

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Az embrionális őssejtek retinsav indukált transzkripció és epigenetikai programja

Simándi Zoltán

Témavezető: Prof. Dr. Nagy László



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2014

Az embrionális őssejtek retinsav indukált transzkripció és epigenetikai programja

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

Írta: Simándi Zoltán
okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia doktori iskolája keretében

Témavezető: Prof. Dr. Nagy László, akadémikus

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 időpontja:

DE ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet
2014. november 10.

Az értekezés bírálói:

Dr. Apáti Ágota, PhD
Dr. Shaun M. Cowley, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Boros Imre, az MTA doktora
Dr. Nagy Péter, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja:

DE ÁOK, Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme
2015. január 12. 13:00 óra

BEVEZETÉS

A génexpressziós szabályozás szintjei

Az emberi genom körülbelül 25.000 fehérje kódoló gént tartalmaz. Ezek közül számos gén, mint például az úgynevezett háztartási gének, szinte minden sejt számára nélkülözhetetlenek a szervezetben, azonban a legtöbb a gén szövet-specifikus kifejeződést mutat. A szövet-specifikus gének expressziója több szinten szabályozott. A transzkripció szabályozása eukariótákban elsősorban a kromatin szerkezet és a transzkripciós faktorok és ko-regulátorok kölcsönhatásának az eredménye.

A kromatin alapvető szerkezeti egysége a nukleoszóma, amelyet az oktamer hisztonok és azok köré tekeredő DNS alkot. A hisztonok módosításai, mint az acetiláció, foszforiláció, metiláció és ubikvitináció, fontos mechanizmusa a génszabályozásnak. A hisztonok számos helyen ugyanabban az időben módosíthatók. Számos hiszton módosításban szerepet játszó enzimet ismerünk. A hiszton acetiltransferázok (HAT), mint például a CBP / P300, olyan enzimek, amelyek acetilálják a hiszton fehérjék oldalláncán a lizin aminosavat és ezáltal elősegítik a kromatin-szerkezet fellazulását és a génexpressziót. Az acetiláció eltávolítását, a deacetilálást hiszton deacetilázok (HDAC) végzik, és ezek elsősorban az adott genomi régió represszióját idézik elő. Hisztonok lizin vagy arginin metiltransferázok általi metilációja is ismert, amely esetén a metil-csoport a metil-donor S-adenozil metioninról (SAM) származik.

Az arginin metiláció és a kromatin átrendeződése

A Protein arginin metiltransferázok (PRMT) családjába tartozó enzimek hiszton és nem hiszton fehérjék arginin metilációját katalizálják. Eddig a család tizenegy tagját azonosították emlősökben (PRMT1-11). A PRMT3 kivételével minden PRMT rendelkezik metiltransferáz aktivitással és képesek hiszton-szubsztrátok metilációjára. Az enzim aktivitás alapján az enzimek három csoportba sorolhatóak. Az I. típusú enzimek (PRMT1, 2, 3, 4, 6 és

8) aszimmetrikus dimetilarginin (ADMA) képződését katalizálják, míg a II. típusú (PRMT5) enzim szimmetrikus dimetilarginin (SDMA) képződéséhez vezet. Mind az I. és II. típusú enzimek képesek a köztes terméknek számító monometilarginin (MMA) létrehozására. A III. típusú enzim (PRMT7) csak MMA-t generál.

Fontos megjegyezni, hogy az arginin metiltranszferázok specificitása nem korlátozódik a hiszton fehérjékre és a család tagjai a szubsztrát specificitás széles spektrumát mutatják. Többek között ismert bizonyos ko-regulátorok arginin metilációja, ami szerepet játszik azok génexpresszió-szabályozó funkciójában. A CBP ko-aktivátor CARM1 általi metilációja jól ismert a GRIP1-függő transzkripció aktiváció és hormon indukált gén aktiválás során. Izolált hisztonokon végzett tanulmányok kimutatták azt is, hogy a H4 PRMT1 általi metilációja elősegíti annak P300 általi acetilációját.

Retinsav-jelátvitel és a retinsav receptor

A ligand általi közvetlen transzkripció szabályozás egyik legjobban karakterizált példája a retinsav jelátviteli útvonal. Az A-vitamin biológiai hatásokat kiváltó aktív formája két lépésben jön létre. Az első lépésben az alkohol-dehidrogenázok (ADH) és retinol dehidrogenázok (RDH) katalizálják a retinol oxidációját retinaldehiddé (retinal). A második lépés magában foglalja a retinaldehid oxidációját retinsavvá retinaldehid dehidrogenázok (Aldh1a1, Aldh1a2 és Aldh1a3) által. A retinsavat (RA) nem minden sejt képes szintetizálni a testben, azonban az aktív szintézisre nem képes sejtek is hozzáférhetnek a retinsavhoz a környezetükből. A retinsav intracelluláris szintjét részben annak metabolizmusa szabályozza. A citokróm P450 alcsalád enzimei (Cyp26a1, b1 és c1) katalizálják azokat a reakciókat, amelyek során az RA átalakul, elsősorban 4-hidroxi-retinsavvá. A citoplazmában a retinsav intracelluláris retinsav kötő fehérje 2-t (Crabp2) köt és annak segítségével szállítódik a sejtmagba.

A sejtmagban a retinsav az RAR:RXR (retinsav receptor : retinoid x receptor) heterodimer aktiválásán keresztül hat. A RAR (RAR α RAR β és RAR γ) és RXR (RXR α , RXR β és RXR γ) a magreceptorok közé tartozó fehérjék, amelyek egymással heterodimert alkotva megkötik a DNS-t és közvetlenül szabályozzák a transzkripciót. A RAR és RXR a magreceptorokra jellemző konzervált fehérje szerkezetet mutatják, rendelkeznek DNS-kötő doménnel (DBD) és ligand-kötő doménnel (LBD). A RAR köti a retinsavat, míg a heterodimer RXR partner 9-cisz-retinsavat köt. A ligand-kötött RAR:RXR heterodimerként kötődik a szabályozott gén közelében található specifikus szabályozó elemekhez a DNS-en, az úgynevezett RA válaszadó elemhez (RARE). *In vitro* kötési és transzaktivációs vizsgálatok kimutatták, hogy a RAR:RXR elsősorban ún. direkt repeat (DR) szekvenciákhoz kötődik, amelyet 2, egymástól 5 vagy 2 nukleotiddal (DR5 és DR2) elválasztott hexamer motívum ((A / G) G (G / T) TCA) alkot.

