

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Az ösztrogén receptor alfa-vezérelt
szuper-enhanszerek kialakulásának vizsgálata**

Bojcsuk Dóra

Témavezető: Dr. Bálint Bálint László



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2019

Az ösztrogén receptor alfa-vezérelt szuper-enhanszerek kialakulásának vizsgálata

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

Írta: **Bojcsuk Dóra**
okleveles klinikai laboratóriumi kutató

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

Témavezető: Dr. Bálint Bálint László, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Nagy Péter Viktor, az MTA doktora
Dr. Barta Csaba, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Élettudományi Központ,
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet könyvtára (3.009-010)
2019. december 13. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Boros Imre Miklós, az MTA doktora
Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Boros Imre Miklós, az MTA doktora
Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
Prof. Dr. Nagy Péter Viktor, az MTA doktora
Dr. Barta Csaba, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2019. december 13. 13 óra

1. Bevezetés

1.1. Az emberi génállomány szerveződése

Az emberi génállomány (genom) megközelítőleg 3,2 milliárd ($3,2 \times 10^9$) bázispár jól meghatározott sorrendiségével írható le, melynek első változatát 2001-ben, a Humán Genom Projekt (HGP) során közölték. A sejtmag, melynek tartalmát a maghártya választja el a citoplazmától, tartalmazza a 2×10^9 megabázispárnyi DNS-t. Hogyan képes ez az összesen megközelítőleg 2 méter hosszúságú fonál elférni a $6 \mu\text{m}$ átmérőjű sejtmagban? A válasz a kromatin egy magasabb rendű, jól strukturált, kompaktabb szerveződésében rejlik. A DNS ennek érdekében először gyöngyfüzérre hasonlító nukleoszóma szerkezetet vesz fel, később 30 nm-es rostokba rendeződik és tekeresszerű, ún. szolenoid fonalra hasonlító, vagy cikk-cakk (zig-zag) szerkezetet hoz létre. A legmagasabb szerveződési szint azonban a kromoszóma szerkezet révén valósul meg. Ennek elérése érdekében a 30 nm-es rost először Kondenzin II gyűrűk által a tövüknél összefogott nagyméretű hurkokat formál. E hurkok töve lényegében egy Kondenzin II-ben gazdag tengelyt képez, melyből sugárirányban állnak ki a különböző méretű hurkok. Ezeket végül a Kondenzin I gyűrűk tagolják tovább a tömör kromoszóma létrehozásához. A kromatin kromoszómákba való feltekeredése a sejtek osztódása során figyelhető meg; a DNS nagy része többnyire a sejtmagban található fehérjék számára könnyen hozzáférhető formában van jelen, lehetővé téve ezáltal a gének DNS-kötő fehérjék általi szabályozását.

1.2. A transzkripció szabályozásának szintjei eukariótákban

A HGP révén megismerhettük a gének elhelyezkedését a genomban, illetve a fehérjekódoló génkészletünket is – melynek mérete 20-25000 génre becsülhető. Az úgynevezett (ún.) háztartási (*housekeeping*) génektől eltekintve, amelyek a sejtek alapvető folyamataiért felelősek, a közel

25000 génnek legfeljebb a fele mutat bármiféle aktivitást az egyes sejtekben; a különböző sejtek pedig a génkészlet más-más része által szabályozódnak. Ez a sejt/szövet-specifikus génexpressziós mintázat, illetve a gének megfelelő időben történő ki- és bekapcsolása határozza meg a szöveti fejlődés molekuláris mechanizmusát, a sejtek sorsát, anyagcsere állapotát, összességében tehát a szerteágazó biológiai folyamatok transzkripciós szabályozását.

