalata arányos az adott tumorban adott R-hurok expresszió esetén mért gyógyszerinterakciók számával. Alsó panel: A hisztogram a túlélési összefüggések számszerű megoszlását mutatja a vizsgált R-hurok*

*gének között, azokban az esetekben, melyekben a rák típusához gyógyszerkölsönhatások is társultak. A szignifikancia szintje  $p < 0,05$ . A szignifikáns asszociációk száma 1630.*

A túlélés és drog kölcsönhatások asszociációját vizsgálva a következő tendenciákat figyeltük meg:

i) A legtöbb túlélési interakció a következő géneknél figyelhető meg, melyek szignifikáns drog kölcsönhatással is rendelkeznek: BLM, RNASEH2A, ATXN1, BRCA1, BUB3, CARM1, GADD45A (**20. Ábra alsó panel**).

ii) A THOC2 magas expressziója szarkóma sejtvonalakban a CX-5461 (G4 ligand / RNS-polimeráz I inhibitor) magas IC<sub>50</sub>-értékével társult, ami arra utal, hogy a CX-5461 kevésbé hatékony a magas THOC2 expressziót mutató szarkómák kezelésében. Ehhez képest a CX-5461 alacsony IC<sub>50</sub>-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 IC<sub>50</sub>-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 (**16. Ábra**). A legtöbb sejtvonal rezisztens RDEA119-re és szelumetinibre, olaparibra viszont érzékenységet mutat magas R-hurok gén génexpressziós szint mellett. 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, ezzel ellentétben a FANCM és TREX1 esetében 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 rezisztensnek bizonyultak a kezelésre. Az Olaparib klinikai vizsgálat alatt áll mesotheliomában (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 ruxolitimib (NCT01562873 - 2. fázis, NCT02928978 - 2. fázis).

vi) A magas BRCA1 génexpressziót mutató nyelőcsőkarcinóma sejtvonalak alacsony IC50-értékkel jártak a motesamib-, cisplatin- 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.

Összességében elmondható, hogy az R-hurok regulátorok expressziós státusza jelentősen befolyásolja a betegek túlélési esélyeit, valamint a gyógyszeres kezelésekre adott választ is módosíthatja. Ezen farmakogenomikai összefüggések klinikai felhasználása még várat magára, azonban megfelelő preklinikai vizsgálatok elvégzése után alkalmas lehet a betegcsoportok prioritizálására. A rákos sejtekben zajló R-hurok képződési folyamatok és az azokat kontrolláló fehérjék tehát potenciális biomarkerek és/vagy terápiás célpontok, amelyek alkalmasak

lehetnek egyes daganattípusok kemoterápiás szerekkel szembeni érzékenyítésére. Eredményeink, az alapkutatási jelentőségükön túl, új utat nyithatnak az epigenetikai terápiák továbbfejlesztéséhez, amely a daganatok R-hurok szintjének módosításán alapul.

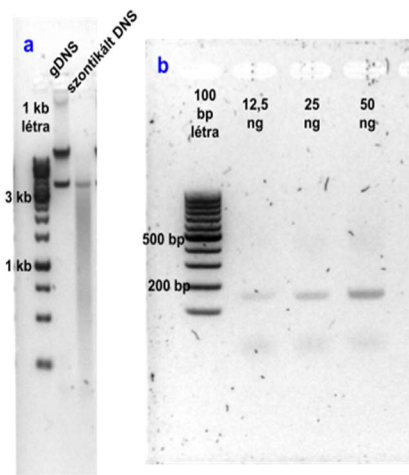
## **4.2. R-hurok szabályozó gének azonosítása élesztő gén deléciós könyvtár segítségével.**

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.

### **4.2.1. 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 géndelációkat azonosító bárkódokat (BC), végül az egyes bárkódok mennyiségét új generációs szekvenálás segítségével összesítettük (**9. Ábra**). Így lehetővé vált a bárkód környezetében megmérni az R-hurok szintkülönbségeket 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 (**21.a Ábra**). 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 (**21.b Ábra**).



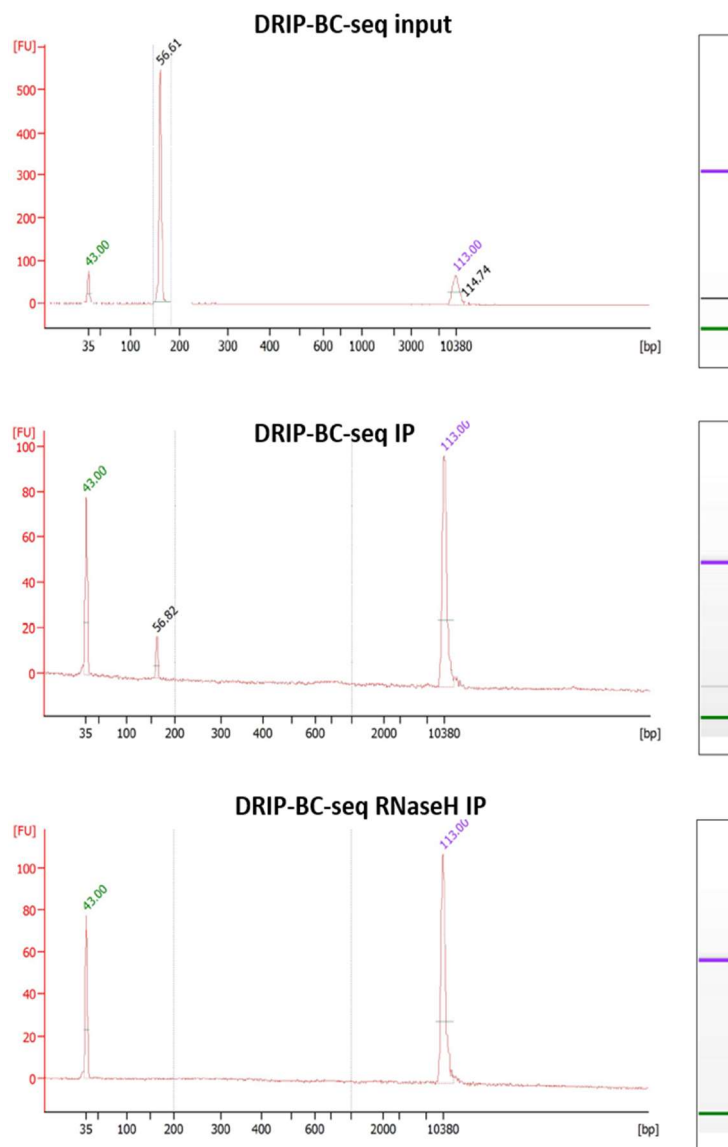
**21. Ábra** Fragment méretek a DRIP-BC-seq különböző szakaszaiban.

*a, DRIP-be bemenő DNS fragmentek*

*eloszlása*

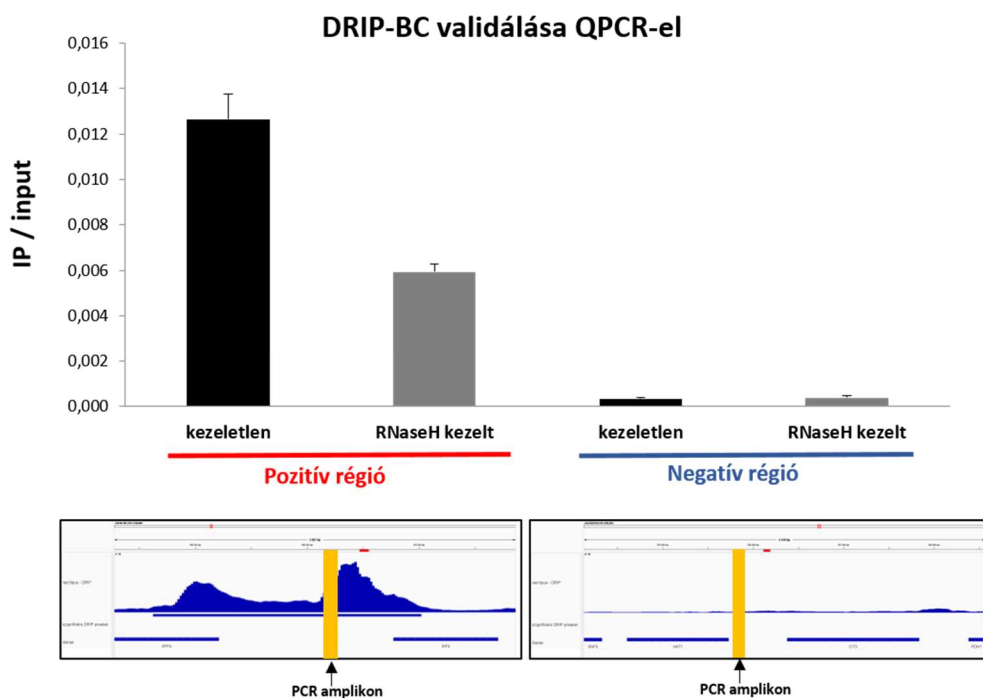
*b, bárkód PCR linearitásának ellenőrzése*

Az immunprecipitációt, RNázH előkezelt mintán is elvégeztük, viszont a bárkód PCR az RNázH előkezelt DNS-ből immunprecipitált mintán nem eredményezett terméket (**22.Ábra**). Feltételezhetően az RNázH 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.



**22. Ábra** Bárkód PCR termék Agilenten Bioanalyzer készülékkel vizsgálva. A legelső kromatogramon az RNázH előkezelt minta IP eluátumon végzett PCR eredménye látható. Ezen a mintán a PCR nem eredményezett terméket.

A DRIP-BC-seqhez készített DRIP mintákat QPCR-el is ellenőriztük egy R-hurok szempontjából pozitív és negatív genomi régió (**23. Ábra**). Az RNázH 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 RNázH kezelt és kezeletlen mintákban egyaránt.

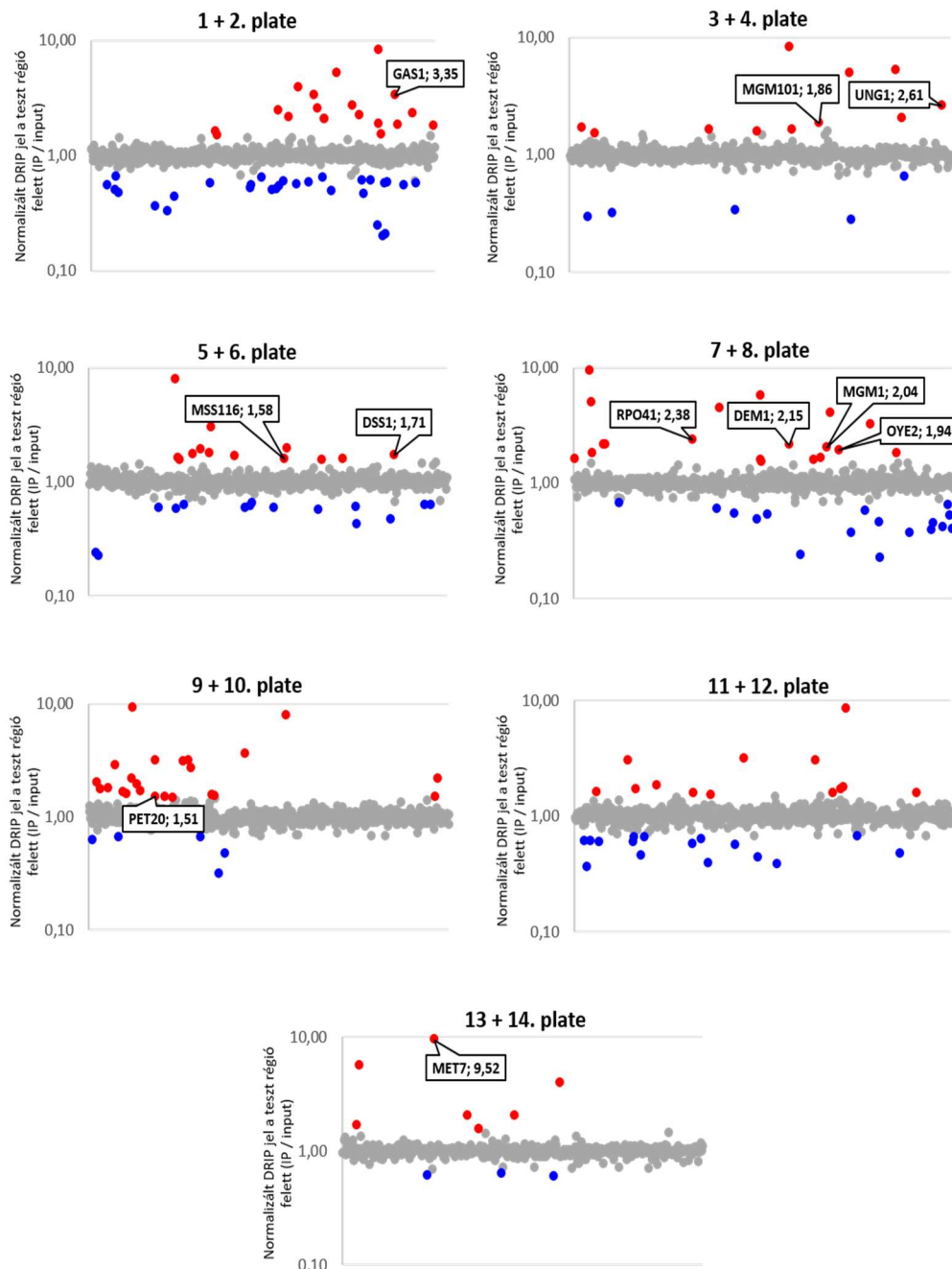


**23. Ábra DRIP-BC-seq validálása QPCR-el pozitív és negatív R-hurok régió.** A diagramon a technikai triplikák átlagából számolt IP/input és az IP/input variabilitása (IP/input variabilitása =  $(\sqrt{(\text{input szórása} / \text{input átlaga})^2 + (\text{IP szórása} / \text{IP átlaga})^2}) * (\text{IP átlaga} / \text{input átlaga})$ ) van ábrázolva.

