

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

A Retinoid X Receptor funkciójának vizsgálata egér csontvelői-eredetű makrofágokban újszerű genomikai módszerekkel

Dániel Bence

Témavezető: Prof.Dr. Nagy László



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2014

A Retinoid X Receptor funkciójának vizsgálata egér csontvelői-eredetű makrofágokban újszerű genomikai módszerekkel

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

Írta: **Dániel Bence**

okleveles Molekuláris Biológus

Készült a Debreceni Egyetem

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia doktori iskolája keretében

Témavezető: Prof. Dr. Nagy László, az MTA rendes tagja

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora

tagok: Dr. Nagy Péter, az MTA doktora

Dr. Apáti Ágota, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja: DE ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

2014. november 10. 13 óra

Az értekezés bírálói: Dr. Bay Péter, PhD

Dr. Eric Soler, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Iannis Talianidis, az MTA külső tagja

Prof. Dr. Tora László, az MTA külső tagja

Dr. Bay Péter, PhD

Dr. Eric Soler, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

In Vitro Diagnosztikai Tömb nagy előadó terme

2014. november 18. 10 óra

Bevezetés

A génextpresszió szabályozása

A gének szabályozásának legalapvetőbb mechanizmusait az 50-es években írta le a híres Francois Jacob és Jacques Monod páros. A prokarióta rendszereket használó kutatócsoport elsőként igazolta, hogy egy transz-ható elem képes szabályozni egy közeli gén expresszióját. Ezek a kísérletek mutatták ki először és vezettek ahhoz az elképzeléshez, hogy a transzkripció szintjén szabályozott regulátor faktor képes ugyancsak a transzkripció szintjén hatni egy másik génre. Ezek a megfigyelések fektették le az alapjait a napjainkban egyik leginkább fejlődő és nagy népszerűségnek örvendő tudományágnak, a génextpresszió szabályozásának, melynek céljai teljesen megváltoztak és inkább a globális vizsgálatok (genomika), mint az individuális gének szintjén működik.

A Jacob és Monod által tanulmányozott bakteriális, prokarióta rendszerekben a gének szabályozása nagymértékben eltér az eukarióta génekétől. Ennek hátterében leginkább a fent említett szabályozó elemek (cisz-, transz-elem) állnak. A cisz-elemek a DNS-ben található szekvenciák, amelyek különböző transz-elemeket (transzkripciót szabályozó fehérjék) kötve képesek a gének szabályozását ellátni. Bakteriális rendszerekben ezek tanulmányozása a megfelelő metodikai repertoárral nem jelent óriási kihívást, mivel a gének nagy része operonokba tömörülve egy-két proximális szabályozó elemről történhet. Ezzel szemben az eukarióta sejtek sokkal nagyobb diverzitással rendelkeznek a génszabályozás aspektusában. Esetükben a cisz-ható elemek elhelyezkedése nem annyira kiszámítható, mint a prokariótákban. Az eukarióta sejtekben egy gén akár több cisz-regulátor elem szabályozása alatt is állhat, nem beszélve arról, hogy az elhelyezkedésük akár több száz kilobázis is lehet 5' vagy 3' irányban a célgéntől. Ezek a tények nagymértékben rámutatnak az akkori technológia gyengepontjaira, ugyanis kezdetben csak a gén közelében lévő elemek voltak azonosíthatóak az úgynevezett promóter „bashing” technika, amelynek során a promóter szekvenciát egyre rövidebb darabokra vágva meghatározható a funkcionális transzkripciós faktor motívum. Ennek

tudatában érthető, hogy miért volt gyakorlatilag lehetetlen a disztális cisz-elemek azonosítása. Valamiféle technológiai áttörésre volt szükség, hogy tovább lehessen haladni és meghatározni az adott sejtre jellemző cisz-elem hálózatot és azt valahogyan a célgénekhez kötni globális szinten.

A technológiai áttörés

Az első kísérletek a transzkripció globális megjelenítésére 1982-ben történtek, amikor a manapság jól ismert microarray technológia őseit használták fel, hogy egészséges és tumoros minták közti génexpressziós különbségeket mutassanak ki. A microarray technológiát nemcsak génexpressziós mérésekre használták. Több, molekuláris biológiai módszerhez kapcsolva, mint például kromatin immunoprecipitáció (ChIP), már közel genom-szintű információt tudott nyújtani például transzkripció faktorok kötőhelyeiről, vagy kromatin modifikációk hollétéről.

Az utóbbi években történt technikai újítások teljes mértékben megreformálták a genom-szintű molekuláris biológiát. A szekvenálási platformok rohamos fejlődése és azok ChIP-hez vagy más módszerekhez (DNáz I hiperszenzitív helyek- és mRNS szekvenálása) kapcsolása szinte teljes mértékben kiszorították a microarray alapú módszereket. Olyan módszerek, mint a „Chromosome Conformation Capture” (3C) és annak módoszatai ugyancsak szekvenáláshoz lettek kapcsolva, biztosítva ezzel a teljes genom szintű kromoszóma interakciók vizsgálatát és az enhanszerek működésének globális megértését. Az egyik legjelentősebb technológiai áttörést azonban az úgynevezett „Run-On” technológia szekvenálással való összekapcsolása hozta (Global Run-On sequencing, GRO-seq), ami képes a frissen keletkezett éretlen RNS mennyiségét, pozícióját és irányultságát meghatározni, ráadásul rendelkezik azzal a tulajdonsággal, hogy a funkcionális enhanszereket képes kimutatni, mivel azok úgynevezett enhanszer transzkripteket generálnak, miközben szabályozzák célgénjeiket.