A retinsav receptorok epigenetikai szabályozása

A jelenleg elfogadott modell szerint az RAR:RXR heterodimer ligand hiányában a sejtmagban található, ahol kötődik a célgének válaszadó elemeihez és ko-represszor komplexet vonz oda, amely többek között hiszton-deacetiláz aktivitással rendelkező fehérjét (pl. HDAC3) tartalmaz. A ligandkötés egy alloszterikus változást vált ki, ami végeredményben a ko-represszorok ko-aktivátorokra (pl. NCoA, CBP / P300, stb) történő lecserélődését idézi elő.

Retinsav szerepe a sejtek differenciálódásában és a neurogenesisben

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az embrionális fejlődés során az RA morfogénként működik, koncentráció gradienst létrehozva az embrió anterio-posterior (A-P) tengelye mentén. A retinsav embriogenezis során játszott lehetséges funkcióit először A-vitamin hiányos egerek tanulmányozása során írták le. Ezek a vizsgálatok a számos elváltozás mellett

arra is utaltak, hogy a retinsav alapvető szerepet játszik az idegrendszer fejlődése során. A retinsav receptorok általános kifejeződése az agyban valószínűsíti, hogy a retinoid jelátvitel alapvetően szükséges a neurogenéziséhez és a megfelelő agyműködéshez. A retinoid jelátviteli útvonal szerepet játszik a fejlődő velőcsőben lejátszódó neurális differenciálás kezdeti szakaszáért, szabályozza gerincvelői motoros neuronok differenciálódását, és meghatározza a hátsóagyat fejlődését. Kísérleti eredmények arra utalnak, hogy mindezen folyamatokban fontos szerepet tölt be a RA-függő Hox gének indukciója. Ezzel szemben a retinsav aktivitás bizonyos idegrendszeri funkciók, mint például a korai előagy kialakulása, nem lényeges.

Annak ellenére, hogy a rendelkezésre álló genetikai *in vivo* modellek értékes információkkal szolgáltattak a retinsav útvonal embriogenezisben betöltött szerepének megismerését illetően, a mechanisztikus részletek és molekuláris események leírásában csak limitált információval szolgáltattak. Sejtes modell rendszerek, mint például az embrionális őssejtek alkalmazása, segíthetnek jobban megérteni hogyan képes a retinsav koordinálni a sejt sorsát a differenciáció során.

Az embrionális őssejtek, mint a sejt differenciálódás modell rendszerei

A felfedezésük óta az embrionális őssejtek az embriogenezis és a sejt differenciálódási vizsgálatok egyik legfontosabb modell rendszereivé váltak. Az embrionális őssejtek pluripotens sejtek, amelyeket a blasztociszták ún. belső sejtjelmegéből izolálnak az embrionális fejlődés 3-4. napján. Az őssejtek megtartják azon képességüket, hogy a szervezet szinte minden sejt típusává képesek differenciálódni megfelelő körülmények között. Az őssejtek aggregálásával létrejövő ún. embrionális testek (EB) sokkal inkább utánozzák a normális embrionális fejlődés korai állapotát, mint azt korábban gondolták, így értékes *in vitro* modellként szolgálnak az embriogenezis folyamatának megértésében.

A neurogenézis modellezésében különösen közkedvelt modellsejtek az őssejtek, és alkalmazásuk jelentős előrelépéssel kecsegtet neurológiai és a központi idegrendszer (CNS)

sérüléseinek kezelésében. Több kísérletes példa megerősítette, hogy az *in vivo* történések reprodukálásával *in vitro* hatékonyan irányítható az embrionális őssejtek differenciálása bizonyos neurális sejttypusok irányába. Számos jelátviteli út, amelyet a retinsav, FGF, Wnt és DKK kapcsol be, nélkülözhetetlen szerepet játszik a gerinces embrionális központi idegrendszer kialakulásában.

CÉLKITŰZÉS

A tanulmányaim középpontjában az egér embrionális őssejtek retinsav indukált differenciálódási folyamatának transzkriptomikai és epigenetikai karakterizálása állt.

Az általános célkitűzés az volt, hogy megértsük a következő jelenségeket a transzkripció szabályozásban:

1. gén szelektív transzkripció szabályozás
2. jel érzékenység finomhangolása
3. az adott differenciációs jel sejtípus-specifikus értelmezése
4. a jel félreértelmezésének funkcionális következményei

Szűkebb értelemben célul tűztük ki, hogy:

1. Meghatározzuk a retinsav útvonal komponenseinek kifejeződését differenciálatlan embrionális őssejtekben
2. Karakterizáljuk a retinsav indukált gének epigenetikai szabályozását
3. Igazoljuk a P300 és PRMT1 közötti lehetséges szabályozó kapcsolatot
4. Jellemezzük a PRMT1-függő transzkripció sejt differenciálódási eseményeket
5. Beállítsunk egér embrionális őssejtek neuronokká történő differenciálásának egy többlépcsős modelljét, ami alkalmas felfedezni új ko-regulátorok, mint a PRMT1 és PRMT8, neurogenesisben betöltött mechanisztikus és funkcionális szerepét.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Embrionális őssejt kultúra

Az embrionális őssejteket mitotikusan inaktivált egér primer embrionális fibroblasztokon (PMEF) vagy SNL tápláló sejteken növesztettük. A sejttenyészeteket 5% CO₂ mellett 37°C hőmérsékleten tartottuk fenn. Az őssejteket 15% FBS-sel (Hyclone) kiegészített DMEM Glutamax médiumban tartottuk, 1000U leukémia gátló faktor (LIF), penicillin / sztreptomycin, nem esszenciális aminosav és 2-merkapto-etanol jelenlétében.