#### 4.2.2. 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 ( $\text{IP}/\text{input} > 1,5$ ), 89 törzsben pedig szignifikánsan csökkent ( $\text{IP}/\text{input} < 0,67$ ) a DRIP jel (**24. Ábra**). 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 (**9.3. Függelék**). A szignifikánsan magasabb DRIP jelű törzsek közül kiválasztottunk 11 mitokondriális funkcióval bíró törzset (**4. Táblázat, 24. Ábra** - a kiválasztott törzsek DRIP-BC-seq eredménye jelölve) 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 (25. Ábra). 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.

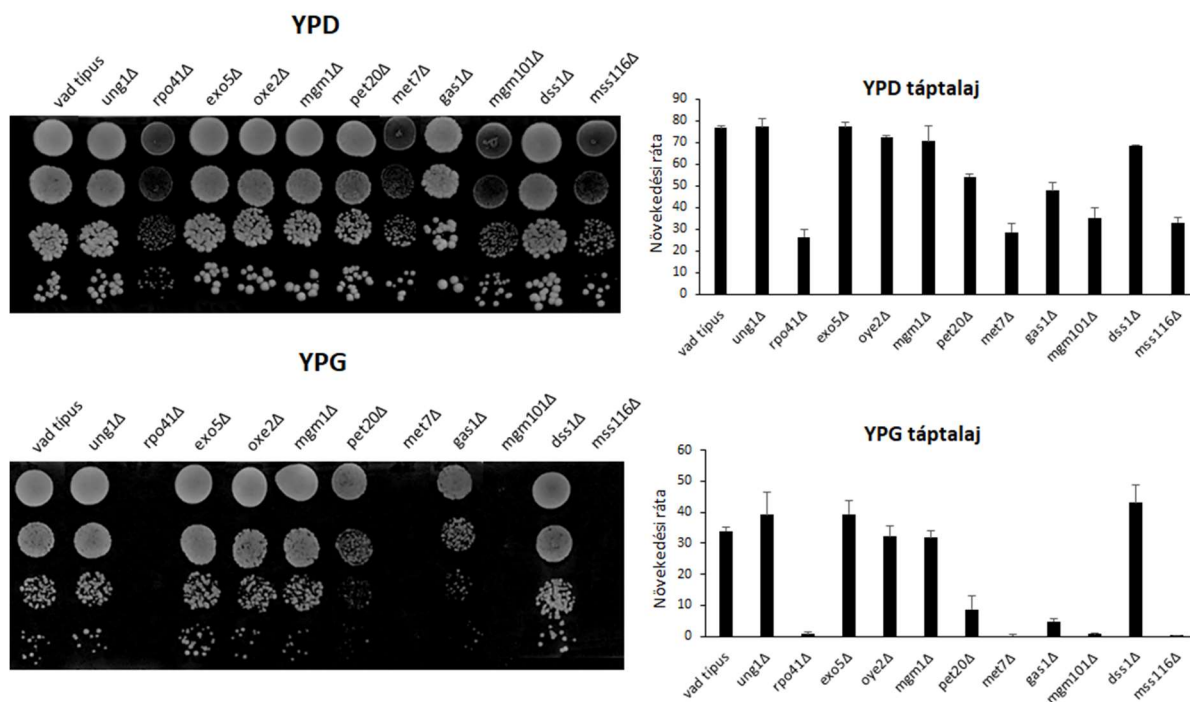


24. Ábra A közel 4200 gendelési törzs normalizált DRIP-BC-seq eredménye. A piros színű pontokkal jelölt törzsekben a DRIP jel szignifikánsan magasabb ( $IP/input > 1,5$ ), a kék színnel jelölt törzsekben a DRIP jel alacsonyabb ( $IP/input < 0,67$ ) az átlaghoz képest a bárkód ~5 kb

környezetében. A diagramokon két biológiai replika eredményének átlaga van megjelenítve. A validálásra kiválasztott törzsek eredményei vannak kiemelve az egyes diagramokon, deletált gén neve és IP/input értéke az Ábrán a boxban van feltüntetve.

#### 4. Táblázat Validálásra kiválasztott DRIP-BC-seq találatok

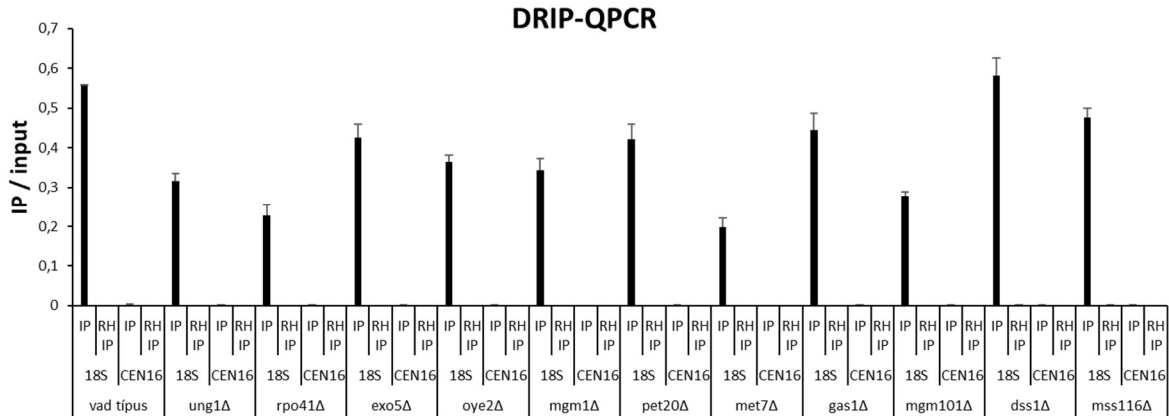
Gén szimbólum	DRIP-BC-seq IP/Input (Rep1 és Rep2 átlaga)	Gén teljes neve	Fehérje elhelyezkedése (érintett sejtorganellek)
UNG1	2,61	uracil-DNS glikoziláz	mitokondrium, sejtmag
RPO41	2,38	DNS alapú RNS polimeráz	mitokondrium, citoplazma
EXO5	2,15	EXOnukleáz V	mitokondrium
OYE2	1,94	NADPH dehidrogenáz	mitokondrium, sejtmag, citoplazma
MGM1	2,04	Mitokondriális genom karbantartó - Mitochondrial Genome Maintenance (mitokondriális GTPáz)	mitokondrium
PET20	1,51	PETite kolóniák	mitokondrium
MET7	9,52	Folypoliglutamát szintáz (METhionine requiring)	mitokondrium, endoplazmatikus retikulum, citoplazma
GAS1	3,35	1,3-beta-glükanoziltranszferáz (Glycophospholipid-Anchored Surface protein)	mitokondrium, sejtmembrán, sejtfa
MGM101	1,86	Mitokondriális genom karbantartó - Mitochondrial Genome Maintenance	mitokondrium
DSS1	1,71	3'-5' exoribonukleáz (Deletion of SUV3 Supressor)	mitokondrium
MSS116	1,58	Mitokondriális transzkripció elonáció faktor (Mitochondrial Splicing System )	mitokondrium, citoplazma



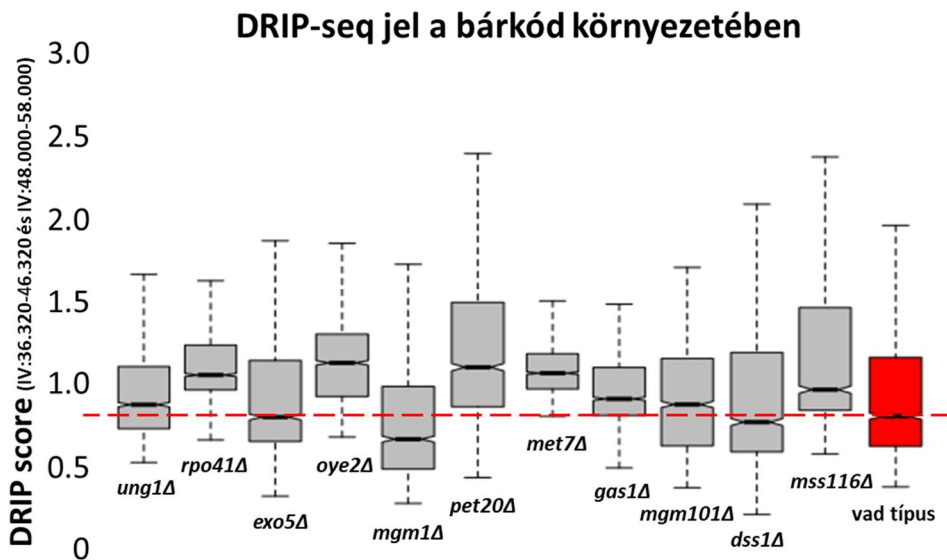
**25. Ábra DRIP-seq-re kiválasztott törzsek növekedési vizsgálata.** A diagramok két technikai replika átlagát, illetve szórását ábrázolják. A spot assay három biológiai replikában lett elvégezve, a bemutatott eredmény jól reprezentálja mind a három kísérletet.

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

Minden DRIP kísérlet el lett végezve RNázH előkezelt DNS-en is negatív kontrollként, majd QPCR-el vizsgáltuk a mintákat R-hurok szempontjából pozitív és negatív genomi régió (El Hage & Tollervey, 2017). Az RNázH kontroll mintánál a pozitív régióban (18S rDNS) nagyon alacsony jelet detektáltunk, az R-hurok negatív genomi régióban (CEN16) pedig a normál és RNázH előkezelt mintában egyaránt nagyon alacsony jelet mértünk (**26. Ábra**). 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.



**26. Ábra DRIP kísérlet hatékonyságának ellenőrzése.** DRIP-QPCR eredménye R-hurok pozitív (18S) és R-hurok negatív (CEN16) genomi régió. A diagramon a technikai triplikák átlagából számolt IP/input és az IP/input variabilitása van ábrázolva. IP - kezeletlen minta, RH IP – RNázH kezelt minta



**27. Ábra A DRIP-seq összesített eredménye a bárkód 10 kb környezetében.** Bárkódtól balra és jobbra (IV kromoszóma:48.000-58.000 és IV kromoszóma:36.320-46.320) 1000 darab, a kijelölt szakaszon random helyen lévő és 1000 nt-os hosszúságú szakasz átlagos DRIP score-ja.

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 (27. Ábra).

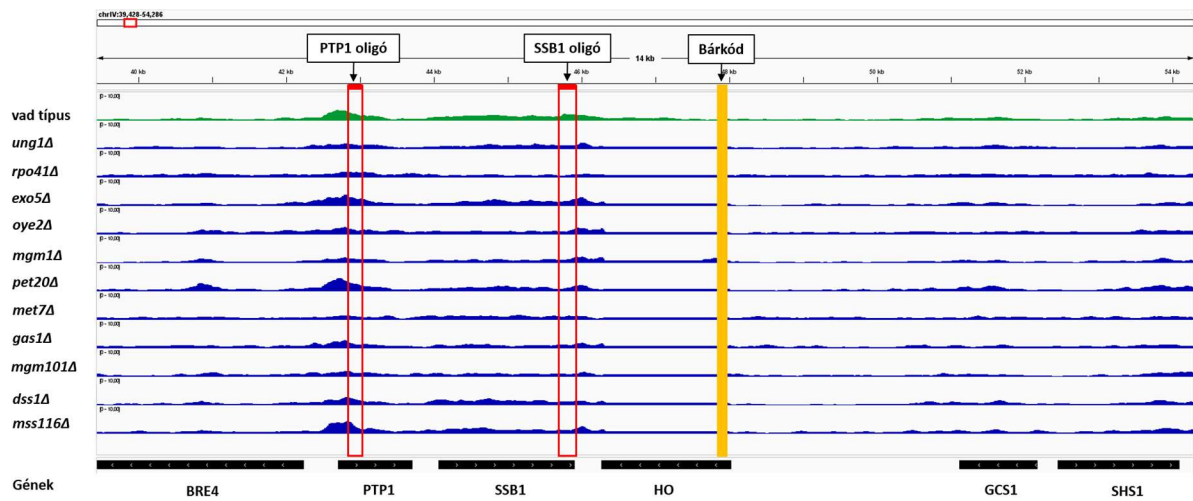
Ehhez képest a bárkód környezetében R-hurok szint növekedést mutató törzsek, a teljes genom DRIP-seq összesített peak számát tekintve, több esetben a várttól eltérő eredményt mutattak. Az *ung1Δ*, *rpo41Δ*, *oye2Δ*, *met7Δ*, *gas1Δ* mutánsokban jelentősen csökkent az összesített peak szám, tehát a vad típushoz képest az R-hurokok 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-hurokok száma. Az *mgm101Δ* mutánsban kis mértékű peak szám növekedést tapasztaltunk (**5. Táblázat**). 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.