A kialakult technikák egyedül is képesek voltak megreformálni a génexpressziós kutatásokat, azonban hamar egyértelművé vált, hogy kombinációjuk elengedhetetlen ahhoz, hogy teljes mértékben megértsük azokat a molekuláris mechanizmusokat,

amelyek génjeink finomhangolásáért felelősek, ezzel kialakítva a magasabbrendű szervezetek sokféleségét.

Diverzitás mesterfokon

A magasabbrendű organizmusok több sejtípust tartalmaznak, amelyek ugyanazzal a genetikai háttérrel rendelkeznek, mégis funkciójukat tekintve teljesen eltérőek. Az emberi szervezetben például hozzávetőleg 220-féle sejtípus található, amelyek funkciójukat tekintve óriási sokféleséget mutatnak. Hogyan lehetséges mindez? Hogyan képesek a sejtek ugyanazt a genetikai anyagot felhasználva ilyen változatosságot kialakítani? Ezekre a kérdésekre a válaszokat csak a fent említett teljes-genom szintű vizsgálatok segítségével tudhatjuk meg, melyeket integrálva talán megfejtethető egy jel teljes genom szintű hatása, mint a gének mind az azokat szabályozó cisz-elemek szintjén.

A cisz-elemek dekódolása, ENCODE projekt

A magyarázatot a sejtek funkcionális sokféleségére, a nem-kódoló (intronikus, intergenikus) genomi régiókban kell keresnünk főként. Mostani tudásunk szerint a humán genom hozzávetőleg 20000 fehérjét kódoló gént tartalmaz, ami mindössze 1.5%-át teszi ki a teljes genomnak. Hatalmas érdeklődés övezi a maradék 98.5% funkcióját, amelyet a genom program befejeztével „junk”-nak, azaz szemétnek tituláltak. A 2012-ben befejezett ENCODE (Encyclopedia of DNA elements) projekten belül több neves kutatócsoport fogott össze azzal a céllal, hogy azonosítsa a nem-kódoló DNS rejtett funkcióit. A projekt végeredménye egy hatalmas méretű cisz-elem hálózat azonosítása lett, több mint 1600 kísérleti adatot felhasználva 147 különböző sejtípusból. Az adatokból kiderül, hogy a genom 80%-a rendelkezhet cisz-elem funkcióval és a kromatin módosítások alapján 400000 enhancer elem és 70000 promóter elem állhat rendelkezésre differenciálódás során a sejtek számára.

A kérdés már csak az, hogy a sejtek hogyan használják ki ezeket az elemeket és hogyan tudja megszabni, melyik működjön és melyik nem a differenciálódási program során.

Pionír faktorok és a magasabb rendű kromatin szerkezet, mint cisz-elem determináló tényezők

Az ENCODE projekt elsődleges célja a cisz-elemek azonosítása volt sejttípus függő módon. Ezek a sokszor sejt specifikus hatással rendelkező DNS darabok, bizonyos fehérjék jelenlétében válnak aktívvá és képesek hozzájárulni az adott gén program elindításához. Ezekben a programokban játszanak fontos szerepet azok a transzkripciós faktorok, amelyek adott sejttípusra jellemző módon fejeződnek ki és akár a zárt kromatin struktúrához kötődve is képesek azt a későbbi funkcionális cisz-elemek régióiban felnyitni, és átalakítani a lokális kromatin környezetet. Az ilyen aktivitással rendelkező faktorokat nevezzük pionír faktoroknak, amelyek irányítják a funkcionális cisz-elem hálózat kiépülését a differenciálódási program során. Az így megjelölt kromatin szakaszok már készen állnak a különböző szignálokra érkező transzkripciós faktorok fogadására.

Köztudott, hogy a kromatin két fő típusa jellemző egy sejtre: a heterokromatin és az eukromatin. A heterokromatin reprezentálja a génexpressziósan inaktív genomi régiókat, míg az eukromatin értelemszerűen az aktív régiókra jellemző nyitott kromatin szerkezet. Több publikáció is beszámol arról, hogy ezek térben jól szeparáltan helyezkednek el a sejtmagban. A heterokromatin inkább a magmembránhoz közeli régiókban található, míg az eukromatin a sejtmag középpontjában helyezkedik el. Ennek a szerkezetnek kétségtelenül nagy hatása van a sejttípus függő génexpresszióra **és az inzulátor** elemek felfedezése közelebb vitt minket ahhoz, hogy megértsük ennek a rendszernek az alapelveit. Az inzulátorok egy újabb csoportját adják a cisz-elemeknek, amelyek úgy lettek azonosítva, mint enhancer/promóter interakciókat blokkoló régiók. Nem sokkal később az inzulátorokon ható transz-elemet is azonosították, ami a CTCF nevet kapta az általa kötött CCCTC motívumról. Felfedezése után rövidesen kimutatták róla, hogy

transzkripció szempontból aktív/passzív genomi régiókat elválasztó egyfajta határvonalaként működik. Később még inkább a középpontba került, mint a magasabb rendű kromatin szerkezet szabályozó faktora miután kimutatták, hogy kölcsönhatásban áll a kohezin komplex komponenseivel, amelyeknek kritikus szerepe van a testvér kromatidák összetartásában a sejtciklus metafázisa során. Napjainkban több genom szintű adat bizonyítja azt, hogy ezek a faktorok együttműködve szabályozzák a kromatin szerkezetet ezzel lehetővé téve gének szabályozását.

Összefoglalva, a különböző sejt specifikus cisz-elemek először a differenciáció során jelennek meg a sejtre jellemző pionír faktorok hatására és ezek működése tovább szabályozódik a magasabb rendű kromatin szerkezet által, amit főként a CTCF/Kohezin komplex alakít ki. Ezek a legfőbb tényezők, amelyek felelőssé tehetők egy adott sejt típus cisz-elem és gén hálózatának kialakulásáért.