Őssejt kultúrák neurális differenciálódása

Az őssejteket a differenciálást megelőzően tápláló sejt-mentes állapotban tenyésztettük 0,1% zselatinnal bevont tenyésztő edényekben. Az embrioid test kialakulását úgy idéztük elő, hogy 4*10⁶ sejtet raktunk ki bakteriológiai Greiner Petri-csészékre 15 ml differenciációs médiumban (10% FBS). A differenciáció 5. napjától a 8.napig a mediumot retinsavval egészítettük ki 5 µmol végkoncentrációban. A 8. nap az EB-kből 0,05% tripszin segítségével egy sejtes szuszpenziót készítettünk, és a sejteket 2*10⁵ sejt per cm² sűrűségben, N2 tápfolyadékban (DMEM, F-12, L-glutamin, inzulin, transferrin, szelenit, putreszcin, progeszteron, BSA) előzetesen poli-L-ornithin-laminin kezeléssel előkészített sejttenyésztő edényekbe raktuk ki.

shRNS-alapú stabil géncsendesítés

A PRMT1 és PRMT8 gén csendesítéshez shRNS lentivirális plazmidot (MISSION shRNS, TRCN0000018490-493 és TRCN 0000097479-483) használtunk (Sigma). A lentivírusokat az shRNS lentivirális plazmidok és helper plazmidok (pMD2.G, pRSV-Rev, pMDLg / pRRE) 293T sejtekbe történő transziens transzfekciójával állítottuk elő. A vírus-transzdukált sejteket puromicin szelekció alatt tartottuk. Kontrollként nem szekvencia-specifikus shRNS-t használtunk.

Plazmid és tranziens transzfekció

A teljes hosszúságú vad típusú humán PRMT1 Henry MF-től származik. Az Nhf-290-Hoxb1-luciferáz és 2xDR2-luciferáz plazmidokat T Ogura és RM Evans bocsátotta rendelkezésünkre. A Hoxb1, Cyp26a1, Pmp22, Spsb1 vagy PRMT8 luciferáz riporter assay-eket az adott gén enhancer régióinak PCR amplifikációját követő klónozással állítottuk elő. A teljes hosszúságú humán PRMT8 szekvenciát a korábban létrehozott GFP-PRMT8 (M. Bedford) plazmidból PCR-ral amplifikáltuk fel, és klónoztuk EcoRI / Sall hasító helyek segítségével pCMV-Tag2 (Stratagene) expressziós vektorba. Az összes konstruktot DNS-szekvenálással validáltuk. A transzfekciót FuGENE transzfekciós reagens (Promega) segítségével végeztük, a gyártó útmutatásai szerint. A luciferáz aktivitást Luciferase Assay System (Promega) alkalmazásával detektáltuk, és a normalizálás a β -galaktozidáz aktivitás azonos mintákból történő meghatározásával történt.

Real-time kvantitatív PCR (RT-qPCR)

Totál RNS-t TRIZOL reagenssel (Invitrogen) izoláltunk. A cDNS szintézist High capacity cDNS Reverse transcription kit (Applied Biosystems) alkalmazásával végeztük, a gyártó ajánlása szerint. A kvantitatív PCR real time PCR (ABI PRISM 7900, Applied Biosystems) készüléken történt. A relatív génexpresszió mértékét az összehasonlító C_T módszer és GAPDH-ra történő normalizálást követően határoztuk meg.

Microarray

A microarray kísérletek kivitelezését az UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Kft végezte GeneChip Mouse Gene 1.0 ST típusú array-ek alkalmazásával. Az adat analízise GeneSpring GX 12.6 szoftver (Agilent, Santa Clara, CA) alkalmazásával történt. Elsőként az Affymetrix adatfájlokat importáltuk a GeneSpring szoftverbe RMA16 algoritmus alkalmazása mellett. A normalizálás a kontroll minták medián értékeire történt. A változó gének

meghatározása páratlan t-teszt, aszimptotikus p-érték számítása és Benjamini- Hochberg-féle korrekció alkalmazásával történt. Az adatok további elemzéséhez IPA (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com) on-line szoftvert használtunk fel.

RNS-szekvenálás

Az RNS-szekvenálás Illumina készüléken történt (Centre National de Genotypage (CNG) Párizs, Franciaország). Az RNS-Seq könyvtárakat minden esetben legalább két biológiai ismétlésben állítunk elő TruSeq RNA-sample Preparation Kit használatával (Illumina), a gyártó útmutatásait követve. Az RNS-seq adatok elemzését Horváth Attila végezte (Klinikai Genomikai és Személyre Szabott Orvoslási Központ, Debreceni Egyetem).

Western-blot analízis

20 µg teljes sejt fehérje extraktum futtatása történt SDS-gélelektroforézissel 10 vagy 12,5% -os poliakrilamid gélen, majd a mintákat Immobilon-P transzfer membránra (Millipore Crp., Billerica, Massachusetts) transzferáltuk. A fehérjéket anti-PRMT1 (07-404, Millipore), anti-PRMT8 (ab73686, Abcam), anti-ASYM24 (07-414, Millipore), anti-SYM11 (07-413, Millipore), anti-OCT3 / 4 (sc5279; santa Cruz), anti-aktin (A2066, Sigma), anti-GAPDH (sc32233; santa Cruz) antitestek felhasználásával vizsgáltuk, a gyártó ajánlásai szerint.

Őssejt és differenciálódási markerek kimutatása immunfluoreszcencia segítségével

A sejteket 4% -os paraformaldehid hozzáadásával fixáltuk, majd 1 órán át inkubáltuk blokkoló pufferben (PBS, 10% FBS-t, és 0,1% Triton X-100). A primer antitesteket megfelelő hígításban adtuk hozzá a sejtekhez és a mintákat egy éjszakán át 4°C-on tartottuk. Három 1xPBS-sel történő mosást követően FITC konjugált másodlagos antitesteket adtunk a sejtekhez 1: 200 hígításban és szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáltuk. A sejteket háromszor mostuk PBS-ben, és a specifikus festődést Axiovision inverz fluoreszcens mikroszkóp

segítségével vizsgáltuk. A vizsgálatainkhoz felhasznált elsődleges antitestek a következő forrásokból származtak: anti-OCT3 / 4 (SC-5279; Santa Cruz), anti-SSEA (MC-480; DSHB), anti-TUJ1 (MMS-435P; Covance), anti-PRMT1 (07 -404, Millipore), anti-PRMT8 (HPA039747, Sigma), anti-H4R3me2a (Active Motif, Cat.no 39705), anti-SYN1 (Millipore, AB1543P és BD Biosciences Cat.no 611393).