**5. Táblázat Teljes genom DRIP-seq peak szám változásai a mutáns törzsekben a vad típushoz képest.**

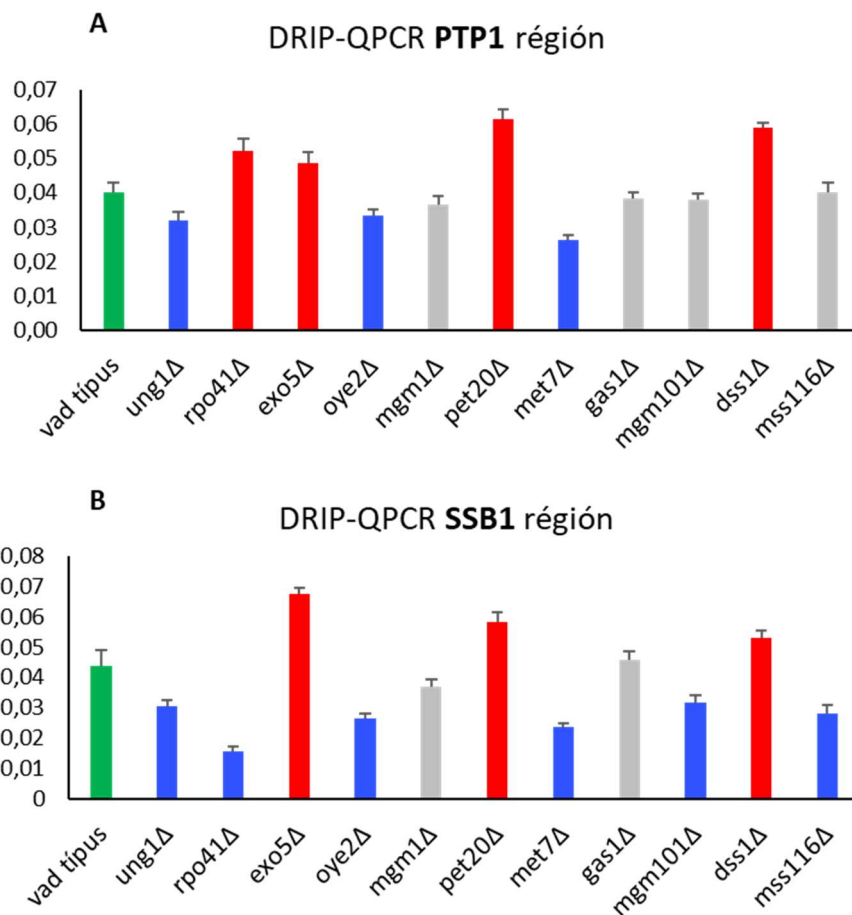
törzsek	<i>ung1</i> Δ	<i>rpo41</i> Δ	<i>exo5</i> Δ	<i>oye2</i> Δ	<i>mgm1</i> Δ	<i>pet20</i> Δ	<i>met7</i> Δ	<i>gas1</i> Δ	<i>mgm101</i> Δ	<i>dss1Δ</i>	<i>mss116</i> Δ	vad típus
össz peak	1090	469	2772	936	2820	2634	374	967	2030	3303	2650	1769
új peakek	2	0	1053	2	1144	872	11	5	351	1714	914	0
eltűnő peakek	878	1366	11	999	7	33	1490	943	238	1	49	0

*Piros színnel vannak jelölve a megnövekedett peak számok, kék színnel pedig a csökkenő peak számok.*

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.



**28. Ábra** Teljes genom DRIP-seq eredménye a bárkód ~6 kb környezetében. A DRIP-seq eredményét IGV-vel (*Integrative Genomics Viewer*) jelenítettem meg. Piros kerettel jelöltem a QPCR-el validált régiókat, sárga oszloppal a bárkód helyét. Zöld színnel jelöltem a vad típusú törzset.



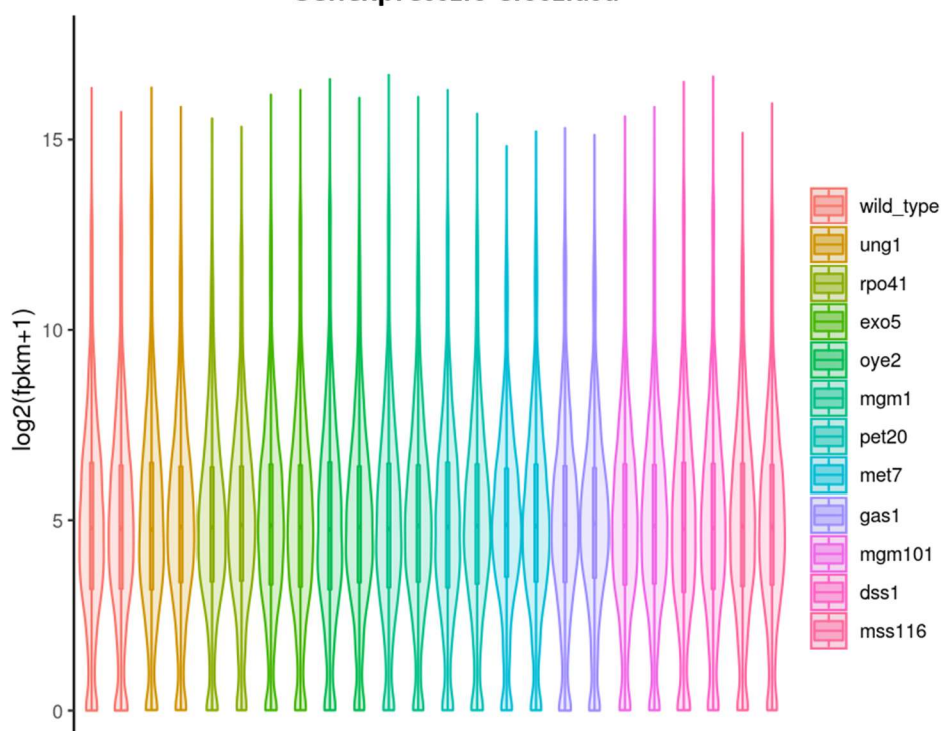
**29. Ábra DRIP-seq minták validálása QPCR-el a bárkód környezetében.** *A diagramon a technikai triplikák átlagából számolt IP/input és az IP/input variabilitása van ábrázolva. Zöld színnel jelöltem a vad típust. Piros színnel jelöltem a vad típustól magasabb R-hurok dúsulást, kék színnel a vad típustól alacsonyabb jelet. Szürke színnel azon törzseket jelöltem amelyek eredménye a vad típuséhoz hasonlít.*

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 típuséhoz képest (**28. és 29. Ábra**). 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 (**28. Ábra**) 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 (**27. Ábra**) nőtt az R-hurok 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-hurok dinamikus volta illetve genom szerke változó mértékű előfordulása okozhatja, hogy annak ellenére került néhány törzs a látókörünkbe a DRIP-BC-seq emelkedett R-hurok szintet mutató törzseit vizsgálva, hogy globálisan R-hurok depléció jellemzi őket. Összességében elmondható, hogy a bárkód 10 kb környezetét DRIP-seq-el vizsgálva a törzsek többségében sikerült validálni a DRIP-BC-seq eredményét (**27.Ábra**). 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.

#### **4.2.4. 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 (**30. Ábra**).

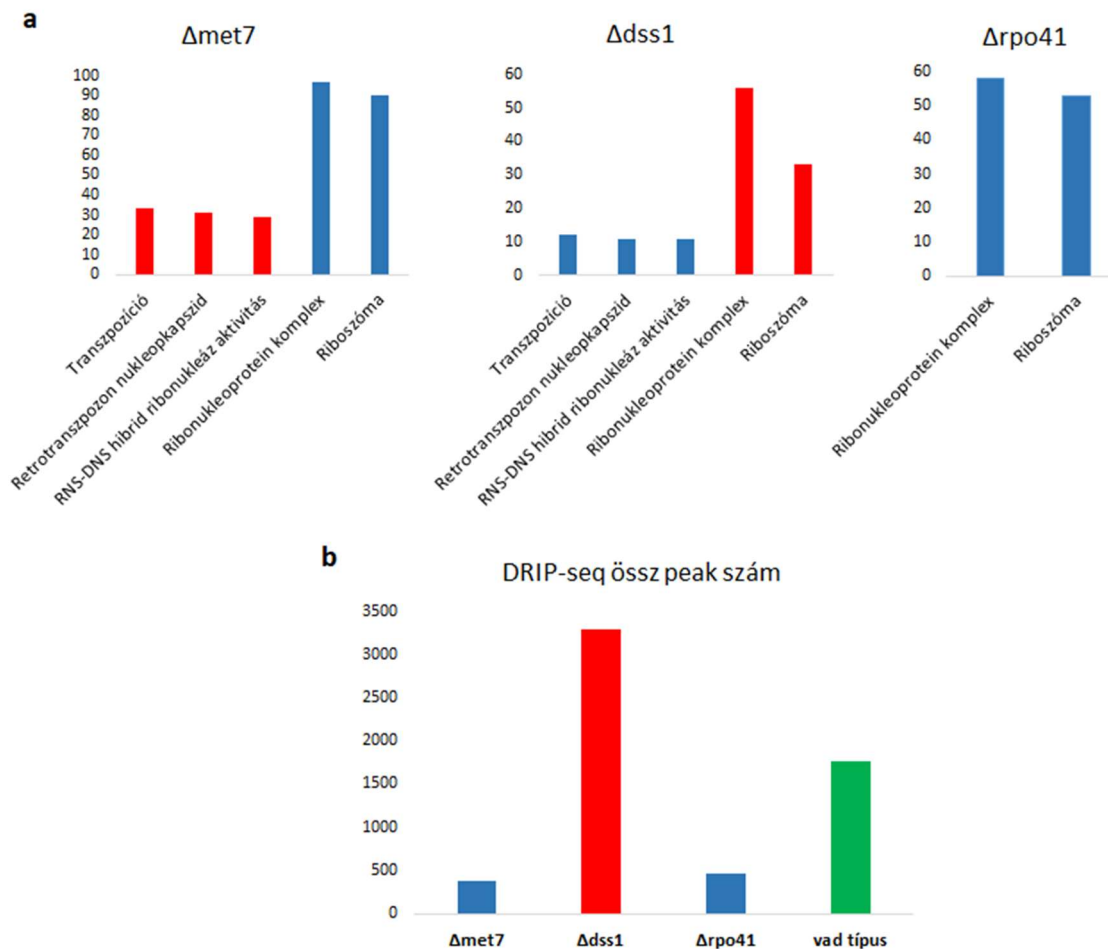
### Génexpresszió eloszlása



**30. Ábra** A génexpresszió szint eloszlása az egyes törzsek esetén. A violin plot x tengelye a különböző törzseket jelöli két biológiai replikában, az y tengelye pedig a  $\log_2(\text{FPKM}+1)$  eloszlását jelöli. (FPKM - Fragments Per Kilobase Million, a transzkriptek kilobázisonkénti fragmentumainak száma millió bázispáronként, egyidejűleg figyelembe veszi a szekvenálási mélység és a génhossz hatását, jelenleg ez a leggyakrabban használt módszer a génexpressziós szintek becslésére.)