Enhanszerek, mint a cisz-elem készlet kritikus komponensei

A cisz-elemek közül a transzkripciót pozitívan szabályozó DNS szakaszokat nevezzük enhanszer szekvenciáknak, melyek transz-ható faktorokat kötve segítik célgénjeik megfelelő szintű kifejeződését. Megfelelő működésük elengedhetetlen a normál fiziológiás állapot fenntartásához. Felfedezésükkor kiderült, hogy akár nagy távolságokból is képesek a gének szabályozására és elhelyezkedésüket tekintve lehetnek 5' és 3' irányban is a célgénjüktől. Azonosításuk és karakterizálásuk ezért nagy akadályokba ütközött a technológiai újítások előtt. Azonban az új-generációs szekvenálás megjelenése és annak különböző módszerekkel való kombinálása megreformálta és nagyban leegyszerűsítette azonosításuk módját. Először a kromatin immunoprecipitáció teljes genom-szintű alkalmazásával nyertünk betekintést az enhanszerek elhelyezkedésébe. Ezek a publikációk egyértelműen bebizonyították, hogy az enhanszerek nagyrészt a genom nem-kódoló régióiban helyezkednek el, akár több száz kilobázisnyi távolságra az általuk szabályozott génektől. Az adatok sokasága egyre jobb jellemzést adott az enhanszerek kromatin jellegéről és a rajtuk található faktorok természetéről is. Az így kialakult konszenzus alapján az aktív enhanszerek jellegzetes kromatin módosításai a H3K4me1, H3K4me2 és H3K27ac, míg az aktivitásukat ugyancsak jól jellemző P300 kofaktor szintén tipikus jellemzőjük.

Az RNS és GRO szekvenálás egy újabb jelentős tulajdonságát tárta fel az aktív enhanszereknek, nevezetesen azt, hogy a regulátor elemeket kötő faktorok mellett transzkripció zajlik, létrehozva az úgynevezett enhanszer transzkripteket, vagy eRNS-eket. Kiderült az is róluk, hogy egy szignálra specifikus transzkripció faktor hatására az adott enhancerről szintetizálódó eRNS mennyisége nagyon jól korrelál a célgéneen történő transzkripció hatással, ezzel egy hatalmas segítséget adva azokhoz a tanulmányokhoz, melyekben egy adott szignálra bekapcsolódó génhálózat és az azt szabályozó regulátor elemek feltérképezése a cél. Nem sokkal a felfedezésüket követően hatalmas érdeklődés övezte ezeket a nem kódoló RNS molekulákat. Főként azért mert nem lehetett tudni, vajon milyen funkcionális jelentőséggel bírhatnak. Több vezető kutatócsoport a területen, céljaul tűzte ki ezeknek a vizsgálatát. Az eredményeikből kiderül, hogy a keletkező eRNS mennyisége hatással van a célgénről történő transzkripció erősségére, ha az eRNS-t specifikusan degradálták, a regulált gén szintje csökkent. Ezen kívül, egyes enhanszereket riporter vektorba klónozva azt is sikerült, kimutatniuk, hogy a szekvenciájuk érintetlensége ugyancsak fontos, hogy betöltsék transzkripciót elősegítő/fenntartó hatásukat. További érdekes eredményt hozott az a kísérlet, melyben az eRNS szint és a promóter/enhanszer régió között létrejövő úgynevezett „loopokat” (kromatin hurkokat) vizsgálták. Kimutatták, hogy az eRNS szint összefüggésbe hozható a promóter/enhanszer interakciók erősségével. Az eRNS degradáció hatására a kromatin hurok gyengült a két szabályozó elem között, amit végül összekapcsoltak a kohezin komplex enhanszer kötésével, ami ugyancsak gyengült, ezzel azt sugallva, hogy az eRNS-ek valószínűleg a kohezin kötetést képesek fokozni, ami által az enhanszer a gén közelébe kerülhet, és a szabályozás megvalósulhat.

Összességében az eredmények tehát azt mutatják, hogy ezeknek a kisméretű RNS molekuláknak valószínűleg kritikus szerepük van a transzkripció szabályozásában, azonban további kutatások szükségesek, hogy azt a molekuláris mechanizmust teljes mértékben megismerjük, amely által mindezt végrehajtják.

Magreceptorok, a cisz-elem hálózat szignál specifikus mozgatórugói

A magreceptorok szupercsaládjába olyan transzkripció faktorok tartoznak, melyek

ligandfüggő módon képesek célgénjeik átíródását aktiválni vagy gátolni. Természetes ligandjaik közé kisméretű molekulák tartoznak, mint például a lipidoldékony szteroid hormonok, a retinoidok és egyes metabolitok, amelyek szabadon képesek átdiffundálni a sejtmembránon.

Ezek a fehérjék képesek a hormonok vagy metabolitok által hordozott információt a genomhoz továbbítani, mivel DNS-kötő doménjük segítségével felismerik és kötődnek specifikus válaszadó szekvenciájukhoz. Kulcsszerepet játszanak olyan alapvető folyamatokban, mint a sejtdifferenciáció, az egyedfejlődés vagy a homeosztázis.