A gének szabályozása alapvető biológiai folyamat a sejtek túlélése és működése szempontjából, melyet tökéletesen kifinomult szabályozási mechanizmusok koordinálnak. Az első génszabályozó modellt 1960-ban két, később Nobel-díjjal jutalmazott francia biokémikus, *François Jacob* és *Jacques Monod* alkotta meg, akik azt találták, hogy az *E. coli* laktóz-metabolizmusában szerepet játszó *lac operon* bekapcsolása és szabályozása során a *lacZ*, *lacY* és *lacA* gének termékei (RNS, fehérje) képesek visszacsatolás révén szabályozni a gének expresszióját. Ez a koncepció képezte alapját a kortárs génexpressziós modelleknek.

A jelenlegi tudásunk szerint a DNS-kötő, génszabályozó fehérjék, avagy transzkripciós faktorok ún. *transz* szabályozó elemként fejtik ki serkentő vagy gátló hatásukat, mégpedig olyan *cisz* szabályozó elemekkel (CRE; *cis*-regulatory element) való kölcsönhatás révén, mint a promóterek, enhanszerek, silencer-ek és inzulátorok, vagy olyan *cisz* szabályozó modulokon (CRM; *cis*-regulatory module) keresztül, melyek esetenként több, mint 10 CRE-t is magukban foglalhatnak. Az eukarióta egyedfejlődés során a gének megfelelő szabályozásáért – részben ilyen CRM-eken keresztül – a transzkripciós faktorok jól meghatározott csoportjainak az együttműködése a felelős. E csoportok összetétele kombinatorikus és eltérő a fejlődés különböző fázisaiban, lehetővé téve ezáltal a gének sejt-típus- és környezetfüggő szabályozását.

A transzkripciós faktorok egy random szekvenciához képest a saját felismerő szekvencia motívumaikhoz ezerszeres vagy akár még nagyobb affinitással képesek kötődni, és ez az elsődleges szelekció teszi lehetővé azt, hogy hatásukat csak a célgéneken fejthessék ki.

Amennyiben a kromatin hozzáférhető a transzkripció faktor számára, és az elfoglalja a motívumát, a génekre gyakorolt hatását további ko-faktorok (pl. a TFII complex, a Mediátor komplex vagy az acetil-transzferáz aktivitással rendelkező P300 fehérje) kötésével, valamint poszt-transzlációs (pl. hiszton) módosítások létrehozása által fejtheti ki. A felépült fehérje komplex már képes az RNS polimeráz II enzimet kihorgonyozni a „core” promóterhez és aktiválni azt. A DNS szabályozó elemei mellett – a kromatin szintjén való epigenetikai szabályozás – az eukarióta transzkripció folyamatok másik fontos szintje, amely magában foglalja a nukleoszómába csomagolt „cél” DNS szakasz hozzáférhetőségének, valamint a DNS metiláltsági fokának a szabályozását.

1.3. ChIP-seq: a transzkripció faktor kötőhelyek genom-szintű azonosítása

Az újgenerációs szekvenálással kapcsolt kromatin immunprecipitációs (ChIP-seq; chromatin immunoprecipitation followed by sequencing) módszer alkalmas különböző kromatin-asszociált fehérjék, mint pl. a transzkripció faktorok vagy hiszton módosító enzimek teljes genom szinten történő detektálására, amennyiben azok a DNS-sel valamilyen interakcióban vannak. A módszer kivitelezése tipikusan 1-10 millió sejtet igényel, mely során a vizsgálni kívánt fehérje jelenléte az ellene termeltetett antitest alkalmazásával detektálható.

1.4. Szuper-enhanszerek

A szuper-enhanszerek (SE-ek) olyan szabályozó egységei a genomnak, ahol az enhanszerek viszonylag kis régió belül nagy számban csoportosulnak, és mindez szokatlanul magas ko-faktor, különösképp Mediátor kötődéssel társul. A szuper-enhanszereken a Mediátor komplex 1-es alegysége (MED1) mellett számos más, megnövekedett enhanszer aktivitást kiváltó faktor együttes jelenléte is megfigyelhető; ilyenek pl. a hiszton acetiltranszferáz aktivitással rendelkező

P300 és az acetilált hisztonokat felismerő BRD4 (Bromodomain 4) fehérjék, a hiszton H3K27ac és H3K4me1/2, mint aktív enhanszer- és promóter markerek, vagy maga a kromatin hozzáférhetősége. A tipikus enhanszerekhez képest fontosságuk abban rejlik, hogy olyan gének szabályozásában vesznek részt, melyek a vizsgált sejt jellegét lényegesen meghatározzák.