A vad típushoz képest alul és felülexpresszált gének annotálását nézve viszont 3 génmutáns törzs génexpresszió változása nagyon érdekesnek bizonyult és összhangban van 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*-

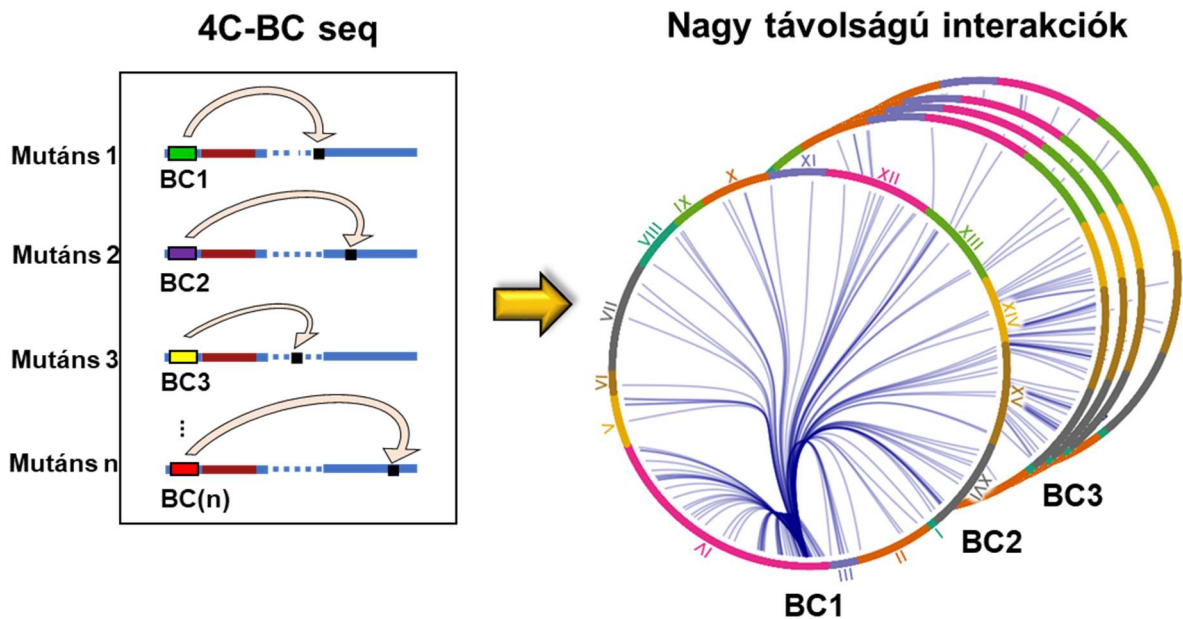
ban viszont az emelkedett R-hurok szinttel, a riboszómával és ribonukleoprotein komplexel kapcsolatos gének expressziójának a növekedése társul (31. Ábra).



**31. Ábra** Differenciális gének annotálása *a*, Vad típushoz képest differenciálisan expresszálódó gének annotálásának egy részlete. Kékkel vannak jelölve a vad típushoz képest down regulált gének eredménye, pirossal pedig a vad típushoz képest upregulált gének. *y* tengely az egyes gén ontológia (GO) kategóriákhoz tartozó gének számát jeleníti meg. *b*, Teljes genomi DRIP-seq össz peak száma.

#### 4.3 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.



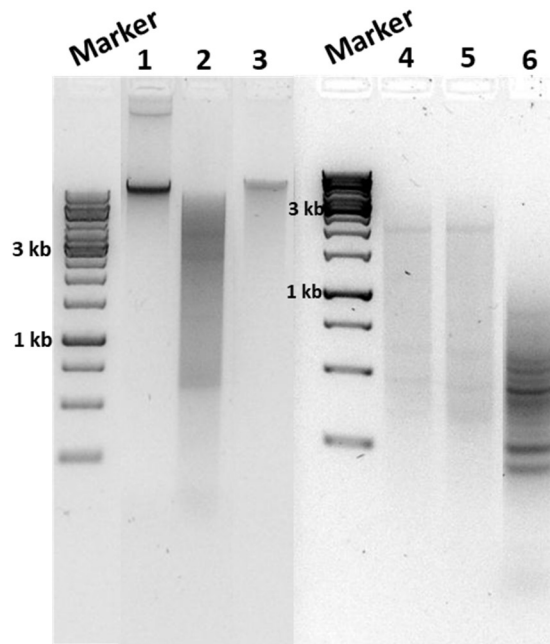
**32. Ábra 4C-BC-seq kísérlet áttekintése.** Balra: A különböző géndelációval jellemzett törzsek bárkód (BC) régiói különböző távoli kromoszóma kölcsönhatásokban vehetnek részt. Jobbra: A Circos diagramok egy-egy mutáns élesztő bárkódjának az interakciós hálózatát jelenítik meg. A kromoszómán belüli és kromoszómák közötti kölcsönhatásokat ábrázolják a körön belüli kék vonalak. A 16 élesztő kromoszómát római számok és különböző színek jelölik.

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.

#### 4.3.1 A 4C-BC-seq módszer beállítása

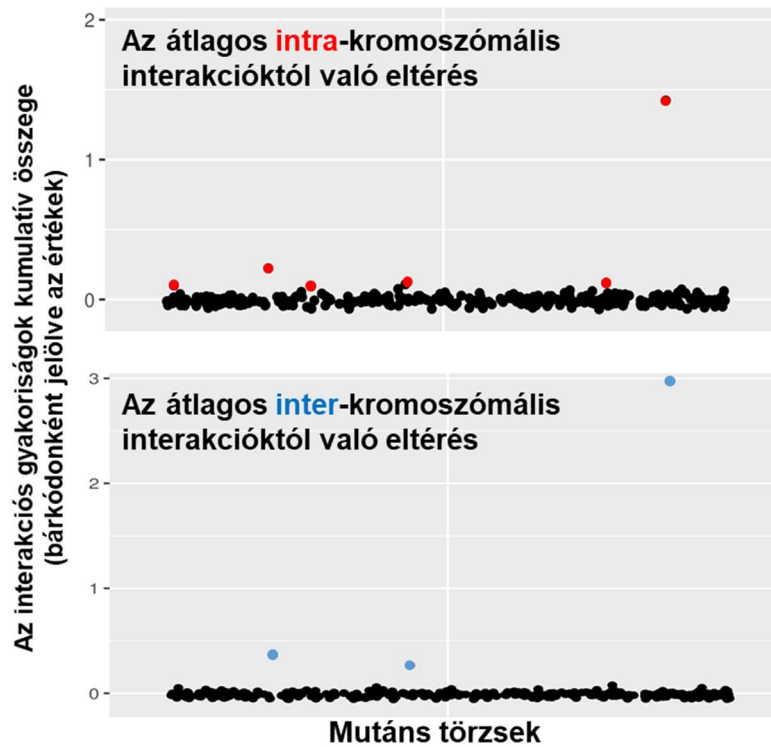
Rengeteg optimalizáció eredményeként sikerült beállítani a módszert. Egy sikeres 4C-BC-seq kísérlet főbb lépéseinek fragment analízise látható a **33. Ábrán**. Látható, hogy az in situ proximity ligálással majdnem intakt genomi DNS méretű fragmenteket kaptunk. A második, izolált DNS-en végzett restriktív enzim 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 zártak 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.



**33. Ábra 4C-BC-seq főbb lépéseinek fragment analízise.** 1 - kezdeti sejtek gDNS-ének ellenőrzése; 2 - első, sejtmagon belüli restriktív enzim emésztés; 3 - *in situ* proximity ligálás; 4 - második, izolált DNS-en végzett restriktív enzim emésztés; 5 - DNS ligálás híg körülmények között; 6 - inverz PCR

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 (**34. Ábra**).



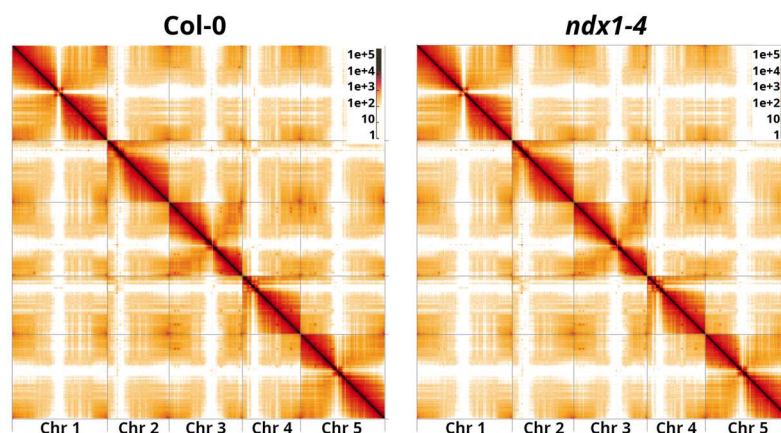
**34. Ábra** Az intra-kromszómális és inter-kromszómális interakciók különbözőségeinek és hasonlóságainak összesítése. Az Ábra közel 400 mutáns eredményét ábrázolja. Az y tengely az átlagos interakciós mintázattól való eltérést mutatja, az x tengely pedig az egyes mutánsokat. A kiugró értékeket piros, illetve kék színnel jelöltük.

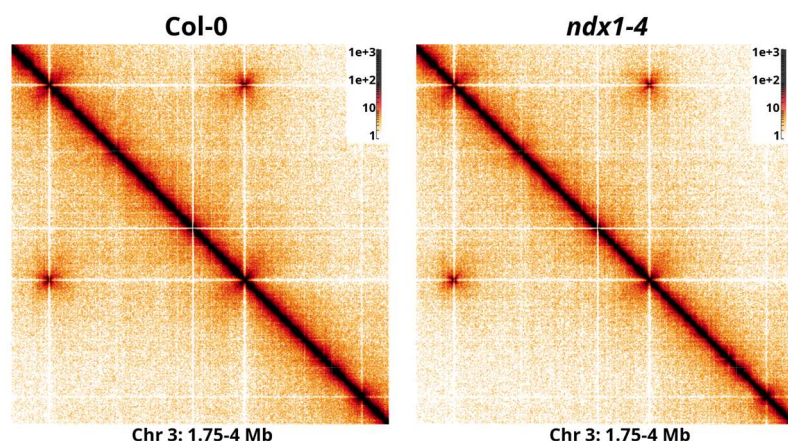
Az ígéretesnek mondható kísérlet folyamatban van az epi-ID library többi tagjával. A teljes élesztő könyvtár eredménye alapján néhány ígéretes törzsnél, teljes genom szinten szeretnénk majd vizsgálni a kromatin interakciós hálózatot, Hi-C módszer segítségével.

#### 4.4. A teljes genom 3D interakciós profiljának vizsgálata genomkonformáció leképezéssel (Hi-C)

A 4C-BC-seq-ben szerzett metodikai tapasztalatokra alapozva, Magyarországon elsőként, beállítottunk egy nagykomplexitású bioinformatikai elemzést igénylő háromdimenziós kromatin szerkezet vizsgálati módszert, a Hi-C-t (genomkonformáció leképezés). A Hi-C segítségével a teljes genom szintjén tudjuk majd vizsgálni a 4C-BC screen-ben talált mutánsokat illetve a DRIP-BC-seq screen R-hurok regulátor génmutációt, ezek hatását a térbeli genomszerkezetre. A Hi-C módszer implementálásánál egy speciális R-hurok regulátor fehérje, az *Arabidopsis* NODULIN HOMEOBOX (NDX) transzkripció faktor szerepére fókuszáltunk, amelyet az eukromatikus gének szabályozójaként írták le a transzkripciósan aktív kromoszóma karokon (Sun Q et al Science 2013). A lúdfű kicsiny, teljesen annotált genomja (135 Mbp, 5 kromoszóma, ~25,000 gén) és viszonylag egyszerű genetikai manipulálhatósága lehetőséget kínált az NDX-el kapcsolatos funkcionális vizsgálatok gyors és hatékony elvégzésére. Kontroll (Col-0) és T-DNS inszerciós mutáns (*ndx1-4*) csíra növényekben Hi-C szekvenálást végeztünk, majd 3D interakciós mátrixokat generáltunk az összes intra- és interkromoszómális kapcsolat felderítéséhez.

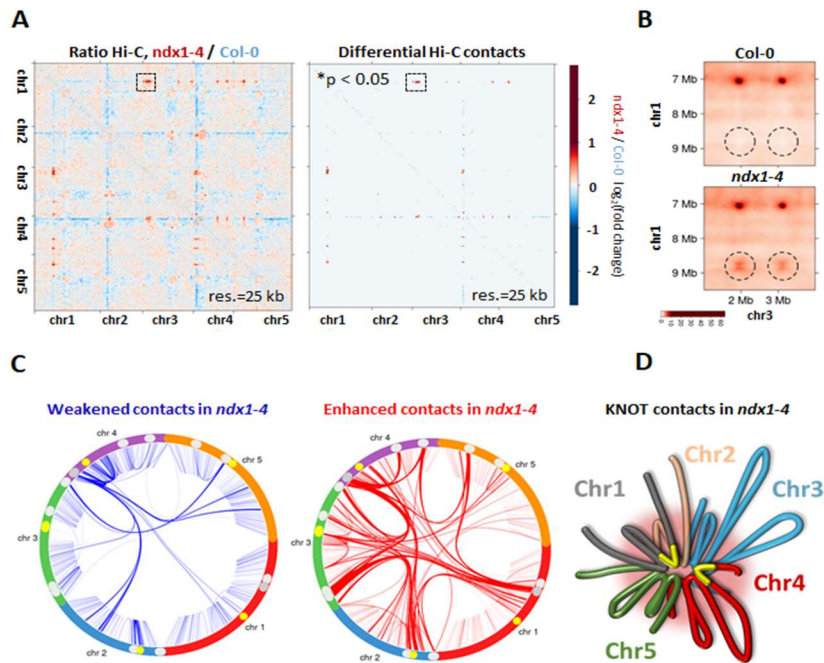
A normalizált kontakt mátrixok kis felbontásnál (25 kb) hasonló képet mutattak az *ndx1-4* és Col-0 növényekben (**35. Ábra**). Ez arra utal, hogy az NDX fehérje hiánya nem okoz kiterjedt 3D kromoszóma architektúra változást *Arabidopsis*-ban.