Működésük megértéséhez szükséges két jellegzetes tulajdonságuk ismerete. Az egyik, hogy ligandkötött állapotban - kevés kivételtől eltekintve - dimereket képeznek. A dimerek a különböző hosszúságú szakaszokkal elválasztott dimerspecifikus fél kötőhelyekhez kötődnek. Alkothatnak így egyrészt homodimereket, mint például a glükokortikoid, vagy az ösztrogén receptor, illetve RXR-rel (Retinoid X receptor) heterodimereket is, mint az RAR (Retinsav receptor) és a PPAR (Peroxiszóma proliferáció aktiváló receptor). Az RXR tehát központi szereppel bír a magreceptorok egyik csoportjában. Az RXR-heterodimerek lehetnek permisszív heterodimerek, ha mindkét receptor oldaláról aktiválhatók (például RXR: PPAR), ellentétben a nem permisszív heterodimerekkel (például RXR: RAR), melyek kizárólagosan csak az RXR partnerének oldaláról, illetve págonista ligandokkal aktiválhatók. A másik lényeges jellemző a koregulátorok kötése. A magreceptorok a környező kromatin struktúrára koregulátorokon keresztül fejtik ki hatásukat. Jelenleg több száz ilyen koregulátort ismerünk, melyek hatalmas fehérjekomplexeket képezve egyrészt hidat jelentenek a magreceptorok és a transzkripciós gépezet között, másrészt megvalósítják azt a fajta finoman hangolt kombinációs szabályozást, ami a receptorok sokrétű szerepének az alapja. Működésüket a legjobban a „molekuláris kapcsoló” modellel írhatjuk le, mely szerint a receptor ligand hiányában korepresszorokat kötve gátolja a génexpressziót, majd az aktivátor stimulus hatására megtörténik a korepresszor/koaktivátor csere, így a környező kromatin struktúra megváltozik, ami lehetőséget biztosít a célgén szabályozására.

Kutatócsoportunk a magreceptorok által modulált génexpressziós folyamatok teljes genom-szintű vizsgálatát tűzte ki célul, kihasználva a technológiai újítások adta lehetőségeket. Vizsgálataink középpontjában a már említett RXR receptor állt, melynek funkcionalitását és működési mechanizmusát rengeteg kérdés övezi. Többek között, mivel több magreceptor obligát heterodimerizációs partnere, ezért kérdéses, hogy vajon az aktivációja képes-e egy teljesen individuális gén programot elindítani, amely egy specifikus biológiai választ közöl a sejttel. Egy másik kérdés a fiziológiásan jelenlévő ligand természete, amit a mai napig nem sikerült teljesen tisztázni, annak ellenére, hogy a receptor a szervezet szinte minden sejtípusában kifejeződik és hiánya összeegyeztethetetlen az élettel. A receptor működésének pontos mechanizmusa és az általa szabályozott gének megismerése kulcsfontosságú, főleg ha arra gondolunk, hogy szerepét különböző betegségmodellekben már vizsgálták és igazolták, hogy aktivációja például képes növelni az inzulin érzékenységet diabéteszes állatokban. Alzheimer-kórt modellező állatokban ugyancsak fontos megfigyelést tettek a receptorral kapcsolatban. Nevezetesen azt, hogy a receptor specifikus aktiválása mikrogliaokban és asztrocitákban képes egy olyan fenotípust kialakítani, ami a béta-amiloid plakkok eltávolítását képes elindítani és ezzel javítani a kórképen.

Ezek alapján egyértelmű, hogy a receptor biológiai funkcióinak kutatása fontos és különböző terápiás eljárások kifejlesztése során is releváns célpontként kell tekinteni az RXR receptorra.

A RXR funkciói makrofágokban

A makrofágokban több RXR-el heterodimert alkotó magreceptor fejt ki hatását. Ilyenek például a PPAR γ , amely az oxidált kis denzitású lipoproteinek felvételét és átalakítását mediálja, és az LXR (Liver X receptor), ami a koleszterol efflux és immunválaszt szabályozó hatásáról vált főként ismertté. Ezeket a magreceptorokat és a makrofágban betöltött funkciójukat már korábban összefüggésbe hozták az atheroszklerózis kialakulásával. Ezek alapján az RXR aktiváció vizsgálata jelentős biológiai relevanciával bír a makrofágokban, melynek hátterében álló molekuláris mechanizmusokat minél precízebben meg kell határozni és lehetőség szerint új biológiai funkciókhoz kapcsolni.

Célkitűzések

Amint azt bemutattuk, a cisz-elem hálózatok és az általuk szabályozott gén csoportok meghatározása egyre nagyobb jelentőséggel bír. A különböző szekvenálással kapcsolt molekuláris biológiai technológiák fejlődése miatt ezek azonosítása egyre jobban kivitelezhető és akár teljes-genom szinten is elvégezhető. A munkacsoportunk jelentős tapasztalatokat szerzett e metódusok kivitelezésében.

1. Az IL-4 indukált STAT6 (Signal transducer and activator of transcription) szignalizációs útvonalon keresztül szabályozódó lizoszómális génhálózatot irányító enhanszer csoport validálása volt.
2. Az RXR magreceptor által szabályozott genomi régiókat teljes mértékben feltérképezzük, mind a szabályozott gének, mind a receptor által kötött cisz-elemek szintjén, annak érdekében, hogy új, eddig ismeretlen biológiai funkciót találjunk, amit a receptorhoz tudunk kapcsolni primer, egér csontvelői eredetű makrofágokban.

Anyagok és Módszerek

Csontvelői makrofágok differenciálata

A kísérleti állatok túlaltatását követően eltávolítottuk a hátsó végtagot, melyből a femurt és tibiát használtuk fel. Az így kinyert csontokat ezután fecskendő segítségével kimostuk, majd a csontokból kimosott sejteket ficoll gradiens centrifugálás segítségével elválasztottuk. A gradiens centrifugálást követően a közepén elhelyezkedő sejtréteget használtuk fel és tenyésztettük 10cm-es petri csészékben 5 napon keresztül, L929 felülúszót tartalmazó médiumban. Alternatíván aktivált makrofágok esetében 5ng/ml IL-4-et tartalmazó L929 felülúszót tartalmazó médiumban differenciáltattuk a sejteket.

RNS-szekvenálás

A felhasznált sejtekből Trizol segítségével totál RNS-t izoláltunk. A szekvenáláshoz használt könyvtárakat 2-3 ug totál RNS-ből készítettük, legalább kettő biológiai replikát felhasználva. A könyvtárak elkészítéséhez az Illumina Truseq RNA sample preparation kitet használtuk, a gyártó által ajánlott protokoll szerint.

