

Szerződésszám:	NKFIH ERC_HU_15 117670	Záróbeszámoló
----------------	---------------------------	---------------

Szakmai záró beszámoló (Z)/ fenntartási jelentés (FJ)

(2012.01.01. után meghirdetett NKFI Alap pályázatok nyertes projektjei számára)

Projekt címe:	A Set1 hiszton metiláz komplex molekuláris biológiai vizsgálata: DNS törésektől a kromatin interakciós hálózatokig
Kedvezményezett(ek)(*):	(1) Debreceni Egyetem (2) (3) (4) (5)
Projektvezető neve:	Dr. Székvölgyi Lóránt
Projekt szerződött támogatási összege (Ft)	44 928 000
Projekt szerződött saját forrásának összege (Ft)	
A projekt tényleges kezdési és záró időpontja (dátum):	2016.09.01-2018.08.31.
A projekt fenntartási időszakának hossza (X év); kezdési időpont (dátum):	-

(*) Konzorcium esetén kérjük minden Kedvezményezettet soroljon fel!

.....
Név (nyomtatott betűvel)
Projektvezető

Szerződésszám:	NKFIH ERC_HU_15 117670	Záróbeszámoló
----------------	---------------------------	---------------

1. Projekt célja

Az utóbbi évek kutatásai egyre mélyebb szinten tárták fel az ún. magasabbrendű kromatin szerkezet molekuláris rétegeit, ám a genom architektúrát létrehozó hiszton és nem-hiszton fehérjék illetve nem-kódoló RNS-ek szerepéről keveset tudunk. Jelen projektben célunk a kromatin szerkezeti változások kutatása modern genomikai és biofizikai módszerek ötvöztetésével, különös tekintettel a Set1C/COMPASS hisztonmódosító enzimkomplex szerepére és bizonyos nem-hagyományos DNS struktúrák (pl. R-hurkok, nick-ek) vizsgálatára. Eredményeink feltárhatják, hogy a kromatin szerkezet elemei milyen genetikai és/vagy epigenetikai mechanizmus szerint formálódnak az eukarióta sejtekben és öröklődnek a generációk között.

2. A projektben vállalt eredmények bemutatása a projekt zárásakor, / a fenntartási időszak alatt

A támogatási időszak első periódusában klasszikus és molekuláris genetikai módszerekkel (keresztelés, transzformáció, tetrádanalízis) létrehoztuk azokat a kritikus mutáns élesztő sejteket (>140 törzs), amelyeket a továbbiakban genomikai módszerekkel vizsgáltunk (ChIP-seq, DRIP-seq, competition ChIP).

ChIP-szekvenálással a COMPASS/Set1C hiszton metiláz enzim komplex több alegységének (Bre2, Spp1, Set1) meghatároztuk a cisztromját (genomi lokalizációját) több metabolikus kondícióban (mitotikus osztódás során gazdag és éhezési táptalajon, meiotikus differenciáció során sporulációs táptalajon). Ugyanezen körülmények között DRIP szekvenálással feltérképeztük a kromoszómális R-hurkok cisztromját.

Az R-hurkokat az utóbbi módszerrel szintén feltérképeztük többféle humán és egér sejttypusban (PBMC, Jurkat, Hela, mESC). Az így kapott cisztrom adatokat térstatisztikai és matematikai módszerekkel rátérképeztük publikus bioinformatikai adatbázisokból elérhető nagyfelbontású térbeli genomszerkezet modellekre (*in situ* Hi-C) és a munkatervnek megfelelően elkezdjük a vizsgált struktúrák térbeli topológiai viszonyainak a matematikai analízisét.

Az eredeti DRIP-seq módszer módosításával bevezettünk egy új genomikai térképezési metodikát, amely a kromoszómális R-hurkok kísérletes kimutatására alkalmas bármely modellszervezetben. Nagy szenzitivitású és specificitású metodikánkból (Halász L et al Genome Res 2017; Roszik J et al Mol Therapy 2017), a gyakorlati jelentőségen túl, messzemenő elméleti következtetéseket is levontunk, amelyek érintik például a térbeli genomszerkezet vizsgálatával kapcsolatos kérdéseket, vagy az evolúciós homológia keresés módszertanát.