1.5. A szuper-enhanszerek azonosítása

A két legszélesebb körben alkalmazott szuper-enhanszereket azonosító program a Rank Ordering of Super-Enhancers (ROSE), illetve a Hypergeometric Optimization of Motif EnRichment (HOMER). Az azonosításhoz kiindulhatunk a ChIP-seq kísérletből származó (mester) transzkripciós faktor vagy ko-faktor (MED1, BRD4) kötőhelyekből, vagy alapul vehetjük a H3K27ac-jelölt nukleoszómákkal fedett régiókat is – utóbbi a legáltalánosabban elfogadott módszer. Első lépésben az egyedi enhanszer elemeket a fent említett valamelyik program segítségével csoportokba rendezzük, úgy, hogy a két enhanszer közötti távolság ne haladja meg a 12,5 kb-t. Második lépésben ezeket az enhanszer csoportokat a szekvencia leolvasásaik sűrűsége (denzitása) alapján sorbarendezzük, majd azon pont alatt, ahol a meredekség nem haladja meg az 1-et, az enhanszereket tipikus enhanszereknek tekintjük, a fölötte levő enhanszer klasztereket pedig szuper-enhanszereknek. Összességében néhány száz szuper-enhanszer azonosítható egy-egy kísérletből, melynek száma a két meghatározási módszerrel – eltérő matematikai megközelítés végett – részben eltérhet.

1.6. A magreceptorok

A magreceptor szupercsalád jelenleg ismert 48 tagja humánban számos fiziológus folyamat szabályozásában vesz részt. Ilyenek például a metabolizmus, sejtproliferáció, gyulladás, vagy épp a cirkadián ritmus, de fontos szereppel bírnak olyan patológiás folyamatokban is, mint a

metabolikus szindróma, kardiovaszkuláris megbetegedések, vagy a legtöbb daganatos megbetegedés. Központi szerepüket az a tény is alátámasztja, hogy a farmakológiai gyógyszerek megközelítőleg 13%-ának célpontját a magreceptorok teszik ki.

Nagy részük a transzkripciós faktorok egy olyan csoportját képviselik, melyek ligand-kötő doménjükön keresztül kisméretű, zsíroldékony jelátviteli molekulákkal (pl. szteroid hormonokkal) képesek közvetlen kapcsolatot kialakítani. Ezek a ligandok – zsíroldékony tulajdonságuk révén – a lipid kettősréteg permeabilitását kihasználva azon könnyen átjutnak. A létrejött hormon-receptor komplex számos ko-regulátor (aktivátor vagy represszor) fehérjével kiegészülve a sejtmagban a DNS egy specifikus szekvenciájához (a receptor saját válaszadó eleméhez) közvetlenül képes kötődni és szabályozni a célgének expresszióját. Néhány magreceptor azonban nem rendelkezik ligand-kötő árokkal, ezért szabályozásuk valamilyen más mechanizmus által valósul meg.

1.7. Az ösztrogén receptor alfa

Az 1920-as évek végén *Edward A. Doisy*, *Clement D. Veler* és *Sidney A. Thayer* az elsők között izolálták az ösztrogének közül az ösztront (E1) és az ösztriolt (E3), majd később Doisy az ösztradiolt (E2), melyek alapvetően hidroxilcsoportjuk számában és a receptor iránti affinitásukban mutatnak eltérést. Jóllehet az E1 és E3 is nagy affinitással rendelkező ligandok, az ösztrogén receptoroknak (ER) sokkal gyengébb agonistái az E2-höz képest.