Kromatin immunprecipitáció

Az embrionális őssejteket retinsav jelenlétében vagy hiányában tenyésztettük, majd a sejteket két lépésben keresztkötöttük diszuccinimidil glutarát (DSG) (ProteoChem) és 1% metanolmentes ultratiszta formaldehid (Thermo Scientific, # 28908) hozzáadásával. A szonikálás Diagenode Bioraptor ultrahang szonikátorral történt és a kromatint a következő antitestekkel immunprecipitáltuk: IgG (Millipore, 12-370), RXR (Santa Cruz, sc-774), RAR (Santa Cruz, sc-773), P300 (Santa Cruz, SC- 585), HDAC3 (santa Cruz, sc-11417), Oct3 / 4 (santa Cruz, sc-8628), H3K27ac (Abcam, ab4729) és H4R3me2a (Active Motif, Cat.no 39.705). A minták szekvenálásához a könyvtárak Klinikai Genomikai és Személyre Szabott Orvoslási Központ, Debreceni Egyetem épületében történtek. A ChIP-seq könyvtárak az Ovation Ultralow Library Systems (Nugene) vagy TruSeq ChIP Sample Preparation Kit alkalmazásával, a gyártó utasításai szerint készültek. A ChIP-seq adatok elsődleges elemzését a Klinikai Genomikai és Személyre Szabott Orvoslási Központ, Debreceni Egyetem munkatársai, Czipa Erik, Nagy Gergely és Barta Endre végezték. Az adatok böngészéséhez és vizualizálásához az Integratív Genomics Viewer (IGV2.3, Broad Institute) használtuk. A minták vagy kondíciók között átfedő csúcokat VennMaster program segítségével jelenítettük meg. Meta-hisztogram készítését és motívum feldúsulás vizsgálatát a Homer programcsomag segítségével végeztük.

Kalcium imaging, loose-patch, és teljes sejt patch-clamp

Az őssejtől differenciáltatott neuronokat kalcium indikátor festékkel töltöttük fel a méréseket megelőzően. A kalcium képkalkotó méréseket az Élettani Intézet (Debreceni Egyetem) munkatársai végezték el, Zeiss Axioskop mikroszkóppal. A neuronális akciós potenciál tüzelések extracelluláris loose-patch mérései során mesterséges cerebrospinális folyadékkal feltöltött mikropipettákat használtunk. A sejtek voltage-clamp módban történő elektromos aktivitásának rögzítéséhez Axopatch 200A erősítőt alkalmaztunk. Az adatrögzítés 10-kHz mintavételi frekvencia mellett történt. A teljes sejt patch clamp (whole cell patch clamp) Narishige vertical puller segítségével, 5 MOhm rezisztencia alkalmazásával húzott patch pipetták felhasználásával történt. Teljes-sejt patch-clamp aktivitásának rögzítéséhez Axopatch 200A erősítőt alkalmaztunk, 10-kHz mintavételi frekvencia mellett.

Szövetminták

A glioblastomás és a normális agyszövetek gyűjtése az idegsebészeti műtétek során az Idegsebészeti Klinikán (Debreceni Egyetem) történt. Minden minta külön betegből származott. A normál mintákat epilepszia kezelése során bekövetkező vagy egyéb, nem tumoros agyszövetek műtétei során gyűjtötték az Országos Etikai Bizottság és minden beteg írásos engedélyével.

Statisztikai analízis

Az RT-qPCR és a ChIP-qPCR méréseket minden esetben három biológiai párhuzamoson végeztük el. Az értékek mint átlag \pm SD vannak feltüntetve. GraphPad Prism (verzió: 5.02) programot használtunk az adatok megjelenítéséhez és statisztikai kiértékeléséhez (páratlan t-teszt). Az eredményeket $p < 0.05$ érték mellett tekintettük szignifikánsnak

EREDMÉNYEK

A retinsav jelátviteli út elemeinek kifejeződése differenciálatlan őssejtekben

Munkánk első lépéseként azonosítottuk, hogy a retinoid jelátviteli út mely elemei vannak jelen a differenciálatlan embrionális őssejtekben. A globális génexpressziós elemzések azt mutatták, hogy csak a celluláris retinsav kötő fehérje 1 (Crabp1), a retinsav receptor gamma izoformája (Rarg) és a retinoid-X-receptor alfa és béta izoformák (Rrx α , Rrx β) fejeződnek ki magasabb szinten differenciálatlan őssejtekben. A retinol kötő fehérje (RBPs), alkohol dehidrogenáz (ADH) és Cyp26 enzimek csak nagyon alacsony mRNS szinten voltak jelen. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a differenciálatlan őssejtek-képtelenek endogén retinsav termelésre.

Retinsav indukált gének azonosítása

A retinsav által embrionális őssejtekben szabályozott gének azonosítása céljából RNS-Seq kísérleteket végeztünk. Rövid távú retinsav kezelést követően csak 35 gén (pl. Cyp26a1, Dhhr3, Dleu7, Hoxa1, Hoxb1, Rar β , Stra6 vagy Stra8) volt kimutatható, mint statisztikailag szignifikánsan szabályozott gén.

Retinsav függ epigenetikai változások

A következő lépésben a jól jellemzett Cyp26a1 és Hoxa1 gének retinsav válaszadó elemén retinsav hatására lezajló epigenetikai változásokat karakterizáltuk. Kromatin immunprecipitáció segítségével meghatároztuk a RAR és RXR receptorok kötésének dinamikáját, illetve a ko-represszor HDAC3 és ko-aktivátor P300 leválását és kötődését a fentebb említett két gén enhancerén. Míg az RAR és RXR mindkét esetben detektálható volt a retinsav kezelést követően, a P300 vagy HDAC3 kötődését nem tudtuk kimutatni egyetlen vizsgált időpontban sem a Cyp26a1 enhancer esetén, ami arra utalt, hogy létezik egy

enhanszer-specifikus epigenetikus szabályozás a retinsav indukált transzkripció események esetén.

A P300 retinsav-függő kötődésének genom szintű jellemzése embrionális őssejtekben

A P300 retinsav-függő kötődésének vizsgálatát elvégeztük genom szinten is ChIP-seq segítségével. Összesen 3420 konszenzus P300 kötőhelyet tudtunk azonosítani differenciálatlan embrionális őssejtekben. A P300 által kötött DNS szakaszok motívum elemzése kimutatta, hogy a P300 főleg olyan genom régiókban kötődött, amelyek az őssejt specifikus transzkripció faktorok (Oct3 / 4, Sox2, Klf4, Esrrb és Nanog) motívumait tartalmazzák. Érdekes módon a retinsav kezelés hatására a kötőhelyek számának ~ 3-szoros csökkenését mértük. A P300 ChIP-seq adatok megerősítették a szelektív retinsav-függő P300 kötődését a Hoxa1 vs. Cyp26a1 enhancerek esetén, illetve az RNS-szekvenálással meghatározott célgének további példákkal szolgáltak a két csoportra. Ennek megfelelően a géneket P300-független (pl. Cyp26a1, Dleu7, Stra8) vagy P300-függő (pl. Hoxa1, Hoxb1, Pmp22) csoportokba soroltuk.