A Set1C/COMPASS fehérjék biológiai funkcióját összefüggésbe hoztuk fehérjekomplex kromatin-kötődési dinamikájával. Beállítottunk egy új, kvantitatív ChIP-seq módszert (kompetíciós ChIP: c-ChIP), amely differenciális tag-ekkel jelölt fehérjék konstitutív és indukálható expresszióján alapul. Létrehoztuk a megfelelő kompetíciós törzseket, amelyekben elvégeztük a fenti dinamikus ChIP-seq analízist. A ChIP eredményeinket FRAP és FCS mérésekkel validáltuk az egyedi sejtek szintén. Megállapítottuk, hogy az Spp1 és a Set1 holokomplex teljesen eltérő kromatin kötődési dinamikai sajátosságokkal rendelkezik (eltérő turnover rate, eltérő residence time, eltérő diffúziós állandó és látszólagos molekulatömeg), amely arra utal, hogy az Spp1-nek önálló, a Set1C komplexen kívüli (attól független) szerepe van a meiotikus rekombinációs során. Az Spp1 fehérjék egy része leválik a Set1C-ről, amely során lecsökken a kromoszómális turnover-e, feltehetően a Mer2 kromatintengely fehérjéhez történő kihorgonyzás miatt. Utóbbi hipotézist funkcionális vizsgálatokkal is igazoltuk: Mer2-hoz kötődni nem képes mutáns Spp1 teljesen más kromatin dinamikát mutatott a vad típusú allélhez képest (Karányi Zs et al J Cell Biol 2018).

A COMPASS fehérjék mellett az R-hurkok és kromatin hurkok szerepét is vizsgáltuk a térbeli genomszerkezet tükrében. Saját és publikált Hi-C adatokban felfedeztünk egy nagyon érdekes térbeli interakciót, amely az indoleamine-2,3-dioxygenase (*IDO*) gén promotere és egy távoli CTCF kötőhely között alakul ki. Az *IDO* expresszió szabályozásáról egy külön publikáció született (Hornýák L et al

Szerződésszám:	NKFIH ERC_HU_15 117670	Záróbeszámoló
----------------	---------------------------	---------------

Frontiers Immun 2018), amely elsőszerzője a csoport egyik ötödéves medikus tudományos diákkörös hallgatója.

3. A tervezett, illetve ebből megvalósított célok, eredmények összevetése, differenciák indoklása

Az R-hurkok vizsgálata mellett a kromatinszerkezeti kutatásunkat kiterjesztettük egy onkohiszton fehérjére (H3.3 K27M), amely bizonyítottan okozati szerepet játszik a gyermekkori glioblasztómák kialakulásában, viszont a betegség kialakulásának pontos molekuláris mechanizmusa nem ismert. Klasszikus (élesztő) genetikai és biofizikai módszerekkel (mutagenézis, FRET, FRAP, FCS) karakterizáltuk a mutáns hiszton szerkezeti és kinetikai (diffúziós) sajátosságait, és megállapítottuk, hogy az onkohiszton humán sejtekben transzkripció függő módon befolyásolja a H3K27 metiláz komplex (PRC2) katalitikus alegységének (Ezh2) a kinetikai sajátosságait (Hetely Sz et al. BBRC 2017)

Nem várt ága a kutatási projektnek az eredményeink nyomán született nagyszámú új kollaboráció. Új R-loop térképezési módszerünkre alapozva (Halász L et al Genome Res 2017) klinikai partnerekkel elindítottunk egy kromoszómális R-hurkok patológiás szerepét vizsgáló projektet. Amiotrófiás laterális szklerózisban (ALS) és szisztémás szklerózisban szenvedő betegektől származó vérmintákból mononukleáris sejteket szeparáltunk és a mintákon citológiai és genomikai vizsgálatokat végeztünk.

R-hurok térképezési módszerünkre alapozva (Halász L et al. Genome Research 2017) kifejlesztettünk egy DNS egyszál törés („nick”) kimutatására alkalmazható genomikai módszert (Nick-seq), amely segítségével *S. cerevisiae* sejtekben feltérképeztük a nick-ek genomiális eloszlását és megállapítottuk, hogy a nick-ek a kromatin hurkok letapadási pontjainál dúsulnak és a génes transzkripció aktivitásával pozitívan korrelálnak (Hegedüs E et al Nucleic Acids Res 2018).