Az E2 (17 β -ösztradiol) fiziológias funkcióinak szabályozásáért alapvetően a két ösztrogén receptor, az ösztrogén receptor alfa (ER α) és béta (ER β) felelnek. A magreceptor szupercsalád talán egyik legintenzívebben tanulmányozott tagja, az ER α leginkább az emlőmirigyben, méhben, a petefészek theca sejtjeiben, a csontban, májban, zsírszövetben, továbbá a férfi reproduktív szervekben és a prosztata sztróma állományában van jelen. Kiemelt szerepe

ugyanakkor annak tudható be, hogy az emlőrákos nők háromnegyedében kulcsfontosságú transzkripciós faktor, és a széles körben alkalmazott anti-ösztrogén hatású készítmények, mint például a tamoxifen, csak a hormonreceptor-pozitív daganatok esetében képesek hatásukat kifejteni.

A legáltalánosabban használt sejtvonal az ER α általi génszabályozás *in vitro* tanulmányozásához az emlő eredetű MCF-7 sejtvonal. Az MCF-7 kiváló *in vitro* modellként szolgálhat a emlődaganat endokrin terápiára adott válaszána, illetve a ER α E2 általi szabályozásának vizsgálatában is.

Az ER α ligand hiányában, bár túlnyomórészt a sejtmagban lokalizálódik, valójában a sejtmag és a citoplazma között mozog. Az ösztradiol általi aktivációja során (mely $K_d=10^{-10}$ M affinitással kötődik a receptor ligand-kötő zsebéhez) a receptor elsőként disszociálódik a hsp90 hőszokkfehérjéről, amely mindaddig meggátolta hatásának kifejtésében, majd a LBD konformációváltozása révén a receptor a citoplazmából a sejtmagba transzlokálódik, ahol közvetlenül képes kötni a DNS egy bizonyos szabályozó régiójához, az ösztrogén válaszadó elemhez (ERE, estrogen response element).

A humán genomban megközelítőleg egy millió ERE található, de az ER α egyidejűleg csak egy nagyon kis hányadukon keresztül fejti ki hatását. Ennek az elsődleges magyarázata az lehet, hogy az ERE-k egy része a fehérje számára nem elérhető, zárt szerkezetű kromatin régióon belül helyezkedik el, de magyarázható a jelenség az ERE-k szekvenciájában lévő eltérésekkel, vagy azzal is, hogy a különböző sejtek eltérő, sejt-specifikus enhanszerkészlet révén szabályozzák a működésükhöz szükséges géneket, és más-más ko-faktorok jelenléte szükséges a kromatin hozzáférhetőségének elősegítéséhez.

1.8. Az ösztrogén receptor alfa partnerei a transzkripciós szabályozásban

Az ER α mellett, hogy működését különféle ko-faktorok vagy ko-faktor komplexek vezérlik (melyek egyaránt lehetnek ko-aktivátor vagy ko-represszor fehérjék/fehérje komplexek), képes számos DNS-kötő transzkripciós faktorról is interakciót kialakítani a gének megfelelő működésének szabályozása érdekében. Az ER α -val interakciót kialakítani képes transzkripciós faktorok közé tartoznak a Forkhead box 1 (FoxA1), Activator Protein 2 gamma (AP2 γ), GATA-binding protein 3 (GATA3), Retinsav receptor alpha/gamma (RAR α/γ), Activator protein 1 (AP-1), vagy a Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) fehérjék.

A FoxA1 többnyire elengedhetetlen az ER α -kromatin kölcsönhatás létrejöttéhez és az ER α célgének szabályozásához. Az ER α transzkripciós faktor kötőhelyek 50%-ának közelében megtalálható a FoxA1 motívuma, de hatását távoli interakció révén is képes kifejteni. A FoxA1-hez hasonlóan az AP2 γ és GATA3 fehérjék motívuma is jelentős feldúsulást mutat az ER α által kötött genomi régiókban. ChIA-PET adatok alapján az E2 kezelést követően távoli interakciót mutató ER α kötőhelyek 88%-ánál kimutatható volt az ER α , FoxA1 és GATA3 fehérjék együttes előfordulása, mely arra engedett következtetni, hogy a három transzkripciós faktor egy komplexet alkotva vesz részt az E2 kezelésre adott transzkripciós válaszok finomhangolásában.