Kromatin Immunoprecipitáció szekvenálással összekötve (ChIP-seq)

Első lépésként 40 millió sejtet keresztkötöttünk, először DSG-t, majd formaldehidet felhasználva. A sejtekből ezután magot izoláltunk, majd Bioruptor szonikátor segítségével random módon szétaraboltuk a genomot. Specifikus antitesteket felhasználva fehérje/kromatin komplexeket izoláltunk, protein-A-val fedett mágneses gyöngyök segítségével. A gyöngyökön feldúsított komplexeket ezután speciális eluáló pufferrel oldottuk le a mágneses gyöngyök felszínéről. Az így kinyert DNS-t kvantitáltuk

Qbit segítségével, majd 1ng DNS-t felhasználva szekvenáló könyvtárakat készítettünk a Nugen Ovation Ultralow könyvtárkészítő kit segítségével.

Globális Run-On szekvenálás (GRO-seq)

A sejtekből először magot preparáltunk, majd azokat megszámlolva hozzávetőleg 10 millió sejtmagot felhasználva indítottuk el a Run-On reakciót, melynek során 5 percig biztosítottuk a transzkripciót aktívan végző RNS polimerázok zavartalan működését szintetikus nukleotidok jelenlétében, amelyek közül az UTP helyett Br-UTP-t használtunk fel. Az így szintetizálódott éretlen RNS-t savas kémhatású fenol/kloroform extrakcióval izoláltunk. Az RNS molekulákat ezután bázikus hidrolízissel körülbelül 100-200 bázisnyi hosszúságúra emésztettük. A kisebb RNS fragmentumokat Br-UTP ellenes antitesttel fedett agaróz gyöngyökkel izoláltuk és elvégeztük a szekvenáló könyvtár elkészítését.

Kvantitatív PCR mérések

A sejtekből Trizol segítségével totál RNS-t izoláltunk. Az RNS-t ezután reverz transzkriptáz segítségével cDNS molekulává alakítottuk, majd specifikus primerek használatával és SYBRgreen festék segítségével kvantitáltuk a transzkriptek szintjét, melyeket a Ppia háztartási gén szintjére normalizáltunk.

Chromosome Conformation Capture (3C)

A vizsgálatok során a sejteket formaldehid segítségével keresztkötöttük. Ezt követően sejtmagot izoláltunk és permeabilizáltuk a magmembránt. A keresztkötött kromatint ezután HindIII restrikciós enzimmal emésztettük, majd ezt követően kihígítottuk és ligálási reakciót állítottunk össze, amely a reakció térfogata miatt kedvez az intramolekuláris ligációs eseményeknek. A következő lépésben DNS-t izoláltunk, majd RT-QPCR segítségével meghatároztuk a két vizsgált genomi régió interakciós frekvenciáját, több specifikus primer párt használva a ligálás következtében létrejövő új hasítóhelyeken. Eredményeinket primer pár specifikusan és Gapdh-ra is normalizáltuk.

3C szekvenálás

A fent leírt módon nyert 3C DNS-ből inverz PCR reakció segítségével készítettük a szekvenáló könyvtárakat. Olyan enhanszer és promóter specifikus primereket használva, amelyek tartalmazzák az Illumina univerzális adapter szekvenciákat és a különböző minták azonosítására szolgáló barcode-okat. Az így felsokszorozott DNS molekulákat használtuk a fel a későbbi szekvenálási reakciókban.

Tranziens transzfekeció

Az azonosított cisz-elemeket PCR segítségével sokszoroztunk fel genomi DNS-t és BAC konstruktokat felhasználva. Ezeket a szekvenciákat pUC18 HSV TK-LUC riporter plazmidokba klónoztuk. A tranziens transzfekeciókat COS-1 sejteken végeztük PEI (polyethyleneimine) segítségével. A transzfekeciót követően 6 órával megkezeltük a sejteket és további 48 óra inkubációt követően végrehajtottuk a sejtek lizálását, majd luciferáz szubsztátot használva megértük a riporter gén aktivitását, amit egy másik vektoron kódolt, konstitutívan expresszálódo béta-galaktozidáz aktivitására normalizáltunk.

ELISA

Az ELISA kísérleteket a gyártó útmutatása alapján hajtottuk végre (R&D Systems). A kísérletek során három biológiai replikát használtunk, amelyekről a felülúszót ligandkezelés után begyűjtöttük, majd lecentrifugáltuk, hogy megszabaduljunk a fölösleges sejtörmeléktől. Az így kapott tiszta felülúszókat használtuk fel a kísérlet során. A plétekre nem specifikusan kötődő fehérjéket mosásokkal távolítottuk el, majd specifikus, jelölt poliklonális antitestet adtunk a lyukakhoz. Ezt követően újabb mosások segítségével távolítottuk el a nem specifikusan kötődő antitesteket, majd a szubsztátokat a lyukakhoz adva elvégeztük az enzimaktivitás mérést.

CAM (Chorioallantois membrán) vizsgálat

A megtermékenyített tyúktojásokat három napig inkubáltuk 37°C-on, mielőtt eltávolítottunk három milliliter tojásfehérjét, azzal a céllal, hogy elválasszuk a tojáshéjtól a fejlődő CAM-ot. Ezután egy lyukat vágunk a tojásra, amit celofánnal burkoltunk be. A

tojásokat ezután további 9 napig inkubáltuk, majd steril zselatin szivacsokat helyeztünk a CAM felszínére, ami 30 ezer LG268 stimulált makrofágot tartalmazott. Negatív kontrollként LG268-at használtunk, míg pozitív kontrollként rekombináns hVEGF-A-t. A tojásokra vágott réseket ezután ismét lefedtük, majd további négy napig inkubáltuk őket, amikor az angiogenezis mértékét meghatároztuk.