Kollaborációs partnerekkel végzett kutatásainkban humán uveális melanómákban kimutattuk a 3-as és 4-es kromoszómák együttes számbeli eltérését és annak korrelációját a betegség kimenetelével/prognózisával (Sipos E et al Oncology Rep 2017).

Egy másik kollaborációs kutatásban humán cervix karcinómákban olyan neoantigéneket azonosítottunk, amelyek egy része a humán papilloma vírus (HPV) ismert „master” regulátor fehérjéinek szomatikus mutációjával keletkeztek; felfedezésünk orvosi biológiai jelentősége, hogy a mutáns neopeptid szakaszok hatékony immunterápiás célpontokká válhatnak (Qin Y et al. Frontiers Immun 2017).

Kollaborációs partnerünkkel folytattuk a humán uveális melanómákban végzett kutatásainkat és FISH, RIA és molekuláris módszerekkel megállapítottuk, hogy az emberi luteinizáló hormon-releasing hormon receptor type I (LH-RH-I) kiváló terápiás célpontja lehet a citotoxikus LH-RH-I analógoknak a malignus melanómák egyes formáiban (Sipos E et al Oncotargets and Therapy 2018).

A kutatási periódusban 11 publikáció született, amelyek összesített impakt faktora 56.215.

Szerződésszám:	NKFIH ERC_HU_15 117670	Záróbeszámoló
----------------	---------------------------	---------------

szerzők neve	megjelenés éve	Dokumentum típusa	Impakt faktor	NKFI támogatás feltüntetve?
Eva Hegedus, Endre Kokai, Péter Nánási, László Imre, László Halász, Rozenn Josse, Zsuzsanna Antunovics, Martin Webb, Aziz el Hage, Yves Pommier, Lóránt Székvölgyi, Viktor Dombradi, Gábor Szabó: Endogenous single-strand DNA breaks at RNA polymerase II promoters in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Nucleic Acids Research</i> , 2018	2018	folyóiratcikk	11.561	igen
Eva Sipos, Nikoletta Dobos, David Rozsa, Klara Fodor, Gabor Olah, Zsuzsanna Szabo, Lorant Szekvolgyi, Andrew V Schally, Gabor Halmos: Characterization of luteinizing hormone-releasing hormone receptor type I (LH-RH-I) as a potential molecular target in OCM-1 and OCM-3 human uveal melanoma cell lines, <i>OncoTargets and Therapy</i> , 2018	2018	folyóiratcikk	2.656	nem
Lilla Hornyák, Nikoletta Dobos, Gábor Koncz, Zsolt Karányi, Dénes Páll, Zoltán Szabó, Gábor Halmos, Lóránt Székvölgyi: The role of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) in cancer development, diagnostics, and therapy, <i>Frontiers in Immunology</i> , 2018	2018	folyóiratcikk	5.511	igen
Zsolt Karányi, László Halász, Laurent Acquaviva, Dávid Jónás, Szabolcs Hetey, Beáta Boros-Oláh, Feng Peng, Doris Chen, Franz Klein, Vincent Géli, Lóránt Székvölgyi: Nuclear dynamics of the Set1C subunit Spp1 prepares meiotic recombination sites for break formation, <i>Journal of Cell Biology</i> , 2018	2018	folyóiratcikk	8.784	igen
Éva Sipos, Kata Hegyi, Andrea Treszl, Zita Steiber, Gabor Mehes, Nikoletta Dobos, Klara Fodor, Gabor Olah, Lóránt Székvölgyi, Andrew Schally V, Gábor Halmos: Concurrence of chromosome 3 and 4 aberrations in human uveal melanoma, <i>Oncology Reports</i> , 2017	2017	folyóiratcikk	3.122	nem
Jason Roszik, György Fenyőfalvi, László Halász, Zsolt Karányi, Lóránt Székvölgyi: In Silico Restriction Enzyme Digests To Minimize Mapping Bias In Genomic Sequencing., <i>Molecular Therapy - Methods & Clinical Development</i> , 2017	2017	folyóiratcikk	3.681	igen
László Halász, Zsolt Karányi, Beáta Boros-Oláh, Tímea Rózsa, Éva Sipos, Éva Nagy, Ágnes Mosolygó-L, Anett Mázló, Éva Rajnavölgyi, Gábor Halmos, Lóránt Székvölgyi: RNA-DNA hybrid (R-loop) immunoprecipitation mapping: an analytical workflow to evaluate inherent biases, <i>Genome Research</i> , 2017	2017	folyóiratcikk	11.922	igen
Mosolygó-L Ágnes, Székvölgyi Lóránt: Az AtNDX transzkripció faktor és az R-hurkok kromoszómális topográfiája, <i>Biokémia</i> , 2017	2017	folyóiratcikk	-	nem
Péter Nanasi, László Imre, Attila Horvath, László Halasz, András Szanto, Hiroshi Kimura, Lóránt Szekvolgyi, László Nagy, Gábor Szabo: Breaking good: + 1 nucleosome destabilization by nicking, <i>FEBS Journal</i> , 2017	2017	konferenciak	-	nem
Szabolcs Hetey, Beáta Boros-Oláh, Tímea Kuik-Rózsa, Qiuzhen Li, Zsolt Karányi, Zoltán Szabó, Jason Roszik, Nikoletta Szalóki, György Vámosi, Katalin Tóth, Lóránt Székvölgyi: Biophysical characterization of histone H3.3 K27M point mutation, <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> , 2017	2017	folyóiratcikk	2.559	igen
Yong Qin, Suhendan Ekmekcioglu, Marie-Andrée Forget, Lóránt Székvölgyi, Patrick Hwu, Elizabeth A Grimm, Amir A Jazaeri, Jason Roszik: Cervical Cancer Neoantigen Landscape and Immune Activity is Associated with Human Papillomavirus Master Regulators, <i>Frontiers in Immunology</i> , 2017	2017	folyóiratcikk	6.42	nem