2. Célkitűzés

2.1. A ligand-indukálható szuper-enhanszerek működésének vizsgálata

Publikusan elérhető ER α transzkripciós faktor CHIP-seq adatok (újra)elemzése során megfigyeltük, hogy a specifikus ösztadiol kezelést követően aktiválódó ER α -vezérelt szuper-enhanszerek már a ligand általi stimulust megelőzően is jellemezhetőek egy, maximum néhány olyan kötőhellyel, amelyet ER α foglal el.

Hipotézis: az elsőként aktiválódó kötőhelyek alapját képezik a későbbiekben a ligand hatására kialakuló szuper-enhanszereknek.

Hogy megbizonyosodjunk, szerepet játszanak-e az elsődleges enhanszerek a szuper-enhanszer jellegű együttműködés inicializálásában, megvizsgáltuk, van-e különbség:

1. az elsődleges (anya vagy „mother”) és másodlagos (leány vagy „daughter”) enhanszerek ligand kezelésre adott válaszában;
2. a kötődésük dinamikájában (időbeli követéssel);
3. az általuk elfoglalt DNS szekvencia motívumokban;
4. ko-faktoraik és ko-regulátoraik között; valamint hogy
5. megfigyelhető-e ez a jelenség más, ligand-indukálható transzkripciós faktorok esetében is?

Mivel az MCF-7 sejtvonal egy nagyon fontos modell, sok kutatócsoport végzett benne az ER α transzkripciós faktorra és annak ko-faktoraira irányuló genom-szintű vizsgálatokat, melyek nyers adatai bárki számára elérhetőek a különféle adatbázisokban. Eredményeink teljes körű bemutatására ezért mi is az ER α -t választottuk elsődleges modellünknek.

2.2. Az ER α cisztróm karakterizálása az ösztrogén válaszadó elem (ERE) jelenlétének és a kötőhelyek aktiválhatóságának függvényében

Közel 80000 ER α kötőhelyet osztályoztunk azon tulajdonságaik alapján, hogy rendelkeztek-e ERE-vel, ill. kötötte-e őket ER α ösztradiol hiányában is vagy csak annak hozzáadását követően. Ennek során további 6535 olyan kötőhely meglétét azonosítottuk a genomban, melyek az anya enhanszerekhez hasonlóan rendelkeztek ERE-vel és detektálható volt rajtuk az ER α már a specifikus ligand kezelést megelőzően is.

Célunk volt annak meghatározása, hogy:

1. van-e különbség az anya enhanszerek és a hozzájuk hasonló, nem szuper-enhanszerek részét képező ER α kötőhelyek génexpresszióra gyakorolt hatásában; továbbá
2. van-e különbség a különböző besorolású kötőhelyek által preferált DNS szekvencia motívumokban és társfaktoraikban, továbbá a génexpresszióra gyakorolt hatásukban.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Adatgyűjtés

A ligand indukálható szuper-enhanszerek karakterizálásához a Gene Expression Omnibus (GEO) és a Sequence Read Archive (SRA) adatbázisokból összesen 8, humán és egér sejtekből és sejtvonalakból származó ChIP-seq, továbbá a humán MCF-7 sejtvonalból származó ChIP- és DNáz-seq minta kezeletlen, oldószerrel (*etanol (EtOH)* vagy *dimetil-szulfoxid (DMSO)*), liganddal (*ösztadiol (E2)*, *dihidrotoszteron (DHT)*, *lipopoliszaharid (LPS)*, *retinsav (RA)* vagy *kalcitriol (D3)*) vagy szintetikus ER α agonistával (*tamoxifen (Tam)* vagy *fulvestrant (Fulv)*) kezelt adatait töltöttünk le és dolgoztunk fel. A vizsgált fehérjék a következők voltak: ER α , FoxA1, AP2 γ , AR, JUNB, RAR, VDR, MED1, P300, H3K27ac és BRD4.