**35. Ábra** Hi-C interakciós térképek Col-0 és *ndx1-4* *Arabidopsis thaliana* növényekben. Az interakciós mátrixok a teljes genomra vagy a kiválasztott kromoszómális régiókra vonatkoznak. Felbontás: 25 kb.

Azonban nagyobb felbontásban szignifikáns kvantitatív változásokat azonosítottunk a Col-0 és *ndx1-4* minták között, amely számos genomi régióban megnövekedett (vörös) vagy csökkent (kék) Hi-C értéket tárt fel (**36.a Ábra**). Az egyik legmarkánsabb változást az ún. KNOT (csomó) struktúrában figyeltük meg, amely a vad típusú növényekre jellemző tíz interkromoszómális régió helyett (Grob et al. 2014) új *de novo* elemekkel egészült ki az *ndx1-4* mutánsban (**36.b,d Ábra**). A másik markáns Hi-C változás a centromerekre és pericentromerikus régiókra jellemző, amely szignifikánsan csökkent intrakromoszómális kapcsolatokat és felerősödő interkromoszómális interakciókat mutat az *ndx1-4* mutánsban (**36.c Ábra**). Az eltűnő intracentromerikus kölcsönhatások a kromatin fellazulására utalnak NDX hiányában (dekompakció). Ezek alapján úgy tűnik, hogy az NDX távoli kromatin kölcsönhatásokat mediál a kromocenterek és a transzkripciósan csendes kromatinon (KNOT régiók).



**36. Ábra** Differenciális Hi-C interakciós hőtérkép és circos diagram *ndx1-4* növényben.

a, *Differenciális Hi-C interakciós mátrix ndx1-4 versus Col-0 növényekben.* A piros és kék színek jelzik a Hi-C interakciók erősödését vagy csökkenését az *ndx1-4* mutánsban. A fehér színnel

jelölt helyeken nincs változás az *ndx1-4* és *Col-0* között. A jobb oldali Ábrán a Slitherine algoritmus által statisztikailag szignifikánsnak értékelt eltéréseket jelöltük. Felbontás: 25 kb, szignifikancia szint:  $p < 0,05$ . b, Reprezentatív példa *ndx1-4*-ben kierősödő Hi-C kapcsolatra. c, Circos plot, amely az *ndx1-4*-ben gyengülő (kék) és felerősödő (piros) Hi-C kapcsolatok hálózati topográfiáját mutatja. A színek intenzitása arányos a különbség mértékével (de mind statisztikailag szignifikáns,  $p < 0,05$ ,  $FC > 1,5$ ). d, Módosult KNOT struktúra az *ndx1-4* mutánsban. A sárgával jelzett régiók interkromoszómális kapcsolatokkal hozzáadódnak a vad típusú növényekre jellemző 10 alaprégióhoz.

## 5. 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 daganattípusban. 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 okozati információ áll rendelkezésre azokkal a daganatspecifikus 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 célpontként történő kiválasztásuknál milyen megközelítés alkalmazható. Amennyiben a daganatban 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 daganatterápiák terén.

A humán RNS-DNS hibrid kötő fehérjéket vizsgáló farmakogenomikai metaanalízisünk megerősíti az R-hurok gének asszociációját a tumorgenezissel és a lehetséges tumorterápiák felé irányítják a figyelmet. Humánspecifikus R-hurok regulátor fehérjékkal végzett farmakogenomikai vizsgálatainkban megmutattuk, hogy R-hurok regulátorok expressziós szintje kihasználható a rákos sejtek kemoterápiás kezelésekkal szembeni érzékenyétételére. 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 jól reagálnak 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 (Boros-Oláh et al., 2019).

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 géndeléciós 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-hurokok 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. 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-hurokok száma. Továbbá olyan mutánsokban melyekben a DRIP-BC-seq-el vizsgált bárkód régió környékén megnőtt az R-hurokok 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. 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 géndeléció hatással van az R-hurokok 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.

Legfontosabb eredményeink: rávilágítottunk arra, 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.

## 6. Felhasznált irodalom

1. 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>
2. 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>
3. Arora, R., Lee, Y., Wischnewski, 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>
4. 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>
5. 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>
6. 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>
7. 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>
8. 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>
9. 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)
10. 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/emboj.2020106394>

11. 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>
12. 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>
13. 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>
14. 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>
15. 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>
16. 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>
17. 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>
18. Dumelie, 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>
19. 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>
20. 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>
21. 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>
22. 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>
23. 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>
  24. 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>
  25. Glover, T. W. (2006). Common fragile sites. *Cancer Letters*, 232(1), 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.08.032>
  26. 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>
  27. 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>
  28. 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>
  29. 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>
  30. 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>
  31. 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>
  32. 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>
  33. Hatchi, E., Skourti-Stathaki, K., Venz, 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>
34. 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)
35. 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>
36. 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>
37. 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>
38. 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>
39. 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>
40. 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>
41. 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>
42. Malig, M., Hartono, S. R., Giafaglione, 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>
43. 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>
44. 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>
45. 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>
46. 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>
47. 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>
48. 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>
49. 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>
50. 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) $\cdot$ (CTG) and C9orf72 (GGGGCC) $\cdot$ (GGCCCC) repeats causes instability. *Nucleic Acids Research*, *42*(16), 10473–10487. <https://doi.org/10.1093/nar/gku658>
51. 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>
52. 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>
53. 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>
54. 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>
55. 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>
56. 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>
57. Shivji, M. K. K., Renaudin, X., Williams, Ç. 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>
58. 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>
59. 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>
60. 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>
61. 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>
62. 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>
63. 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>
64. 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>
65. 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>
66. 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>

67. 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>
68. 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>
69. 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>
70. 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>
71. 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>
72. 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)
73. Wu, T., Nance, J., Chu, F., & Fazio, 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>
74. 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>
75. 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>
76. 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)
77. 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>
78. 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>
79. 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>

80. 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., Chaldekas, 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>
81. 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. 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 érzékenyvé 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.

## 8. Summary

My PhD work focused on the examination of R-loops and chromatin loops. Within this framework, we used pharmacogenetic meta-analysis to study the role of R-loops in cancer therapy. We developed two new methods (DRIP-BC-seq, 4C-BC-seq) for identifying genes regulating R-loops and chromatin loops, respectively. Additionally, we used the Hi-C method to study the effect of the NDX gene on the spatial conformation of the genome in the model plant *Arabidopsis thaliana*.

The results of our pharmacogenomic analyses suggest that R-loop formation processes in cancer cells can be utilized as biomarkers, therapeutic targets, and for sensitizing certain tumors to chemotherapy treatments. The uncovered correlations offer new pathways to epigenetic therapies that are based on modifying the R-loop levels in tumors.

Using a barcoded yeast gene deletion library with a method we developed for identifying R-loop regulating genes, named DRIP-BC-seq, we identified several new R-loop regulator genes. Among the 11 genes selected for validation, five mutants - *exo5Δ*, *pet20Δ*, *dss1Δ*, *mgm1Δ*, *mss116Δ* - which showed R-loop increase based on DRIP-BC-seq, also showed a significant global increase in R-loop formation in terms of total DRIP-seq peak numbers. mRNA-seq analysis showed a clear correlation between gene deletion and R-loop quantity differences for three genes - MET7, DSS1, RPO41.

The 4C-BC-seq method developed to map chromatin conformation regulating genes is expected to reveal previously unknown genes controlling to 3D genome conformation. Furthermore, if there are common hits between DRIP-BC-seq and 4C-BC-seq, we may also get closer to understanding the impact of R-loops on 3D chromatin structure regulation.

With the introduction of the Hi-C method into our lab, we had the opportunity to examine the three-dimensional structure of the genome at the whole-genome level. Hi-C experiments on the *ndx1-4* mutant and wild-type *Arabidopsis thaliana* cells showed that NDX causes global genomic architecture changes. Intrachromosomal contacts decrease in the absence of NDX, while interchromosomal contacts generally increase. We found that NDX mediates distant chromatin interactions through chromocenters and transcriptionally silent chromatin.

## 9. Függelék

### 9.1. A géneexpresszió és drogválasz asszociáció analízisben alkalmazott sejtvonalak

Daganat típus	Daganattípushoz tartozó sejtvonalak neve
leukémia	KY821, MV-4-11, RS4-11, MY-M12
krónikus mieloid leukémia	BV-173, CML-T1, EM-2, JURL-MK1, K-562, KCL-22, KU812, LAMA-84, MEG-01, RPMI-8866
limfoblasztos leukémia	697, ALL-PO, BE-13, CCRF-CEM, GR-ST, HAL-01, KARPAS-45, KE-37, LC4-1, MOLT-4, P30-OHK, SUP-B15
limfoblasztos T-sejtes leukémia	ATN-1, LOUCY, MOLT-13, MOLT-16, P12-ICHIKAWA, PF-382, RPMI-8402, SUP-T1, TALL-1
B sejtes leukémia	BALL-1, KARPAS-231, KOPN-8, MHH-CALL-2, MHH-PREB-1, MN-60, NALM-6, RCH-ACV, REH, ROS-50, SUP-B8, U-698-M, MHH-CALL-4
anaplasztikus nagysejtes limfóma	KARPAS-299, SU-DHL-1, SUP-M2
B sejtes limfóma	A3-KAW, A4-Fuk, BC-1, CRO-AP2, CTB-1, DB, DOHH-2, Farage, GRANTA-519, JEKO-1, JSC-1, KARPAS-1106P, KARPAS-422, MC116, NU-DUL-1, OCI-LY-19, RC-K8, RL, SCC-3, SLVL, SU-DHL-10, SU-DHL-16, SU-DHL-4, SU-DHL-5, SU-DHL-6, SU-DHL-8, TK, TUR, VAL, WSU-DLCL2, BL-41, CA46, Daudi, DG-75, EB2, EB-3, GA-10, JiyoyeP-2003, NAMALWA, P32-ISH, Raji, Ramos-2G6-4C10, ST486, BC-3, HT, JM1, OCI-LY7, SC-1
Hodgkin-limfóma	HDLM-2, HD-MY-Z, Hs-445, KM-H2, L-1236, L-428, L-540, RPMI-6666, SUP-HD1
hajás sejtes leukémia	HC-1, MLMA, Mo-T, BONNA-12
mielóma	ARH-77, IM-9, KMS-12-BM, L-363, LP-1, MM1S, MOLP-8, NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226, SK-MM-2, U-266, KMS-11
vérképzőszervi daganat - egyéb típus	AMO-1, EoL-1-cell, JJN-3, KARPAS-620, MC-CAR, SKM-1
limfoid neoplazma - egyéb típus	DEL, EHEB, EJM, H9, JVM-2, JVM-3, SR, WIL2-NS, WSU-NHL, NK-92MI, ALL-SIL, DND-41, HH, Jurkat
oszteoszarkóma	CAL-72, G-292 Clone A141B1, HOS, HuO-3N1, HuO9, MG-63, NOS-1, NY, Saos-2, U-2-OS
kondroszarkóma	CAL-78, CHSA8926, H-EMC-SS, CHSA0011, CHSA0108
fibroszarkóma	HT-1080, SW684, Hs633T
Ewings szarkóma	ES1, ES3, ES4, ES5, ES7, ES8, EW-1, EW-11, EW-12, EW-13, EW-16, EW-18, EW-22, EW-24, EW-3, EW-7, SK-ES-1, SK-PN-DW, TC-71, ES6, MHH-ES-1
csont - egyéb típus	CS1, SJSA-1, U-CH2
rabdomioszarkóma	A204, A673, KYM-1, RD, RH-1, RH-18, RH-41, SJRH30, TE-441-T