Szerződésszám:	NKFIH ERC_HU_15 117670	Záróbeszámoló
----------------	---------------------------	---------------

4. A projekt utóéletének bemutatása

Az R-loop-ok amiotrófiás laterális szklerózisban (ALS) betöltött szerepét vizsgáló kutatásunkra 8 kollaborációs partnerrel beadtunk egy nemzetközi konzorciális európai uniós pályázatot (proposal N° ERARE18-066:REPETOMICS; budget: 1.8M EUR). Jelenleg a pályázat második körébe jutva (139 benyújtott pályázatból 9 jutott a végső körbe) várjuk a végső támogatói döntést. Sikeresen a projekt 2019-ben indulna.

A csoportvezető 2017-ben egy szegedi konzorcium tagjaként elnyert egy GINOP pályázatot (GINOP 2.3.2-00024; teljes budget: 980 MFt; Székvölgyi lab: 162 MFt), amelyben a célzott génterápiák kapcsán végzünk R-hurkokkal kapcsolatos kutatásokat.

A beszámolási periódusban két média megjelenésünk volt (interjú az Aix-Marseille Egyetem tudományos csatornájában), illetve több tudományszerűsítő cikkben mutattuk be a csoport munkáját.

<http://www.haon.hu/debreceni-kulcs-a-genomikai-kutatasokhoz/3472384>

<https://www.dailymotion.com/video/x4qsfri>

A kutatócsoport tagjai rendszeresen részt vesznek az egyetemi graduális és posztgraduális képzésben a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Karán (általános biokémia, molekuláris biológia, sejt- és szervbiokémia, biostatisztika), ahol mintegy 640 kontakt órát adtunk a csoport indulása óta - tantermi előadások, szemináriumok és gyakorlatok formájában.

A beszámolási periódusban négy tudományos diákköri pályamunka/diplomavédés történt a csoportvezető témavezetésével: Gyapjas Boglárka (2016), jeles; David Li Qiuzhen (2016): jeles; Deák Tímea Kinga (2016), jeles; Tóth Erzsébet (2017), jeles.

A kutatócsoport-vezető akkreditált témavezető a Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai doktori iskolában, ahol a csoport indulása óta 2 Ph.D. hallgató szerzett abszolutóriumot (Hetey Szabolcs, jeles; Halász László, jeles; a Ph.D. védések várható időpontja: 2018. december/2019. január).

A csoportvezető kiemelkedő tudományos teljesítményéért és tudományos közéleti tevékenységéért 2017-ben elnyerte a Magyar Genetikusok Egyesülete (MAGE) által adományozott *Győrfy Barna* díjat.