Az ösztradiollal kezelt ER α cisztróm 88000 transzkripciós faktor kötőhelyének jellemzéséhez és csoportosításához szintén a GEO és SRA adatbázisokból további, az MCF-7 sejtvonalban végzett ChIP-, DNáz- és RNA-seq adatokat töltöttünk le és dolgoztunk fel. A vizsgált faktorok a következők voltak: ER α , FoxA1, AP2 γ , GATA3, ER α , siCTL ER α , siFoxA1 ER α , H3K27ac, P300, DNáz I, HDAC2 és SIN3.

3.2. ChIP-seq adatok elemzése

A nyers szekvenciaadatok a GEO és SRA adatbázisokból való letöltés után a következő módon lettek elemezve: a szekvencialeolvasások (ún. *read*-ek) illesztése a humán hg19 vagy az egér (mm9) referenciagenomhoz a BWA (Burrows-Wheeler Aligner) szoftverrel (v7.10), a BAM (Binary Alignment Map) fájlok generálása pedig a SAMtools-szal (v0.1.19) történt. A transzkripciós faktor kötőhelyek meghatározásához a MACS2 (Model-based Analysis of ChIP-Seq 2) szoftvert (v2.0.10) használtuk, melyekből a műtermékeket az ENCODE (Encyclopedia of

DNA Elements) „feketelistás” genomi régióinak gyűjteménye alapján szűrtük ki a BEDtools parancsaival. A HOMER (Hypergeometric Optimization of Motif EnRichment) (v4.2) *makeTagDirectory* programjának segítségével – a BAM fájlokat alapul véve – a HOMER számára is megfelelő szűrt bemeneteket, ún. könyvtárakat (*tag directory*) készítettünk a leolvasásokból. A fragmenthosszt egységesen 150 nukleotidra állítottuk be. A bedgraph-ok, melyek a genom szekvencia leolvasások általi lefedettségét reprezentálják, a fent említett HOMER könyvtárakból készültek a *makeUCSCfile* parancs segítségével. A fent leírtak érvényesek a DNáz-seq adat elemzésére is, ugyanakkor a szélesebb H3K27ac régiók azonosításához a *--broad* kapcsolót használtuk MACS2-höz.

3.3. Szuper-enhanszerek azonosítása

A szuper-enhanszerek minden esetben a ligand kezelt CHIP-seq mintákból lettek meghatározva a HOMER *findPeaks* parancsával, a *-style super* kapcsolót használva. A szuper-enhanszerek egyedi kötőhelyeinek középső 50 bp-nyi régióján RPKM értéket számoltunk az oldószerrel kezelt (kontrollnak tekinthető) mintából, majd szuper-enhanszerenként a legnagyobb intenzitású kötőhelyet *anya enhanszernek* neveztük el. A – többnyire – ligand kezelés hatására, másodlagosan elfoglalt kötőhelyek a *leány enhanszer* nevet kapták.

3.4. De novo motívumkeresés

A *de novo* motívumfeldúsulásokat a transzkripció faktor kötőhelyek középpontjától számított ± 50 bp-nyi régió vizsgáltuk, melyhez a HOMER *findMotifsGenome* programját használtuk. A célzottan keresett motívumok 10, 12, 14 és 16 bp hosszúságúak voltak.