Más csoportok által közölt Oct3 / 4, Nanog és Sox2 ChIP-Seq adatok megerősítették, hogy a P300-kötő enhanszerek legalább az egyik őssejt-specifikus transzkripció faktor kötését is mutatják. Ezek a helyek őssejt-specifikus szabályozó "hot spot"-oknak tekinthetők.

A PRMT1 a "hot spot"-ok szelektív ko-represszora

Korábbi irodalmi eredmények alapján felmerült, hogy a protein arginin metiltransferázok családjába tartozó PRMT1 és a P300 között funkcionális kapcsolat állhat fenn. RNS-szekvenálásból származó génexpressziós adatok alátámasztották a PRMT1 magas szintű expresszióját embrionális őssejtekben, arra utalva, hogy a PRMT1 meghatározó szerepet játszhat a differenciálatlan őssejtek aszimmetrikus arginin metilációjában. Ahhoz, hogy

vizsgáljuk a PRMT1 szerepét a P300 által közvetített transzkripció és epigenetikai folyamatokban, létrehoztunk stabil PRMT1 géncsendesített sejteket.

A kontrol és PRMT1 hiányos embrionális őssejtekből spontán differenciációval létrehozott embrioid testek retinsavval való kezelését követő genom-szintű génexpressziós eredmények összehasonlítása során kiderült, hogy a PRMT1-hiányos sejtek egy megváltozott retinsav választ mutatnak. Míg a legtöbb ismert retinoid célgén, mint például a Cyp26a1, Dhars3, Dleu7, Rbp1 és Stra8 hasonlóan indukálódott mind a kontrol és PRMT1 géncsendesített sejtek esetén, a Hoxa1, Hoxb1, Stra6, Pmp22 és Spsb1 géneknél magasabb indukció volt detektálható a PRMT1-hiányos sejtekben. A PRMT1 hiányában detektált szelektív hatás és a P300 esetén tapasztalt szelektív kötődés figyelemre méltó átfedést mutatott, tovább erősítve azt az elképzelést, hogy a PRMT1 és P300 között funkcionális kapcsolat létezik számos retinsav indukált gén szabályozása esetén.

PRMT1hiányos embrionális őssejtek differenciálási képességének vizsgálata

Az embrionális őssejtek differenciálódási képessége vizsgálható azok spontán differenciáltatásával, ami az embrioid testek létrehozásával indukálható. A spontán differenciálódás mintegy 1000 gén esetén okozott jelentős génexpressziós változásokat vad-típusú őssejtekből kiindulva. Genom szintű összehasonlító vizsgálataink és RT-qPCR alapú validálások kimutatták, hogy a klasszikus endoderma, mezoderma és ectoderma csíralemez markerek hasonlóképpen indukálódtak a spontán differenciálódás során kontrol és PRMT1-hiányos őssejtekből. PRMT1 ^{-/-} őssejtek injekciója immunhiányos egerekben teratoma kialakulását eredményezte, mindhárom magzati réteg nyilvánvaló jelenlétével, ami további bizonyítékul szolgált, hogy ezek a sejtek képesek differenciálódni, akár a PRMT1 gén teljes hiányában is.

Az aszimmetrikus arginin metiláció a retinsav által kiváltott idegi differenciálódás különböző szakaszaiban

Eddigi eredményeink arra utalnak, hogy a PRMT1 érintett többek között a Hoxa1 és Hoxb1 gének retinsavra adott válaszában meghatározásában. Ezek a gének elengedhetetlenek a megfelelő idegi differenciálódás során, így felmerült a kérdés, szerepet játszik-e a PRMT1 az idegsejt-differenciációban. Ennek vizsgálatához beállítottuk az idegsejt differenciálódás egy embrionális őssejt-alapú modell rendszerét, ami négy fő szakaszból áll: (I) a differenciálatlan embrionális őssejtek, (II) spontán differenciálódó sejtaggregátumok (III) a retinsav kezelés eredményeként idegsejt progenitorok irányába elkötelezett sejtek (IV) a teljesen differenciálódott neuronális sejtek. Az így kapott véglegesen differenciálódott neuronok elektrofiziológiai tulajdonságai hasonlóak az agyi eredetű neuronokéhoz.

Méréseink igazolták, hogy az embrionális őssejt állapotban számos fehérje tartalmazott aszimmetrikus és szimmetrikus dimetilált arginincsoport. A differenciáció során a fehérjék aszimmetrikus arginin metilációs szintje dinamikusan változott, míg a szimmetrikus arginin metilációs jel esetén szignifikáns változás nem volt tapasztalható.

A PRMT gének kifejeződése a neurális differenciálódás különböző szakaszaiban

Az embrionális őssejtekben dominánsan kifejeződő PRMT1 szintje a neuronális differenciálódás során állandó maradt, egy enyhe növekedést mutatva a RA-kezelést követően. A PRMT2, PRMT6 és PRMT8 szignifikánsan megemelkedett kifejeződését tapasztaltuk differenciált idegsejtek esetén. Összhangban a fehérje szinten észlelt változatlan SDMA szinttel, a II. típusú PRMT5 expressziója jelentősen nem változott.

A PRMT8 egy retinsav indukálta célgén

A PRMT gének rövid távú RA-indukciót követő génexpresszióját összehasonlítva, a PRMT8 korai kifejeződését figyeltük meg. A PRMT8 kifejezése indukálható volt RAR specifikus

ligand AM580 által, de nem mutatott emelkedett génexpressziót az RXR specifikus LG268 kezelést követően. Bioinformatikai analízis kimutatta, hogy a PRMT8 promoterében (a TSS-hez képest -1.400 - -1.450bp) egy RAR:RXR kötésére képes DR0 szekvencia (AGGTCAAGGTCA, DR0) található. Az adott válaszadó elemet tartalmazó ~ 300 bp méretű genomi régió luciferáz assay-be történő klónozásával sikerült az elem RAR:RXR kötésének funkcionális megerősítése.