Statisztikai módszerek

A QPCR, ELISA és CAM mérések esetében legalább három biológiai replica esetében mértük a változásokat, majd párosított (kétmintás) Student-féle t-tesztet használtunk a szignifikáns változások meghatározására ($p < 0.05$). A 3C-seq módszer esetében párosítatlan (egymintás) Student-féle t-tesztet használtunk és minden változást szignifikánsnak tekintettünk a $p < 0.0001$ szignifikancia szint alatt.

Eredmények

A STAT6 transzkripciós faktor szabályozása alatt áll egy lizoszómális géneket tartalmazó génhálózatot makrofágokban

A STAT6 egy szignálra aktiválódó transzkripciós faktor, melynek foszforilációját, dimerizációját és magi transzlokációját az IL-4 citokin váltja ki. A magi STAT6 dimerek direkt DNS kötésen keresztül célgénjeik kifejeződését szabályozzák.

Ezen munkánk során egy *in silico* módszer segítségével prediktáltuk a STAT6 faktort, mint a regulátorát a lizoszómális géneknek. Ehhez azt a megfigyelést használtuk ki, hogy microarray adatok alapján, azok a transzkripciós faktorok, amelyek részt vesznek célgénjeik szabályozásában, expressziós szintben pozitívan korrelálnak a szabályozott gének szintjével. Az összes lizoszómális gén expressziós szintjét meghatározva és ezeket kluszterezve több transzkripciós regulátor is azonosítható volt a predikció által, azonban a legtöbb gént számláló nagyon jól korrelált a STAT6 transzkripciós faktoral. Ezeket az eredményeket először a génexpresszió szintjén validáltuk sikeresen, majd publikusan elérhető makrofágokban elvégzett STAT6 ShIP-seq adatokat felhasználva, megtaláltuk a génekhez tartozó potenciális enhanszereket is. A továbbiakban ezeket ChIP-RT-qPCR segítségével igazoltuk, mint cisz-elemeket, amelyek képesek kötni a transzkripciós faktort.

Összefoglalva, egy predikciós alapú módszernek a használatával sikerült azonosítanunk egy transzkripciós regulátort (STAT6), melynek hatását és kötőhelyeit is képesek voltunk igazolni individuális gének szintjén egér, csontvelői eredetű makrofágokban. A

következő célunk egy globális kép készítése volt az RXR receptor működési mechanizmusáról és szabályozott génjeiről.

Az RXR transzkripció hatása csontvelői eredetű makrofágokban

Annak érdekében, hogy feltárjuk a receptor genom-szintű működését, először RNS-szekvenciális kísérleteket hajtottunk végre a receptort aktiváló szintetikus, szelektív LG268 ligandum hiányában és jelenlétében. Kimutattuk, hogy a receptor aktiválása több száz gén expressziós szintjét változtatja, tehát az RXR hatás jelentős ezekben a sejtekben. Tovább szeretnénk volna pontosítani a receptor genomi hatását, ezért elhatároztuk, hogy feltérképezzük mind a legkorábban válaszadó géneket, mind a kötőhelyeket (cisz-elemeket, enhanszereket) ahonnan a receptor hat.

Az RXR aktivációja megnöveli a receptor kötést a már kialakult, PU.1 által kijelölt cisz-elem készleten és P300 kötést indukál

A receptor, a myeloid sejtekre jellemző mester transzkripció faktor PU.1 és egy ko-faktor, P300 genomi kötőhelyeinek azonosítására ChIP-seq kísérleteket használtunk a specifikus ligand jelenlétében és hiányában. Szerettük volna ezeknek a faktoroknak az együtt működését globálisan látni és az általuk kötött genomi régiók kromatin módosításának változását nyomon követni. További kísérleteket hajtottunk végre, amelyek alkalmával aktív kromatin markereket (H3K27 acetiláció, H3K4 dimetiláció, H4 acetiláció) térképeztünk.

A fent említett kísérletek segítségével hozzávetőleg 5200 RXR kötőhelyet azonosítottunk, ami egy órás ligandkezelés hatására nem mutatott jelentős változást, azonban a receptor által már elfoglalt genomi régiókon nőtt a magreceptor feldúsulása, ami az jelenti, hogy a receptor kötési erőssége megváltozott. Az azonosított kötőhelyeken (peakeken) de novo motívum analízist hajtottunk végre, amely legerősebb találatként a PU.1 transzkripció faktor, majd a különböző magreceptor kötőhelyeket azonosította az RXR peakek alatt. A receptor genomi elhelyezkedését vizsgálva kiderült, hogy majdnem 90%-ban intergenikus régiókban kötődik, így ezek célgénekhez való rendelése nem könnyű feladat. A különböző ChIP-seq adatokat kombinálva kiderült, hogy az RXR kötőhelyek több mint 65%-a átfed a sejtre jellemző PU.1 transzkripció

faktor kötőhelyeivel, amelyre a ligandnak gyakorlatilag semmilyen hatása nem volt, míg a P300 kofaktor dinamikusan kötődött az RXR enhanszerekre az aktivátor jelenlétében. Ezeken a régiókon nőtt a H4 acetiláció szintje, míg a H3K27 acetiláció és H3K4 dimetiláció szintje nem változott. Az itt bemutatott kísérletekkel meghatároztuk az RXR által kötött cisz-elemeket és azok kromatin jellegét, azonban nem tudtuk őket hatékonyan annotálni a szabályozott génekhez, mivel nagy távolságban helyezkednek el azoktól.