3.5. RNS szekvenálási adatok analízise

A nyers szekvenciaadatok a GEO adatbázisból lettek letöltve, majd a leolvasások a humán hg19 referencia genomhoz lettek illesztve a TopHat program (v2.0.7) segítségével. Az FPKM (Fragments Per Kilobase of transcripts per Million mapped reads) értékek, melyek megadják a fragmentek számát 1000 bázisonként, egy millió térképezett leolvasásra vetítve, a Cufflinks (v2.0.2) program alapértelmezett paramétereivel lettek számolva. A transzkripciós faktor kötőhelyek a legközelebbi fehérjekódoló génekhez lettek hozzárendelve (azaz annotálva) a PeakAnnotator program segítségével.

4. Eredmények

4.1. Az ligand indukálható szuper-enhanszerek működésének vizsgálata

4.1.1. Anya és leány enhanszerek azonosítása

Az ösztrogén receptor alfa ($ER\alpha$) transzkripciós faktor általi génszabályozás vizsgálata során az emlő eredetű MCF-7 sejtvonalban összesen 392 szuper-enhanszer régiót azonosítottunk, melyek 4042 egyedi enhanszert foglaltak magukba. Az azonosításhoz az ösztradiollal (E2) indukált $ER\alpha$ transzkripciós faktor kötőhelyeit vettük alapul, melyek a GSM614610 GEO azonosítójú ChIP-seq mintából lettek prediktálva.

A szuper-enhanszer régiókat az IGV genomböngészőben megtekintve arra lettünk figyelmesek, hogy az oldószerrel (etanollal; EtOH) kezelt mintában is megfigyelhető egy-egy elfoglalt $ER\alpha$ kötőhely minden egyes szuper-enhanszer esetében. Feltételezve, hogy az elsőként megjelenő kötőhelyek alapját képezhetik a későbbiekben a ligand hatására megjelenő szuper-enhanszereknek, a szuper-enhanszerek ezen kötőhelyeit „anya” enhanszereknek (n=392; minden szuper-enhanszer esetében a legnagyobb intenzitású csúcs) neveztük el, míg a másodlagos, csak ligandkezelést követően aktivált kötőhelyek a „leány” enhanszer (n=3650) nevet kapták.

4.1.2. A kromatin transzkripciós aktivitásának vizsgálata

Ahogy a bevezetőben is szó esett róla, a szuper-enhanszerek szokatlanul magas ko-faktor, különösképp Mediátor kötődéssel társulnak. Az $ER\alpha$ -vezérelt szuper-enhanszerek esetében azt találtuk, hogy a MED1 E2 kezelést követően ugyanazon genomai régióknál helyezkedik el, mint az anya-enhanszerek, továbbá kötőgyakorisága követi a vizsgált szuper-enhanszereket alkotó 4042 egyedi kötőhely $ER\alpha$ általi lefedettségét. A MED1 mellett megvizsgáltuk továbbá a szuper-

enhanszerek egyedi kötőhelyeinek a DNáz I hiperszenzitivitását, a P300 és BRD4 fehérjék és a H2K27ac hiszton módosító enzim jelenlétét is. Az anya enhanszerek a fehérjék számára sokkal nyitottabb kromatin régióban helyezkednek el, továbbá E2 kezelést követően jelentősen megnő a MED1, P300, H3K27ac és a BRD4 jelenléte ezeken a helyeken. Ezzel ellentétben a leány enhanszereken, bár látható némi növekedés a vizsgált fehérjék mennyiségében (a BRD4 kivételével), összességében sokkal kisebb aktivitás jellemzi őket.

4.1.3. Specifikus szekvenciamotívumok azonosítása

Az eddigi eredményeink alapján azt feltételeztük, hogy az anya és leány enhanszerek aktivitásában megfigyelhető különbségekért más ko-faktorok lehetnek a felelősek, melyek eltérő affinitással járulhatnak hozzá az ER α DNS-hez történő kihorgonyozásához. Ennek megválaszolására megvizsgáltuk a *de novo* motívumfeldúsulásokat a két enhanszer csoport kötőhelyein.