A PRMT8 a retinsav jelátviteli út ko-aktivátora

A PRMT1 és PRMT8 nagyfokú szekvencia hasonlósága alapján felmerült, hogy a PRMT8 is szerepet játszhat bizonyos gének esetén a retinsav válasz szabályozásában. A Hoxb1 válaszadó elemet tartalmazó luciferáz vektor transzfekciójával kimutattuk, hogy a PRMT8 növeli a retinsav-választ. A PRMT8 hiánya a retinsav által kiváltott jel intenzitásának csökkenését eredményezte, amelyet a PRMT8 túlexpresszáásával sikerült visszaállítani.

A PRMT1 és PRMT8 szabályozza az idegsejtekben kifejeződött gének expressziójának szintjét

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a PRMT1 és / vagy PRMT8 hiánya milyen következményekkel jár a retinsav indukált neuronális differenciálódás során. A differenciálódás 12. napján a PRMT1 és PRMT8-hiányos neurális sejtek normális morfológiát és a tipikus neurális markerek (mint például a Lhx1, Pax6 vagy Tuj1) magas expresszióját mutatták, hasonlóan a vad-típusú sejtek. A 16. napon végzett genom szintű expressziós analízis azonban számos gén (947) diszregulációját mutatta a PRMT1 vagy PRMT8 depletált neuronokban. A PRMT1 vagy PRMT8 hiánya elsősorban a gének alacsonyabb expresszióját eredményezte.

A PRMT1 és PRMT8 egy fehérje komplexben vannak jelen és szabályozzák neurológiai betegségekkel összefüggésbe hozott gének kifejeződését

A géncsendesített sejtekben különbözően expresszált gének csoportosítása során azt találtuk, hogy a gének nagy része (947 közül 473) hasonló kifejeződési zavart mutatott mindkét sejttypusban. Fehérje ko-immunprecipitációs kísérletek megerősítették, hogy a két fehérje valószínűleg egy komplexben van jelen. A 473 gén bioinformatikai elemzése arra utalt, hogy a PRMT1 és PRMT8 szerepet játszhat a neuronális szinaptikus kapcsolatok kialakulásában, illetve a glutamát receptor működésében.

A PRMT8 hiánya PRMT1-független transzkripció változásokat is eredményez

A génexpressziós adatok elemzése kimutatta, hogy több gén, mint például a Cxcr4, Dhfr vagy Efemp1, korábban gliális differenciálódással és gliomagenesisel összefüggésbe hozott gének csak PRMT8 géncsendesített sejtekben mutatnak eltérő expressziót. A PRMT1-PRMT8 dupla géncsendesített sejtek vizsgálata igazolta, hogy ezek a gének valóban PRMT8-függő módon, de PRMT1 által nem befolyásolva szabályozottak.

A PRMT8 kifejeződés hiánya a glioblastoma multiforme markere

Nagy számú humán primer glioma mintán igazoltuk a Cxcr4 és Efemp1 diszregulációját. Ezen gének PRMT8-függő szabályozása miatt felmerült a PRMT8 szintjének összehasonlítása is. A RT-qPCR mérések kimutatták, hogy a PRMT8 lényegesen alacsonyabb expressziós szintet mutat GBM mintákban a kontrol mintákhoz képest. A PRMT1 nem mutatott különbséget a csoportok között. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a PRMT8 a GBM markerének tekinthető és potenciálisan a hiány hozzájárulhat a betegség kialakulásához.

MEGBESZÉLÉS

Retinsav útvonal az embrionális őssejtekben

Mára köztudott, hogy a retinoidok és a retinoid jelátviteli út alapvető szerepet játszik az embrionális őssejtek differenciálódásában. A retinoidokat széles körben használják, mint differenciációt indukáló ágenseket, ugyanakkor a ligand hatására bekövetkező transzkriptomikai és epigenetikai események még nem jellemzettek részleteiben.

Eredményeink arra utalnak, hogy a retinsav receptorok jelen vannak a differenciálatlan őssejtekben, de a retinsav szintézisében résztvevő enzimek (pl. Aldh1a1-a3) hiányoznak. Genom szintű génexpressziós analízissel azonosítottuk a retinsav indukálta korai célgéneket. A szabályozott gének kis száma a korai indukció során némileg meglepő. Azonban számos fontos transzkripciós faktor szerepel a listán. Ennek legvalószínűbb magyarázata, hogy a retinsav az első hullámban ún. mester szabályozókat kapcsol be (mint például a Hox-klaszter tagjai), és az ezen transzkripciós faktorok által második hullámban szabályozott gének lesznek felelősek a későbbi drámai morfológiai és génexpressziós változásokért.

A retinsav indukált génexpressziót kísérő epigenetikai események

A retinsav receptorok és ko-regulátorok retinsav kezelés hatására bekövetkező kötődésének vizsgálata felvetette a jelenleg elfogadott modell bizonyos mértékű korrekciójának szükségességét. Azt találtuk ugyanis, hogy a RAR:RXR kötés sokkal inkább indukálható, mint statikus. Azt is megfigyeltük, hogy a P300, amit eddig a RAR:RXR általános ko-aktivátoraként tartottak számon, gén-szelektív kötődést mutat. Ezt a fajta szelektivitást valószínűleg a sejt-specifikus transzkripciós faktorok biztosítják. Ebben az esetben ez egy újabb példa arra, hogyan biztosítható bizonyos gének sejttípus-specifikus kifejeződése.

A P300 és PRMT1 a retinsav közvetített jelátviteli út szelektív szabályozói

A vizsgálataink során azonosítottak a PRMT1-et, mint P300-függő retinsav érzékenység egy új lehetséges szabályozóját. Korábbi kutatások már leírták a PRMT1 másodlagos ko-aktivátor szerepét különböző magreceptorok által szabályozott gének esetén. A PRMT1 ezekben az esetekben primer ko-aktivátorok aktivációs doménjéhez (AD2) kötődik és fokozza ezáltal a transzkripciót. Ezzel szemben, az újabb eredmények különböző biológiai kontextusban felvetették a PRMT1 ko-represszor funkcióját is, hasonlóan az általunk kapott eredményekhez. Fontos megjegyezni, hogy egyes ko-regulátorok esetén ilyen ellentétes szerepek a génexpresszió szabályozásában már leírásra kerültek.