Daganat típus	Daganattípushoz tartozó sejtvonalak neve
vese	769-P, 786-0, A498, A704, ACHN, BB65-RCC, BFTC-909, CAKI-1, CAL-54, G-401, HA7-RCC, KMRC-1, KMRC-20, LB1047-RCC, LB2241-RCC, LB996-RCC, NCC010, NCC021, OS-RC-2, RCC10RGB, RCC-AB, RCC-ER, RCC-FG2, RCC-JW, RCC-MF, RXF393, SN12C, TK10, U031, VMRC-RCZ, RCC-JF, SW156
mellékvese	SW13
húgyhólyag	5637, 639-V, 647-V, BFTC-905, CAL-29, DSH1, HT-1197, HT-1376, J82, KU-19-19, LB831-BLC, RT-112, RT4, SW1710, SW780, T-24, TCCSUP, UM-UC-3, VM-CUB-1
urogenitális rendszer egyéb típus	JAR, JEG-3, SW954, SW962
proszтата	22RV1, BPH-1, DU-145, LNCaP-Clone-FGC, PC-3, PWR-1E, VCaP, NCI-H660
herék	NCCIT, NEC8, NTERA-2 cl.D1
mellrák	AU565, BT-20, BT-474, BT-483, BT-549, CAL-120, CAL-148, CAL-51, CAL-85-1, CAMA-1, COLO-824, DU-4475, EFM-19, EFM-192A, EVSA-T, HCC1143, HCC1187, HCC1395, HCC1419, HCC1428, HCC1500, HCC1569, HCC1599, HCC1806, HCC1937, HCC1954, HCC202, HCC2157, HCC2218, HCC38, HCC70, HDQ-P1, Hs-578-T, MCF7, MDA-MB-157, MDA-MB-231, MDA-MB-330, MDA-MB-361, MDA-MB-415, MDA-MB-436, MDA-MB-453, MDA-MB-468, MFM-223, MRK-nu-1, OCUB-M, T47D, UACC-812, UACC-893, ZR-75-30, JIMT-1, MDA-MB-175-VII, YMB-1-E
petefészek	A2780, Caov-4, EFO-21, EFO-27, ES-2, FU-OV-1, IGROV-1, JHOS-2, JHOS-3, JHOS-4, KGN, KURAMOCHI, OAW-28, OAW-42, OC-314, OV-17R, OV-56, OV-7, OV-90, OVCA420, OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-5, OVCAR-8, OVISE, OVK-18, OVKATE, OVMIU, OVTOKO, PA-1, PEO1, RKN, RMG-I, SK-OV-3, SW626, TOV-112D, TOV-21G, TYK-nu, UWB1.289, Caov-3, DOV13, Hey, OVCA433
méh	MES-SA, SKN
méhnyakrák	C-33-A, C-4-I, CAL-39, Ca-Ski, DoTc2-4510, HeLa, HT-3, ME-180, MS751, SiHa, SISO, SKG-IIIa, SW756, TC-YIK, OMC-1
méhnyálkahártya	AN3-CA, COLO-684, EN, ESS-1, HEC-1, KLE, MFE-280, MFE-296, MFE-319, SNG-M, RL95-2
pajzsmirigy	8305C, 8505C, ASH-3, BCPAP, BHT-101, CAL-62, CGTH-W-1, FTC-133, HTC-C3, IHH-4, K5, ML-1, RO82-W-1, TT, TT2609-C02, KMH-2
fej és nyak daganatai	A253, BB30-HNC, BB49-HNC, BHY, BICR10, BICR22, BICR31, BICR78, Ca9-22, CAL-27, CAL-33, Detroit562, DOK, FADU, H3118, HN, HO-1-N-1, HO-1-u-1, HSC-2, HSC-3, HSC-4, JHU-011, JHU-022, KON, KOSC-2, LB771-HNC, OSC-19, OSC-20, PCI-15A, PCI-30, PCI-38, PCI-4B, PCI-6A, PE/CA-PJ15, RPMI-2650, SAS, SAT, SCC-15, SCC-25, SCC-4, SCC-9, SKN-3, JHU-029, SCC90

Daganat típus	Daganattípushoz tartozó sejtvonalak neve
nyelőcső	COLO-680N, EC-GI-10, ESO26, ESO51, FLO-1, HCE-4, KYAE-1, KYSE-140, KYSE-150, KYSE-180, KYSE-220, KYSE-270, KYSE-410, KYSE-450, KYSE-50, KYSE-510, KYSE-520, KYSE-70, OACM5-1, OACp4C, OE19, OE21, OE33, SK-GT-4, TE-1, TE-10, TE-11, TE-12, TE-15, TE-4, TE-5, TE-6, TE-8, TE-9, T-T
gyomor	23132-87, AGS, ECC10, ECC12, FU97, GCIY, GT3TKB, HGC-27, Hs746T, HSC-39, IM-95, KATOIII, MKN1, MKN28, MKN45, MKN7, NCI-N87, NCI-SNU-1, NCI-SNU-16, NCI-SNU-5, NUGC-3, NUGC-4, OCUM-1, RERF-GC-1B, RF-48, SCH, SK-GT-2, TGBC11TKB, TMK-1
máj	C3A, Hep 3B2_1-7, HLE, huH-1, HuH-7, JHH-1, JHH-6, JHH-7, SK-HEP-1, SNU-182, SNU-387, SNU-398, SNU-423, SNU-449, SNU-475, JHH-2, JHH-4
epevezeték	EGI-1, ETK-1, HuCCT1, TGBC1TKB, TGBC24TKB
vastagbél	C2BBel, CaR-1, CCK-81, CL-11, CL-40, COLO-205, COLO-320-HSR, COLO-678, CW-2, GP5d, HCC2998, HCC-56, HCT-116, HCT-15, HT-115, HT-29, HT55, KM12, LoVo, LS-1034, LS-123, LS-180, LS-411N, LS-513, MDST8, NCI-H630, NCI-H716, NCI-H747, RCM-1, RKO, SK-CO-1, SNU-1040, SNU-175, SNU-407, SNU-61, SNU-81, SNU-C1, SNU-C2B, SNU-C5, SW1116, SW1417, SW1463, SW48, SW837, SW948, T84, DIFI, NCI-H508, SNU-283, SW620, CL-34
hasnyálmirigy	AsPC-1, BxPC-3, CAPAN-1, Capan-2, CFPAC-1, DAN-G, HPAC, HPAF-II, Hs766T, HuP-T3, HuP-T4, KP-1N, KP-3, KP-4, MIA-PaCa-2, MZ1-PC, PANC-02-03, PANC-03-27, PANC-04-03, PANC-08-13, PANC-10-05, PA-TU-8902, PA-TU-8988T, PL18, PL4, PSN1, QGP-1, SU8686, SUIT-2, SW1990, YAPC, KP-2
emésztőrendszer egyéb típus	HUTU-80
tüdő NSCLC adenokarcinóma	201T, A549, ABC-1, Calu-3, Calu-6, COR-L105, EKVX, EMC-BAC-1, EMC-BAC-2, H3255, HCC-44, HCC-78, HCC-827, LC-2-ad, LXF-289, NCI-H1355, NCI-H1395, NCI-H1435, NCI-H1563, NCI-H1568, NCI-H1573, NCI-H1623, NCI-H1648, NCI-H1650, NCI-H1651, NCI-H1666, NCI-H1693, NCI-H1703, NCI-H1734, NCI-H1755, NCI-H1781, NCI-H1792, NCI-H1793, NCI-H1838, NCI-H1944, NCI-H1975, NCI-H1993, NCI-H2009, NCI-H2023, NCI-H2030, NCI-H2085, NCI-H2087, NCI-H2122, NCI-H2228, NCI-H2291, NCI-H23, NCI-H2342, NCI-H2347, NCI-H2405, NCI-H292, NCI-H3122, NCI-H322M, NCI-H358, NCI-H441, NCI-H522, NCI-H596, NCI-H650, NCI-H838, PC-14, RERF-LC-KJ, RERF-LC-MS, SK-LU-1, SW1573, HOP-62, NCI-H1437, PC-3 [JPC-3], VMRC-LCD
tüdő NSCLC karcinoid	NCI-H720, NCI-H727, NCI-H835, UMC-11
tüdő NSCLC nagy sejtes	COR-L23, HOP-92, IA-LM, LCLC-103H, LCLC-97TM1, LU-65, LU-99A, NCI-H1155, NCI-H1299, NCI-H1581, NCI-H1915, NCI-H661, NCI-H810, NCI-H460
tüdő NSCLC specifikáció nélkül	A427, BEN, CAL-12T, ChaGo-K-1, HCC-366, NCI-H1770, NCI-H2110, NCI-H2135, NCI-H2172, NCI-H2444, NCI-H647

Daganat típus	Daganattípushoz tartozó sejtvonalak neve
tüdő NSCLC laphámsejtes karcinóma	EBC-1, EPLC-272H, HARA, HCC-15, KNS-62, LC-1-sq, LK-2, LOU-NH91, NCI-H1869, NCI-H2170, NCI-H226, NCI-H520, RERF-LC-Sq1, SK-MES-1, SW900
tüdő kis sejtes karcinóma	COLO-668, COR-L279, COR-L303, COR-L311, COR-L32, COR-L88, CPC-N, DMS-114, DMS-273, DMS-53, IST-SL1, IST-SL2, LB647-SCLC, LU-134-A, LU-135, LU-139, LU-165, MS-1, NCI-H1048, NCI-H1092, NCI-H1105, NCI-H1341, NCI-H1417, NCI-H1436, NCI-H146, NCI-H1688, NCI-H1694, NCI-H1836, NCI-H187, NCI-H1876, NCI-H196, NCI-H1963, NCI-H2029, NCI-H2066, NCI-H209, NCI-H211, NCI-H2141, NCI-H2196, NCI-H2227, NCI-H250, NCI-H345, NCI-H378, NCI-H446, NCI-H510A, NCI-H524, NCI-H526, NCI-H64, NCI-H69, NCI-H748, NCI-H82, NCI-H841, NCI-H847, SBC-1, SBC-3, SBC-5, DMS-79, NCI-H740, COR-L95, HCC-33, NCI-H128, NCI-H1304, NCI-H2081, NCI-H2171, SHP-77, SW1271, RERF-LC-FM
tüdő - egyéb típus	COR-L321
neuroblasztóma	BE2-M17, CHP-126, CHP-134, CHP-212, GI-ME-N, GOTO, IMR-5, KELLY, KP-N-YN, LAN-6, MHH-NB-11, NB(TU)1-10, NB1, NB10, NB12, NB13, NB14, NB17, NB5, NB6, NB69, NB7, NH-12, SIMA, SK-N-AS, SK-N-DZ, SK-N-FI, SK-N-SH, TGW, KP-N-RT-BM-1, KP-N-YS, MC-IXC
glioma	42-MG-BA, 8-MG-BA, A172, AM-38, Becker, CAS-1, CCF-STTG1, D-247MG, D-263MG, D-336MG, D-392MG, D-502MG, D-542MG, D-566MG, DBTRG-05MG, DK-MG, GAMG, GB-1, GI-1, GMS-10, H4, Hs683, KALS-1, KINGS-1, KNS-42, KNS-81-FD, KS-1, LN-18, LN-229, LN-405, LNZA3WT4, M059J, MOG-G-CCM, MOG-G-UUVW, NMC-G1, no-10, no-11, SF126, SF268, SF295, SF539, SK-MG-1, SNB75, SW1088, SW1783, T98G, U-118-MG, U251, U-87-MG, YH-13, YKG-1, D-423MG, D-245MG
medulloblasztóma	D-283MED, Daoy, ONS-76, PFSK-1
melanóma	451Lu, A101D, A2058, A375, C32, CHL-1, COLO-679, COLO-792, COLO-800, COLO-829, CP50-MEL-B, CP66-MEL, G-361, GAK, G-MEL, HVM-II, Hs940-T, HT-144, IGR-1, IGR-37, IPC-298, IST-MEL1, LB2518-MEL, LB373-MEL-D, LOXIMVI, M14, MEL-HO, MEL-JUSO, Mewo, MMAC-SF, MZ2-MEL, MZ7-mel, RPMI-7951, RVH-421, SH-4, SK-MEL-1, SK-MEL-2, SK-MEL-24, SK-MEL-28, SK-MEL-3, SK-MEL-30, SK-MEL-31, SK-MEL-5, UACC-257, UACC-62, WM-115, WM1552C, WM278, WM35, WM793B, COLO-783, CP67-MEL, K2, Hs939-T, VMRC-MELG
bőr egyéb típus	A388, A431, DJM-1
mezotelióma	H2369, H2373, H2461, H2591, H2595, H2722, H2731, H2795, H2803, H2804, H2810, H2818, H2869, H290, H513, IST-MES1, MPP-89, MSTO-211H, NCI-H2052, NCI-H2452, NCI-H28
egyéb lágyrész	G-402, GCT, MFH-ino, SK-LMS-1, SK-UT-1, SW872, SW982, VA-ES-BJ, STS-0421