Az RXR enhanszerek és gének egymáshoz illesztése speciális metódusokat igényel

A következőkben szeretnénk volna az RXR által kötött, transzkripciós szabályozásban aktívan részt vevő cisz-elemeket/enhanszereket a szabályozott génekhez kötni. Azonban ehhez nem volt elegendő az eddig bemutatott metódusok integrációja, mivel az RXR kötőhelyek gyakran több száz kilobázisos távolságban is elhelyezkedhetnek a célgénekhez viszonyítva. Annak érdekében, hogy megoldjuk ezt a problémát egy újfajta módszert alkalmaztunk, ami képes arra, hogy a frissen szintetizálódó naszcens RNS-t izolálja és megszekvenálja. Ezt a módszert GRO-seq (Global Run-On sequencing) néven ismerik és segítségével az aktív enhanszerek is jól meghatározhatók, mivel azokról transzkripció történik. Az a megfigyelés miszerint az úgynevezett enhanszer RNS-ek szintje hasonló módon változik, mint a szabályozott gén szintje, megoldotta az annotációs problémánkat. A módszer segítségével azonosítottuk a transzkripciósan aktív, RXR által szabályozott enhanszereket és azokat a génekhez rendeltük. Egy általunk kifejlesztett bioinformatikai módszer segítségével 252 regulált génhez tudtunk 414 cisz-elemet rendelni, amelyeken az enhanszer transzkripció RXR aktivációtól függően változott.

A cisz-elemek közül 45 darabot karakterizáltunk riporter kísérleti rendszerekben. Több cisz-elemről képződött enhanszer RNS-t is képesek voltunk megmérni, ami érdekes módon RXR szelektív enhanszerek létezését sugallja. A predikció által kialakított gén/cisz-elem párokat 3C (Chromosome Conformation Capture) metodika segítségével validáltuk, három genomi lókuszon. Meglepetésünkre az RXR ligand jelenlétében a kromatin hurkok megerősödtek az enhanszer és a célgén promotere között. Az

enhanszerek és gének közötti interakciókat szekvenáláshoz kapcsolt 3C kísérletek segítségével is vizsgáltuk, ami teljes-genom szintre emelte az interakciók vizsgálatát és kimutatta, hogy valószínűleg RXR által szabályozott célgének és enhanszereik kolokalizálhatnak létrehozva ezzel úgynevezett transzkripciós gyárat a sejtmagban.

Az RXR aktivációja egy angiogenezis génhálózatot szabályoz makrofágokban

Felhasználva azokat a géneket és cisz-elemeket, amelyeket egymáshoz tudtunk rendelni az általunk kifejlesztett módszer segítségével, megpróbáltuk megtudni vajon milyen biológiai funkcióért lehetnek felelősek a hálózat alkotóelemei. Gén hálózatokat elemző program segítségével, érdekes megfigyelést tettünk, miszerint a szabályozott gének egy angiogenezisben szerepet játszó gén csoportot szabályoznak, melynek tagjai között található a Vegfa (Vascular endothelial growth factor), Hbegf (Heparin-binding EGF-like growth factor) és Litaf (Lipopolysaccharide-induced TNF factor). A továbbiakban ezt a lehetséges makrofág funkciót szerettük volna részletesebben megvizsgálni és *in vivo* releváns rendszerben tesztelni.

Kísérletünket főként a Vegfa gén köré terveztük, mivel a géntermék érépződést indukáló hatása jól ismert. Első körben RT-qPCR módszerrel igazoltuk, hogy a gén szintje megnövekedik a specifikus RXR aktivátor jelenlétében, míg az RXR receptor hiányos makrofágokban ezt a hatás elmarad, bizonyítva ezzel a receptor egyértelmű szerepét a gén szabályozásában. Következő lépésként, mivel a VEGF α egy szekretálódó fehérje meghatároztuk a szintjét a makrofágok felülúszójában ELISA kísérletek segítségével. Az eredmények teljes mértékben tükrözték azokat a megfigyeléseket, amelyeket az mRNS szinten tettünk, tehát fehérje szinten is megnövekedett a VEGF α szintje. Ezeket a méréseket szerettük volna megerősíteni azzal, hogy érépződést vizsgáló *in vivo* rendszerben teszteljük az RXR aktiváció által programozott makrofágokat. Annak érdekében, hogy igazoljuk a pro-angiogenikus makrofág fenotípust, Chorioallantois membrán vizsgálatokat végeztünk el LG268-al kezelt vad típusú és RXR α/β hiányos makrofágokon. Képesek voltunk kimutatni, hogy az aktivált RXR receptor a makrofágok

érképző kapacitását szignifikánsan megnövelte, amit a receptor hiányában nem tapasztaltunk, ezzel bizonyítva, hogy az RXR által szabályozott gén/cisz-elem hálózat valóban pro-angiogenikus irányba tolja el a makrofágokat.

Diszkusszió

Egy szignál specifikus transzkripciós faktor esetében a legalapvetőbb cél az, hogy meghatározzuk annak elsődleges biológiai hatását az adott sejt genomjára nézve és ez által megismerni az általa közölt biológiai funkciókat. Az itt bemutatott módszer segítségével képesek lehetünk ezeket a célokat teljesíteni. Megmutattuk, hogy a teljes genomszintű génexpressziós adatok és azok összefűzése az adott transzkripciós faktor genomi kötőhelyeivel nem jelent elegendő információt ahhoz, hogy tökéletesen azonosítsuk a génekhez tartozó regulátor elemeket. Emiatt a genomikai adatok további integrációja szükséges. Bemutattuk, hogy a GRO-seq technológia hogyan képes elősegíteni a kötőhelyek szabályozott génekhez való annotációját az RXR magreceptor példáján és miként járul hozzá az így kapott információ a gén hálózatok szintjén, újabb biológiai funkciók azonosításához. Az általunk kifejlesztett módszer segítségével képesek voltunk azonosítani a receptor kötőhelyeit, amelyekből kiválasztva a transzkripcióban aktívan részt vevő RXR enhanszereket a szabályozott génekhez tudunk rendelni. Az azonosított gén/enhanszer párok segítségével kapott gén listát új biológiai funkciók szempontjából elemeztük és sikerült ezeket az angiogenezishez kapcsolnunk. A prediktált biológiai funkciót *in vivo* angiogenezis vizsgálatok során teszteltük és igazoltuk annak jelentőségét. Az eredményeink alapján az RXR egy releváns terápiás célpont lehet bizonyos tumorok kezelésében, de hasonló módon a sérülések után kezdődő regeneratív folyamatokban.