A tapasztalt gén- és enhanszer szelektivitás is egy újszerű és feltűnő jellemzője PRMT1-nek, azonban a pontos mechanizmus tisztázatlan maradt. Figyelemre méltó módon, a PRMT1-érzékeny területek egyfajta sejttípus-specifikus szabályozási "hot spot"-nak tekinthetők: megfigyelhető a kulcsfontosságú transzkripció faktorok, mint például Oct3 / 4, Sox2, Klf4 és Nanog kötődése, valamint a ko-aktivátor P300 is szelektíven ezeken a helyeken köt.

A PRMT1 és PRMT8 funkciója az idegsejt differenciáció során

Eredményeink alátámasztják, hogy a PRMT8 egy közvetlen RA - szabályozott gén, amely szintén hozzájárul a retinsav érzékenység szabályozásához, annak ko-aktivátoraként működik. A PRMT1 és PRMT8 retinsav válaszkészség szabályozásában betöltött szerepe kapcsán felmerült a kérdés, vajon a hiányuknak van-e bármilyen következménye a retinsav által kiváltott neuronális differenciálódás folyamatára és / vagy a neuron-specifikus gének kifejeződésére. Genom szintű génexpressziós elemzésünk rávilágított, hogy számos gén eltérően fejeződik ki PRMT1 vagy PRMT8 hiányos sejtekben és ezek a gének kapcsolhatók különböző neurodegeneratív betegségekhez. Érdekes, hogy mind a PRMT1 és PRMT8 hiánya hasonló gének eltérő kifejeződését idézte elő. Az emlős PRMT-ken végzett korábbi összehasonlító vizsgálatok kimutatták, hogy a PRMT1 és PRMT8 mutatja az enzim családon

belül a legmagasabb fokú hasonlóságot. Nemcsak a két fehérje aminosavszekvenciája, hanem az intron-exon határok is nagy mértékben konzerváltak, ami arra utal, hogy a PRMT8 a PRMT1 génduplikációjával jöhetett létre. A hasonlóságok ellenére azonban már korábbi tanulmányok is megfigyelték a PRMT1 és PRMT8 nem-redundáns funkcióit a neurális fejlődése során, ami arra utal, hogy a PRMT8 új funkciókat szerzett a megjelenése óta a PRMT1-hez képest.

Érdekes kérdés, hogy PRMT1 és PRMT8 részt vesznek-e az agy kóros állapotának kialakulásában. Mi nagy betegcsoportok vizsgálata során megállapítottuk, hogy a PRMT8 RNS-szinten szinte teljesen hiányzik humán gliomás szövetekből. Egy triviális magyarázat lehet, hogy a PRMT8, egy nagyon specifikus neurális marker, egyszerűen nem fejeződik ki az astrocyta eredetű daganatokban. Alternatívaként fennáll az a lehetőség, hogy a PRMT8 elvesztése pozitívan befolyásolja az astrocyta differenciálódást, ami egy eltolódást okoz a sejtdifferenciálódás során. További *in vivo* és *in vitro* vizsgálatok szükségesek annak bizonyítására, hogy a PRMT8 hiánya ok vagy okozat a betegség kialakulásában. Eredményeink azt mutatják, hogy a PRMT8 hiánya a neurális sejtekben a Gfra2 gén expresszió csökkenését és a Cxcr4, Dhfr és Efemp1 szintjének növekedését eredményezi, ezek a gének az astrocyta eredetű glioma markereinek tekinthetők. Egy nemrégiben örökletes gliomás megbetegedéseket mutató családokon elvégzett genom szintű analízis kapcsolatot mutatott ki egy, a PRMT8 gén közelében elhelyezkedő SNP és a gliomagenesis között. Bár további kutatási eredmények szükségesek, ezek az eredmények erős indikációi annak az elképzelésnek, hogy a PRMT8 hiánya genetikai kockázati tényező lehet a gliomagenesis kialakulásában és potenciális terápiás célpont. Függetlenül a mechanizmustól, eredményeink alapján a gliomás szövetek biomarkereként alkalmazható.

ÖSSZEFOGLALÓ

Genetikai módszerek és genom szintű génexpresszió technológiák kombinációjával sikerült azonosítanunk, hogy a P300 és a PRMT1 valamint a PRMT8 milyen szerepet játszik egér embrionális őssejtekben a retinsav válasz szabályozásában illetve hogyan működik közre a PRMT1 és PRMT8 *in vitro* a retinsav indukálta neuronális differenciálódásban. Eredményeink alapján a következő modellt javasoljuk: a korai szakaszban csak a PRMT1 expresszálódik és a PRMT1 számos retinsav indukált gén (Hoxa1, Hoxb1, Pmp22 és Spsb1) szelektív represszoraként funkcionál. A PRMT1 érzékeny gének promóter régiói szabályozó "hot spot"ok, Oct3 / 4, Sox2, Klf4 vagy Nanog és P300 kötődését mutatják. Ezáltal a PRMT1 egyfajta negatív-visszacsatolási mechanizmust biztosít a sejteknek, hogy korlátozza a retinsav hatását bizonyos célgének esetén.

Ezt követően, a differenciáció későbbi fázisában a retinsav közvetlenül indukálja a PRMT8 expresszióját. Ebben a késői szakaszban, a PRMT8 együttműködik a PRMT1-el, de a PRMT8 valószínűleg PRMT1-független komplexben is létezik. Ily módon a PRMT1 és a hozzá legközelebbi paralóg PRMT8, integrálja a morfogén retinsavra adott választ. A PRMT1 vagy PRMT8 hiánya többnyire hasonló génexpressziós változásokat eredményez a neurális specifikáció során, de PRMT8-nak van egy független szabályozó hatása is.