## 9.2. A gyógyszerérzékenység analízisben vizsgált drogok

Drog neve	Célpontja, hatása	Működési útvonala
(5Z)-7-Oxozeanol	TAK1	Egyéb, kinázok
5-Fluorouracil	Antimetabolit (DNS & RNS)	Egyéb
A-443654	AKT1, AKT2, AKT3	PI3K/MTOR jelátvitel
A-770041	LCK, FYN	Egyéb, kinázok
Afatinib	ERBB2, EGFR	EGFR jelátvitel
AICA Ribonucleotide	AMPK agonista	Metabolizmus
AKT inhibitor VIII	AKT1, AKT2, AKT3	PI3K/MTOR jelátvitel
Alectinib	ALK	RTK jelátvitel
Amuvatinib	KIT, PDGFRA, FLT3	Egyéb, kinázok
AR-42	HDAC1	Kromatin hiszton acetiláció
AS601245	JNK1, JNK2, JNK2	JNK and p38 jelátvitel
AS605240	PI3Kgamma	PI3K/MTOR jelátvitel
AT-7519	CDK1, CDK2, CDK4, CDK6,	Sejtciklus
Avagacestat	Amyloid beta20, Amyloid beta40	Egyéb
Axitinib	PDGFR, KIT, VEGFR	RTK jelátvitel
AZ628	BRAF	ERK MAPK jelátvitel
AZD6482	PI3Kbeta	PI3K/MTOR jelátvitel
AZD7762	CHEK1, CHEK2	Sejtciklus
AZD8055	MTORC1, MTORC2	PI3K/MTOR jelátvitel
BAY-61-3606	SYK	Egyéb, kinázok
Belinostat	HDAC1	Kromatin hiszton acetiláció
Bexarotene	Retinoid X receptor (RXR) agonista	Egyéb
BI-2536	PLK1, PLK2, PLK3	Sejtciklus
Bicalutamide	AR	Hormon-kapcsolt
BIX02189	MEK5, ERK5	ERK MAPK jelátvitel
Bleomycin	dsDNS törés indukciója	DNS replikáció
BMS-345541	IKK1, IKK2	Egyéb, kinázok
BMS-509744	ITK	Egyéb

<b>Drog neve</b>	<b>Célpontja, hatása</b>	<b>Működési útvonal</b>
BMS-536924	IGF1R, IR	IGFR jelátvitel
BMS-754807	IGF1R, IR	IGFR jelátvitel
Bortezomib	Proteaszóma	Protein stabilitás és lebomlás
Bosutinib	SRC, ABL, TEC	Egyéb, kinázok
Bryostatin 1	PKC	Egyéb, kinázok
BX795	TBK1, PDK1 (PDPK1), IKK,	Egyéb
BX-912	PDK1 (PDPK1)	PI3K/MTOR jelátvitel
Cabozantinib	VEGFR, MET, RET, KIT, FLT1,	Egyéb, kinázok
Camptothecin	TOP1	DNS replikáció
CAY10603	HDAC1, HDAC6	Kromatin hiszton acetiláció
CCT007093	PPM1D	Egyéb
CCT-018159	HSP90	Protein stabilitás és lebomlás
Cetuximab	EGFR	EGFR jelátvitel
CGP-082996	CDK4	Sejtciklus
CGP-60474	CDK1,CDK2,CDK5,CDK7,CDK9,	Sejtciklus
CHIR-99021	GSK3A, GSK3B	WNT jelátvitel
CI-1040	MEK1, MEK2	ERK MAPK jelátvitel
Cisplatin	DNS keresztkötő	DNS replikáció
CMK	RSK2	ERK MAPK jelátvitel
CP466722	ATM	Genom integritás
CP724714	ERBB2	EGFR jelátvitel
Crizotinib	MET, ALK, ROS1	RTK jelátvitel
CUDC-101	HDAC1-10, EGFR, ERBB2	Egyéb
CX-5461	RNS polimeráz 1	Egyéb
Cyclopamine	SMO	Egyéb
Cytarabine	Antimetabolit	DNS replikáció
Dabrafenib	BRAF	ERK MAPK jelátvitel
Dacinostat	HDAC1	Kromatin hiszton acetiláció
Dactolisib	PI3K (Class 1), MTORC1,	PI3K/MTOR jelátvitel

<b>Drog neve</b>	<b>Célpontja, hatása</b>	<b>Működési útvonal</b>
Daporinad	NAMPT	Metabolizmus
Dasatinib	ABL, SRC, Ephrins, PDGFR, KIT	Egyéb
DMOG	HIF-PH	Metabolizmus
Docetaxel	Mikrotubulus stabilizátor	Mitózis
Doramapimod	p38, JNK2	JNK and p38 jelátvitel
Doxorubicin	Anthracycline	DNS replikáció
EHT-1864	RAC1, RAC2, RAC3	Citoszkeleton
Elesclomol	HSP90	Protein stabilitás és lebomlás
Embelin	XIAP	Apoptózis szabályozó
Entinostat	HDAC1, HDAC3	Kromatin hiszton acetiláció
Enzastaurin	PKCB	Egyéb, kinázok
Epothilone B	Mikrotubulus stabilizátor	Mitózis
Erlotinib	EGFR	EGFR jelátvitel
Etoposide	TOP2	DNS replikáció
Fedratinib	JAK2	Egyéb, kinázok
FH535	PPARgamma, PPARdelta	WNT jelátvitel
FMK	RSK	Egyéb, kinázok
Foretinib	MET, KDR, TIE2, VEGFR3/FLT4,	RTK jelátvitel
FR-180204	ERK1, ERK2	ERK MAPK jelátvitel
FTI-277	Farnezil-transzferáz (FNTA)	Egyéb
Gefitinib	EGFR	EGFR jelátvitel
Gemcitabine	Pirimidin antimetabolit	DNS replikáció
Genentech Cpd 10	AURKA, AURKB	Mitózis
GNF-2	BCR-ABL	ABL jelátvitel
GSK1070916	AURKA, AURKC	Mitózis
GSK1904529A	IGF1R, IR	IGFR jelátvitel
GSK269962A	ROCK1, ROCK2	Citoszkeleton
GSK319347A	IKK	Egyéb
GSK429286A	ROCK1, ROCK2	Citoszkeleton

<b>Drog neve</b>	<b>Célpontja, hatása</b>	<b>Működési útvonala</b>
GSK650394	SGK2, SGK3	Egyéb
GSK690693	AKT1, AKT2, AKT3	PI3K/MTOR jelátvitel
GW-2580	CSF1R	RTK jelátvitel
GW441756	NTRK1	RTK jelátvitel
GW843682X	PLK1	Sejtciklus
HG-5-113-01	LOK, LTK, TRCB, ABL(T315I)	Egyéb
HG-5-88-01	EGFR, ADCK4	Egyéb, kinázok
HG6-64-1	BRAF	ERK MAPK jelátvitel
I-BET-762	BRD2, BRD3, BRD4	Kromatinnal kapcsolatos
ICL1100013	N-mirisztoiltranszferáz 1/2	Egyéb
Idelalisib	PI3Kdelta	PI3K/MTOR jelátvitel
Imatinib	ABL, KIT, PDGFR	RTK jelátvitel
IOX2	EGLN1	Egyéb
IPA-3	PAK1	Citoszkeleton
Ispinesib Mesylate	KSP	Mitózis
JNK Inhibitor VIII	JNK	JNK and p38 jelátvitel
JNK-9L	JNK2, JNK3	JNK and p38 jelátvitel
JQ1	BRD2, BRD3, BRD4, BRDT	Kromatinnal kapcsolatos
JQ12	HDAC1, HDAC2	Kromatin hiszton acetiláció
JW-7-24-1	LCK	Egyéb, kinázok
JW-7-52-1	MTOR	PI3K/MTOR jelátvitel
KIN001-236	Angiopoietin-1 receptor	Egyéb
KIN001-244	PDK1 (PDPK1)	Egyéb, kinázok
KIN001-260	IKKB	Egyéb
KIN001-266	MAP3K8	Egyéb, kinázok
KIN001-270	CDK9	Sejtciklus
KU-55933	ATM	Genom integritás
Lapatinib	ERBB2, EGFR	EGFR jelátvitel
Lenalidomide	CRBN	Protein stabilitás és lebomlás

<b>Drog neve</b>	<b>Célpontja, hatása</b>	<b>Működési útvonala</b>
Lestaurtinib	FLT3, JAK2, NTRK1, NTRK2,	Egyéb, kinázok
LFM-A13	BTK	Egyéb, kinázok
Linifanib	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3,	RTK jelátvitel
Linsitinib	IGF1R	IGFR jelátvitel
Luminespib	HSP90	Protein stabilitás és lebomlás
Masitinib	KIT, PDGFRA, PDGFRB	Egyéb, kinázok
Methotrexate	Antimetabolit	DNS replikáció
MG-132	Proteaszóma, CAPN1	Protein stabilitás és lebomlás
Midostaurin	PKC, PPK, FLT1, c-FGR, others	Egyéb
Mitomycin-C	DNS keresztkötő	DNS replikáció
MK-2206	AKT1, AKT2	PI3K/MTOR jelátvitel
Motesanib	VEGFR, RET, KIT, PDGFR	RTK jelátvitel
MPS-1-IN-1	MPS1	Mitózis
Navitoclax	BCL2, BCL-XL, BCL-W	Apoptózis szabályozó
NG-25	TAK1, MAP4K2	Egyéb, kinázok
Nilotinib	ABL	ABL jelátvitel
NPK76-II-72-1	PLK3	Sejtciklus
NSC-207895	MDM4	p53 útvonala
NSC-87877	SHP-1 (PTPN6), SHP-2 (PTPN11)	Egyéb
NU7441	DNAPK	Genom integritás
Nutlin-3a (-)	MDM2	p53 útvonala
NVP-BHG712	EPHB4	Egyéb
NVP-TAE684	ALK	RTK jelátvitel
Obatoclax Mesylate	BCL2, BCL-XL, BCL-W, MCL1	Apoptózis szabályozó
Olaparib	PARP1, PARP2	Genom integritás
Ompalisib	PI3K (class 1), MTORC1, MTORC2	PI3K/MTOR jelátvitel
OSI-027	MTORC1, MTORC2	PI3K/MTOR jelátvitel
OSI-930	KIT	RTK jelátvitel
OSU-03012	PDK1 (PDPK1)	Egyéb, kinázok

<b>Drog neve</b>	<b>Célpontja, hatása</b>	<b>Működési útvonal</b>
PAC-1	Prokaspáz-3, Prokaspáz-7	Apoptózis szabályozó
Paclitaxel	Mikrotubulus stabilizátor	Mitózis
Palbociclib	CDK4, CDK6	Sejtciklus
Parthenolide	HDAC1	Kromatin hiszton acetiláció
Pazopanib	CSF1R, KIT, PDGFRA, PDGFRB	RTK jelátvitel
PD0325901	MEK1, MEK2	ERK MAPK jelátvitel
PD173074	FGFR1, FGFR3	RTK jelátvitel
Pelitinib	EGFR	EGFR jelátvitel
Pevonedistat	NAE	Egyéb
PF-4708671	S6K1	PI3K/MTOR jelátvitel
PF-562271	FAK, FAK2	Citoszkeleton
PFI-1	BRD4	Kromatinnal kapcsolatos
PFI-3	SMARCA2, SMARCA4, PB1	Egyéb
PHA-665752	MET	RTK jelátvitel
PHA-793887	CDK2, CDK7, CDK5	Sejtciklus
Phenformin	Biguanid ágens	Egyéb
PI-103	PI3Kalpha, DAPK3, CLK4, PIM3,	PI3K/MTOR jelátvitel
Pictilisib	PI3K (class 1)	PI3K/MTOR jelátvitel
PIK-93	PI3Kgamma	PI3K/MTOR jelátvitel
Piperlongumine	Reaktív oxigéngyököket idéz elő	Egyéb
PLX-4720	BRAF	ERK MAPK jelátvitel
Ponatinib	ABL, PDGFRA, VEGFR2, FGFR1,	RTK jelátvitel
Pyrimethamine	Dihidrofolát-reduktáz (DHFR)	Egyéb
QL-VIII-58	MTOR, ATR	Egyéb
QL-X-138	BTK	Egyéb, kinázok
QL-XI-92	DDR1	Egyéb
QL-XII-47	BTK, BMX	Egyéb, kinázok
QL-XII-61	BMX, BTK	Egyéb, kinázok
QS11	ARFGAP1	Egyéb