Összességében elmondható, hogy a genomikai adatok integrációja kiemelt jelentőséggel bír a szignál specifikus transzkripciós faktorok vizsgálatában. Az itt

bemutatott módszer kombináció alkalmas lehet gyakorlatilag bármilyen, stimulusra aktiválódó transzkripciós faktor ilyen mélységű vizsgálatára.

Összefoglalás

A kísérleteink során az aktivált RXR magreceptor hatásának molekuláris mechanizmusát és funkcióját vizsgálatunk egér csontvelői eredetű makrofágokban. Kihhasználva a technológiai fejlődés adta metodikai újításokat, teljes genom szinten határoztuk meg a receptor működését új-generációs szekvenáláshoz kapcsolt módszerekkel.

A receptor által szabályozott génhálózat azonosításához RNS szekvenálást használtunk. Kromatin immunprecipitációhoz kapcsolt szekvenálással meghatároztuk az RXR genomi kötőhelyeit. Ezekből a kísérletekből kiderült, hogy a receptor hozzávetőleg 800 gént szabályoz, ami 5200 kötőhelyről valósulhat meg. A receptor kötőhelyei majdnem 90%-ban intergenikus régiókban találhatóak, sokszor több száz kilobázisos távolságra a génektől, így ezek génekhez való annotálása nem megbízható. A globális run-on technológia felhasználásával képesek voltunk a frissen keletkezett naszcens RNS mennyiségét detektálni teljes genom szinten. Irodalmi adatok igazolják, hogy ez a módszer képes a transzkripciós szabályozásban aktívan részt vevő cisz-elemek kimutatására, mivel ezekről úgynevezett enhanszer transzkriptek keletkeznek, amelyek az aktiváló stimulus hatására a célgénen történő transzkripció mértékét követik. Ezt kihasználva meghatároztuk azokat az RXR kötőhelyeket, amelyek részt vesznek a gének transzkripciós szabályozásában. A fent említett módszerek integrációjával 414 RXR által szabályozott cisz-elemet kapcsoltunk össze 252 célgénnel. Érdekes módon az RXR által szabályozott gén/cisz-elem hálózat több olyan gént is tartalmazott, amelyek az angiogenesis indukciójában játszanak jelentős szerepet, például: *Vegfa*,

*Hbegf, Lita*f. Az RXR aktivátor által programozott makrofágokat ezután chorioallantois membránon végzett angiogenezis kísérletekben teszteltük. Az eredményeink egyértelműen bebizonyították, hogy az RXR által szabályozott gén/cisz-elem hálózat egy érképződést elősegítő makrofág fenotípus kialakításáért felelős.

Az általunk kifejlesztett, teljes genomszintű módszerek kombinációján alapuló módszer alkalmas arra, hogy különböző szignálok hatására bekapcsolódó géneket és azok cisz-elemeit azonosítsuk, továbbá új biológiai funkciókat találjunk egy adott transzkripciós faktorhoz, gyakorlatilag bármilyen sejtípusban.



Iktatószám: DEENKÉTK/261/2014.
Tételszám:
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Dániel Bence
Neptun kód: FVHSAG
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Dániel, B.**, Nagy, G., Nagy, L.: The intriguing complexities of mammalian gene regulation: How to link enhancers to regulated genes. Are we there yet?
FEBS Lett. 588 (15), 2379-2391, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.041>
IF:3.341 (2013)
2. **Dániel, B.**, Nagy, G., Hah, N., Horváth, A., Czimmerer, Z., Pólska, S., Gyuris, T., Keirsse, J., Gysemans, C., Van Ginderachter, J.A., Bálint, B.L., Evans, R.M., Barta, E., Nagy, L.: The active enhancer network operated by liganded RXR supports angiogenic activity in macrophages.
Genes Dev. 28 (14), 1562-1577, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.242685.114>
IF:12.639 (2013)
3. Brignull, L.M., Czimmerer, Z., Saidi, H., **Dániel, B.**, Villela, I., Bartlett, N.W., Johnston, S.L., Meira, L.B., Nagy, L., Nohturfft, A.: Reprogramming of lysosomal gene expression by interleukin-4 and Stat6.
BMC Genomics. 14 (1), 1-20, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-14-853>
IF:4.041





További Közlemények

4. **Dániel, B.**, Bálint, B.L., S. Nagy, Z., Nagy, L.: Mapping the genomic binding sites of the activated retinoid x receptor in murine bone marrow-derived macrophages using chromatin immunoprecipitation sequencing.
Methods Mol. Biol. 1204, 15-24, 2014.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-1346-6_2
5. Brázda, P., Krieger, J., **Dániel, B.**, Jonás, D., Szekeres, T., Langowski, J., Tóth, K., Nagy, L., Vámosi, G.: Ligand binding shifts highly mobile RXR to chromatin-bound state in a coactivator-dependent manner as revealed by single cell imaging.
Mol. Cell. Biol. "accepted by publisher" (2014)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01097-13>
IF:5.036 (2013)
6. Nagy, G., **Dániel, B.**, Jonás, D., Nagy, L., Barta, E.: A novel method to predict regulatory regions based on histone mark landscapes in macrophages.
Immunobiology. 218 (11), 1416-1427, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2013.07.006>
IF:3.18

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 28,237

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 20,021

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, 2014.09.11.