Iktatószám: DEENKÉTK/381/2014.
Tételszám:
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Simándi Zoltán
Neptun kód: E0Z9HS
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10040517

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Simándi, Z.**, Czipa, E., Horváth, A., Kőszeghy, Á., Bordás, C., Póliska, S., Juhász, I., Imre, L., Szabó, G., Dezső, B., Barta, E., Sauer, S., Károlyi, K., Kovács, I., Hutóczky, G., Bognár, L., Klekner, Á., Szűcs, P., Bálint, B.L., Nagy, L.: PRMT1 and PRMT8 regulate retinoic acid dependent neuronal differentiation with implication to neuropathology.
Stem Cells. "accepted by publisher" (2014)
IF:7.133 (2013)
2. **Simándi, Z.**, Cuaranta-Monroy, I., Nagy, L.: Nuclear receptors as regulators of stem cell and cancer stem cell metabolism.
Semin. Cell Dev. Biol. 24 (10-12), 716-723, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.10.002>
IF:5.971
3. **Simándi, Z.**, Bálint, B.L., Póliska, S., Rühl, R., Nagy, L.: Activation of retinoic acid receptor signaling coordinates lineage commitment of spontaneously differentiating mouse embryonic stem cells in embryoid bodies.
FEBS Lett. 584 (14), 3123-3130, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.052>
IF:3.601





További Közlemények

4. Cuaranta-Monroy, I., **Simándi, Z.**, Kolostyák, Z., Doan-Xuan, Q., Póliska, S., Horváth, A., Nagy, G., Bacsó, Z., Nagy, L.: Highly efficient differentiation of embryonic stem cells into adipocytes by ascorbic acid.
Stem Cell Res. 13 (1), 88-97, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2014.04.015>
IF:3.912 (2013)
5. Czimmerer, Z., Hulvely, J., **Simándi, Z.**, Varallyay, É., Havelda, Z., Szabó, E., Varga, A., Dezső, B., Balogh, M., Horváth, A., Domokos, B., Török, Z., Nagy, L., Bálint, B.L.: A versatile method to design stem-loop primer-based quantitative PCR assays for detecting small regulatory RNA molecules.
PLoS One. 8 (1), 10 p., 2013.
IF:3.534
6. **Simándi, Z.**, Nagy, L.: Retinoid signaling is a context-dependent regulator of embryonic stem cells.
In: Embryonic Stem Cells - Differentiation and Pluripotent Alternatives. Ed.: Michael S. Kallos, InTech - Open Access Publisher, Rijeka, 55-78, 2011.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 24,151

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
16,705

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, 2014.11.17.



Szakmai előadások

1. Biokémia Vándorgyűlés (Szeged, 2008. aug.30-szept.3)
Cím: A PRMT1 szerepének tanulmányozása egér embrionális őssejtek neurális differenciációjában (magyar nyelvű)
2. 2nd Molecular Cell and Immune Biology Winter School (Krompachy, Szlovákia 2009. jan. 6-9)
Cím: New research objects and tools: ES and iPS (angol nyelvű)
3. 3rd Molecular Cell and Immune Biology Winter School (Mariazell, Ausztria 2010. jan. 7-10)
Cím: Role of PRMT1 in retinoid signaling during stem cell differentiation (angol nyelvű)
4. 4th Molecular Cell and Immune Biology Winter School (Galyatető 2011. jan. 11-14)
Cím: Retinoid signaling in embryonic stem cell differentiation (angol nyelvű)
5. Fókuszban az őssejtkutatás (Debrecen, 2011. március 10-11)
Cím: Arginine methylation in stem cell derived neurons (angol nyelvű)
6. 5th Molecular Cell and Immune Biology Winter School (Galyatető 2012. jan. 4-7)
Cím: The nuclear receptor coactivator PRMT1 is a context-dependent repressor (angol nyelvű)
7. 75th anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel prize award (Szeged, 2012. március 22-25)
Cím: PRMT1 and 8 control cell fate specification of differentiating embryonic stem cells via selectively tuning retinoid-induced gene expression (angol nyelvű)
8. 6th Molecular Cell and Immune Biology Winter School (Galyatető, 2013. jan. 8-11)
Cím: Genes and development (angol nyelvű)
9. 23rd Wilhelm Bernhard Workshop (Debrecen, 2013. augusztus 19-23)
Cím: PRMT1 and PRMT8 coordinately regulates retinoic acid-driven differentiation of mouse embryonic stem cells (angol nyelvű)
10. Annual meeting of the Biochemical Society (Debrecen, 2014. augusztus 24-27)
Cím: PRMT1 and PRMT8 regulate retinoic acid dependent neuronal differentiation with implications to neuropathology (angol nyelvű)
11. MTA Ünnepe - Bioinformatika az agykutatásban (Budapest, 2014. november 11)
Cím: *In vitro* neuron, *in silico* PRMT8, *in vivo* glioma (magyar nyelvű)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítettek és támogattak munkám során.

Ez a dolgozat nem jöhetett volna létre témavezetőm, Dr. Nagy László nélkül.

Hálás vagyok Prof. Dr. Fésüs Lászlónak és Prof. Dr. Tózsér Józsefnek, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet korábbi és jelenlegi intézetvezetőinek, akik lehetőséget teremtettek arra, hogy munkámat egy jól felszerelt környezetben intelligens, elhivatott kollégák között végezhessem.

Hálával tartozom Dr. Bálint L. Bálintnak, aki első tanárom volt a laborban, és megtanított engem a tudományos gondolkodás és munka alapjaira.

Külön köszönetet érdemel a sok együttműködő partner, akik nem csak adatokkal szolgáltak, de rengeteget tanulhattam tőlük: Prof. Dr. Szabó Gábor, Imre László, Dr. Klekner Álmos, Dr. Hortobágyi Tibor, Prof. Dr. Antal Miklós, Dr. Szűcs Péter, Dr. Kőszeghy Áron, Dr. Barta Endre, Dr. Demény Máté, Dr. Szatmári István.

Hálás vagyok a magreceptor kutató laboratórium valamennyi múltbeli és a jelenlegi tagjának a sok önzetlen segítségért, és folyosón lefolytatott tudományos vitákért. Külön köszönet illeti Ixchelt Cuaranta-Monroyt, Póliska Szilárdot, Czimmerer Zsoltot, Dániel Bencét, Brázda Pétert, Nagy Gergelyt, Pap Attilát és Horváth Attilát.

Hatalmas segítséget kaptam Béládi Márta, Szalka Beáta, Fürtös Ibolya és Cseh Tímea asszisztensektől.

Sok segítséget kaptam a tehetséges diákkör diákjaimtól, Kolostyák Zsuzsannától és Sári Zsanettől.

Szeretném kifejezni legmélyebb hálámat szeretett családomnak a segítségükért és támogatásukért. És végül külön köszönettel tartozom a legkedvesebb embernek az életemben, Katának, a megértéséért, a nagylelkűségéért és a végtelen szeretetéért. És még csak meg sem ígérhetem Neked, hogy nem lesz több hétvége feláldozva a tudományért a jövőben :)