<b>Drog neve</b>	<b>Célpontja, hatása</b>	<b>Működési útvonal</b>
Quizartinib	FLT3	RTK jelátvitel
Rapamycin	MTORC1	PI3K/MTOR jelátvitel
Refametinib	MEK1, MEK2	ERK MAPK jelátvitel
RO-3306	CDK1	Sejtciklus
rTRAIL	TRAIL receptor agonista	Apoptózis szabályozó
Rucaparib	PARP1, PARP2	Genom integritás
Ruxolitinib	JAK1, JAK2	Egyéb, kinázok
Salubrinal	EIF2A	Egyéb
Saracatinib	ABL, SRC	RTK jelátvitel
SB216763	GSK3A, GSK3B	WNT jelátvitel
SB505124	ALK4, ALK5	RTK jelátvitel
SB52334	ALK5	RTK jelátvitel
SB590885	BRAF	ERK MAPK jelátvitel
Seliciclib	CDK2, CDK7, CDK9	Sejtciklus
Selisistat	SIRT1	Kromatin hiszton acetiláció
Selumetinib	MEK1, MEK2	ERK MAPK jelátvitel
Sepantronium bromide	BIRC5	Apoptózis szabályozó
Serdemetan	MDM2	p53 útvonal
SGC0946	DOT1L	Kromatin hiszton metiláció
Shikonin	nincs meghatározva	Egyéb
SL0101	RSK, AURKB, PIM1, PIM3	Egyéb
SN-38	TOP1	DNS replikáció
SNX-2112	HSP90	Protein stabilitás és lebomlás
Sorafenib	PDGFR, KIT, VEGFR, RAF	RTK jelátvitel
STF-62247	Autofágia indukáló	Egyéb
S-Trityl-L-cysteine	KIF11	Mitózis
Sunitinib	PDGFR, KIT, VEGFR, FLT3, RET,	RTK jelátvitel
T0901317	LXR, FXR	Egyéb
TAK-715	p38alpha, p38beta	JNK and p38 jelátvitel

<b>Drog neve</b>	<b>Célpontja, hatása</b>	<b>Működési útvonal</b>
Talazoparib	PARP1, PARP2	Genom integritás
Tamoxifen	ESR1	Hormon-kapcsolt
Tanespimycin	HSP90	Protein stabilitás és lebomlás
Temozolomide	DNS alkilező szer	DNS replikáció
Temsirolimus	MTOR	PI3K/MTOR jelátvitel
TGX221	PI3Kbeta	PI3K/MTOR jelátvitel
Thapsigargin	SERCA	Egyéb
THZ-2-102-1	CDK7	Sejtciklus
THZ-2-49	CDK9	Sejtciklus
Tipifarnib	Farnezil-transzferáz (FNTA)	Egyéb
Tivozanib	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3	RTK jelátvitel
TL-1-85	TAK	Egyéb, kinázok
TL-2-105	Nincs meghatározva	Besorolatlan
Tozasertib	AURKA, AURKB, AURKC, others	Mitózis
TPCA-1	IKK2	Egyéb, kinázok
Trametinib	MEK1, MEK2	ERK MAPK jelátvitel
Tretinoin	Retinsav	Egyéb
Tubastatin A	HDAC1, HDAC6, HDAC8	Kromatin hiszton acetiláció
TW 37	BCL2, BCL-XL, MCL1	Apoptózis szabályozó
UNC0638	G9a and GLP metiltranszferáz	Kromatin hiszton metiláció
UNC1215	L3MBTL3	Kromatinnal kapcsolatos
Veliparib	PARP1, PARP2	Genom integritás
Vinblastine	Mikrotubulus destabilizátor	Mitózis
Vismodegib	SMO	Egyéb
VNLG/124	HDAC,RAR	Kromatin hiszton acetiláció
Vorinostat	HDAC inhibitor osztály I, IIa, IIb, IV	Kromatin hiszton acetiláció
VX-11e	ERK2	ERK MAPK jelátvitel
VX-702	p38	JNK és p38 jelátvitel
Wee1 Inhibitor	WEE1, CHEK1	Sejtciklus

<b>Drog neve</b>	<b>Célpontja, hatása</b>	<b>Működési útvonala</b>
WH-4-023	SRC, LCK	Egyéb, kinázok
WHI-P97	JAK3	Egyéb, kinázok
WZ-1-84	BMX	Egyéb, kinázok
WZ3105	SRC, ROCK2, NTRK2, FLT3,	Egyéb
XAV939	TNKS1, TNKS2	WNT jelátvitel
XMD11-85h	BRSK2, FLT4, MARK4, PRKCD,	Egyéb
XMD13-2	RIPK1	Apoptózis szabályozó
XMD14-99	ALK, CDK7, LTK és egyéb	Egyéb
XMD15-27	CAMK2	Egyéb, kinázok
XMD8-85	ERK5, BET	Egyéb
XMD8-92	MAPK7	Egyéb, kinázok
Y-39983	ROCK	Citoszkeleton
YK-4-279	RNS helikáz A	Egyéb
YM201636	PYKIFYVE	Egyéb
ZG-10	JNK1	JNK és p38 jelátvitel
Zibotentan	Endothelin-1 receptor (EDNRA)	Egyéb
Z-LLNle-CHO	gamma-szekretáz	Egyéb
ZM447439	AURKA, AURKB	Mitózis
ZSTK474	PI3K (class 1)	PI3K/MTOR jelátvitel

### 9.3. DRIP-BC-seq találatainak funkcionális annotálása DAVID adatbázissal

DRIP-BC-seq szignifikánsan magas jelet (IP/input) mutató találatai:

Kategória	Megnevezés	Gének száma	%	P-érték	Benjamin i
GOTERM_CC_DIRECT	mitokondrium	37	34,6	8,3E-5	9,6E-3
UP_KW_CELLULAR_COMPONENT	mitokondrium	28	26,2	1,1E-4	2,4E-3
KEGG_PATHWAY	metabolikus útvonal	24	22,4	1,1E-3	5,5E-2
GOTERM_MF_DIRECT	nukleotid kötés	24	22,4	2,1E-3	2,8E-1
GOTERM_MF_DIRECT	ATP kötés	20	18,7	9,6E-3	6,5E-1
GOTERM_MF_DIRECT	transzferáz aktivitás	19	17,8	3,6E-2	1,0E0
GOTERM_BP_DIRECT	DNS-károsodásra való sejtválasz	9	8,4	1,9E-2	1,0E0
GOTERM_CC_DIRECT	mitokondrium belső membránja	9	8,4	4,0E-2	9,2E-1
GOTERM_BP_DIRECT	ion transzport	8	7,5	3,4E-3	2,6E-1
GOTERM_BP_DIRECT	DNS hibajavítás	8	7,5	3,7E-2	1,0E0
UP_KW_BIOLOGICAL_PROCESSES	DNS károsodás	8	7,5	4,4E-2	5,5E-1
UP_SEQ_FEATURE	szubsztrát kötés	8	7,5	4,6E-2	1,0E0
GOTERM_MF_DIRECT	kináz aktivitás	8	7,5	4,8E-2	1,0E0
GOTERM_CC_DIRECT	mitokondrium mátrix	7	6,5	2,1E-2	6,0E-1
GOTERM_BP_DIRECT	mitokondriális genom karbantartás	6	5,6	5,8E-4	1,2E-1
GOTERM_BP_DIRECT	mitokondrium szerveződése	6	5,6	6,5E-4	1,2E-1
GOTERM_BP_DIRECT	makromolekuláris komplexek összeállítása	5	4,7	2,0E-3	2,4E-1
UP_KW_BIOLOGICAL_PROCESSES	hidrogén ion transzport	5	4,7	4,2E-3	1,5E-1
INTERPRO	aldoláz-típusú TIM fehérje	5	4,7	8,1E-3	1,0E0
KEGG_PATHWAY	oxidatív foszforiláció	5	4,7	3,5E-2	8,9E-1
GOTERM_CC_DIRECT	mitokondrium külső membránja	5	4,7	8,4E-2	1,0E0

Kategória	Megnevezés	Gének száma	%	P-érték	Benjamin i
GOTERM_BP_DIRECT	ATP szintézishez kapcsolt protontranszport	4	3,7	3,5E-3	2,6E-1
GOTERM_CC_DIRECT	mitokondriális protont szállító ATP szintáz, álló része	3	2,8	7,6E-4	4,4E-2
GOTERM_CC_DIRECT	mitokondriális kromoszóma	3	2,8	3,7E-3	1,4E-1
GOTERM_MF_DIRECT	hidrogénion transzmembrán transzporter aktivitás	3	2,8	1,5E-2	7,8E-1
GOTERM_BP_DIRECT	ATP bioszintézis	3	2,8	2,5E-2	1,0E0
GOTERM_MF_DIRECT	protontranszportáló ATPáz aktivitás, rotációs mechanizmus	3	2,8	3,3E-2	1,0E0
GOTERM_BP_DIRECT	intracelluláris mRNS lokalizáció	3	2,8	3,9E-2	1,0E0
GOTERM_MF_DIRECT	exonukleáz aktivitás	3	2,8	5,2E-2	1,0E0
KEGG_PATHWAY	glicerolipid metabolizmus	3	2,8	9,8E-2	1,0E0
GOTERM_BP_DIRECT	protein foszforiláció szabályozása	2	1,9	3,3E-2	1,0E0
GOTERM_BP_DIRECT	triglicerid homeosztázis	2	1,9	3,3E-2	1,0E0
GOTERM_CC_DIRECT	H3 hiszton acetiltranszferáz komplex	2	1,9	4,8E-2	9,2E-1
GOTERM_BP_DIRECT	chorismate bioszintézis	2	1,9	6,5E-2	1,0E0
GOTERM_BP_DIRECT	hiszton H3-K56 acetiláció	2	1,9	6,5E-2	1,0E0
GOTERM_CC_DIRECT	ERMES komplex	2	1,9	7,8E-2	1,0E0
GOTERM_BP_DIRECT	mitokondrium-ER kapcsolódás	2	1,9	8,0E-2	1,0E0
GOTERM_BP_DIRECT	inozitol-foszfát bioszintetikus folyamat	2	1,9	8,0E-2	1,0E0
GOTERM_BP_DIRECT	mitokondriumok pozicionálása	2	1,9	8,0E-2	1,0E0
GOTERM_BP_DIRECT	mitokondrium fúzió	2	1,9	9,5E-2	1,0E0

**DRIP-BC-seq szignifikánsan alacsony jelet (IP/input) mutató találatai:**

Kategória	Megnevezés	Gének száma	%	P-érték	Benjamini
GOTERM_CC_DIRECT	citoplazma	45	50,6	1,9E-2	1,0E0
UP_KW_MOLECULAR_FUNCTI	DNS-kötő	10	11,2	8,2E-2	1,0E0
UP_KW_DOMAIN	jelátvitel	9	10,1	9,7E-2	1,0E0
GOTERM_MF_DIRECT	ubikvitin kötő	7	7,9	4,4E-5	5,9E-3
UP_KW_BIOLOGICAL_PROCES	ubikvitin konjugációs folyamat	7	7,9	1,1E-2	3,3E-1
GOTERM_BP_DIRECT	gomba típusú sejtfa szerveződés	6	6,7	4,1E-2	1,0E0
GOTERM_BP_DIRECT	katalitikus aktivitás szabályozása	6	6,7	4,1E-2	1,0E0
UP_KW_PTM	lipoprotein	6	6,7	6,9E-2	8,3E-1
UP_KW_LIGAND	NADP	5	5,6	3,4E-2	4,7E-1
INTERPRO	ubiquitin rendszerkomponens	4	4,5	1,8E-4	2,4E-2
GOTERM_BP_DIRECT	sejtmag részletekbeni	4	4,5	1,8E-2	1,0E0
GOTERM_BP_DIRECT	CVT útvonala	4	4,5	2,8E-2	1,0E0
KEGG_PATHWAY	autofágia	4	4,5	5,8E-2	1,0E0
GOTERM_CC_DIRECT	endoplazmatikus retikulum	4	4,5	6,9E-2	1,0E0
GOTERM_BP_DIRECT	késői sejtmag autofágia	3	3,4	2,2E-2	1,0E0
GOTERM_BP_DIRECT	vacuolumok öröklődése	3	3,4	2,7E-2	1,0E0
GOTERM_BP_DIRECT	autofagoszóma összeszerelés	3	3,4	4,6E-2	1,0E0
INTERPRO	glikozid-hidroláz, szupercsalád	3	3,4	5,9E-2	1,0E0
COG_ONTOLOGY	szénhidrát szállítás és anyagcsere	3	3,4	6,5E-2	7,1E-1
GOTERM_BP_DIRECT	mitofágia	3	3,4	9,5E-2	1,0E0
SMART	Vacuolar sorting protein 9	2	2,2	3,6E-2	5,2E-1
PIR_SUPERFAMILY	aldo-keto reduktáz	2	2,2	4,6E-2	2,3E-1
GOTERM_BP_DIRECT	D-xilóz katabolikus folyamata	2	2,2	5,4E-2	1,0E0
GOTERM_BP_DIRECT	arabinóz katabolikus folyamata	2	2,2	5,4E-2	1,0E0
GOTERM_MF_DIRECT	karbonil-reduktáz (NADPH)	2	2,2	5,5E-2	1,0E0
GOTERM_MF_DIRECT	alditol:NADP <sup>+</sup> 1-oxidoreduktáz	2	2,2	8,2E-2	1,0E0
GOTERM_CC_DIRECT	endocitotikus vezikula	2	2,2	9,1E-2	1,0E0

## 10. 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.

# 11. 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-Mázló, 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.