A viszonylag kisszámú szekvencia (n=392) ellenére, ha figyelembe vesszük az erős *P*-értéket ($1e-200$) és az ERE feldúsulásának mértékét (62,2% vs. 3,37%), az eredmény arra utal, hogy a nagy mennyiségű ER α jelenléte az anya enhanszereken (ligand hiányában is) elsősorban ezeknek a kanonikus válaszadó elemeknek köszönhető. Ezzel szemben az ER α a leány enhanszereket többnyire fehérje-fehérje interakció révén, félhelyeken és a FoxA1 és AP-1 fehérjéken keresztül foglalja el helyét a DNS-en. Mindez nem zárja ki az ERE jelenlétét a leány enhanszereken, csupán azok statisztikai feldúsulása nem volt azonosítható.

4.1.4. További ligand-indukálható szuper-enhanszerek vizsgálata

Az elsődleges kötőhelyeket, melyeknek a DNS-sel való interakciója nem igényli a ligand általi stimulációt, szignifikánsan erősebb válaszadó elemek vezérelnek és feltehetően nem igénylik más transzkripciós faktor(ok) jelenlétét sem. Ezeket az elsődleges megfigyeléseinket 6 további ligand által indukálható transzkripciós faktor ChIP-seq adatait felhasználva próbáltuk meg alátámasztani. Ezen faktorok közé tartozott 3 másik magreceptor, név szerint az egér bél epitélsejtekben vizsgált D-vitamin receptor (VDR), az F9 egér embrionális karcinóma sejtvonalban vizsgált retinsav receptor (RAR), és a humán LNCaP prosztataráksejtben vizsgált androgén receptor (AR), továbbá a C57BL/6 egértörzs primer csontvelő eredetű makrofágjaiban vizsgált JUNB, és az MCF-7 sejtvonalban vizsgált, az ER α – talán – legfontosabb társfaktoraiként ismert FoxA1 és AP2 γ faktorok.

Eredményeink alapján elmondható, hogy minden vizsgált indukálható transzkripciós faktor esetében ugyanazt a jelenséget figyeltük meg, mint eredendően az ER α esetében: az elsődlegesen aktív szabályozó régiók tulajdonában egy kanonikus vagy közel tökéletes válaszadó elem állt, amely specifikus a vizsgált, az adott sejtben/sejtvonalban domináns transzkripciós faktorra, míg a másodlagosan elfoglalt kötőhelyek sokkal gyengébb motívumokon keresztül, és sokszor társfaktor(ok)ra hagyatkozva stabilizálták az egyébként is kisebb mennyiségű fehérjét.

4.2. Az ER α cisztróm jellemzése az ERE jelenlétének és a kötőhelyek indukálhatóságának függvényében

4.2.1. Kötőhelyek csoportosítása az indukálhatóság és az ERE megléte alapján

Abból kiindulva, hogy az oldószerrel kezelt ER α CHIP-seq mintában több, mint 20000 kötőhelyet tudtunk azonosítani, azt feltételeztük, hogy lehetnek az anya enhanszerekhez hasonló, olyan ER α kötőhelyek is a genomban, melyek bár nem képezik szuper-enhanszerek részét, de ligand hiányában is kötöttek, és rendelkeznek az anya enhanszerekhez hasonlóan erős, kanonikus válaszadó elemmel. Amennyiben állításunk igaz, a kérdésünk az, van-e különbség a génexpresszióra gyakorolt hatásukban vagy a ko-faktoraik között.

A fentiek megválaszolására az E2 kezelt mintából származó, közel 80000 ER α kötőhelyet osztályoztuk azon tulajdonságaik alapján, hogy az ER α kötődött-e a DNS-hez már ösztradiol hiányában is, vagy csak annak hozzáadását követően, továbbá, hogy a kötőhelyek rendelkeztek-e ERE-vel.

Az ER α kötőhelyeknek összesen négy csoportját különítettük el a fenti besorolás alapján, melyek közül egy csoportot a szuper-enhanszerek képeztek (I. csoport; n=4042). A második csoportba azok az ER α kötőhelyek kerültek, melyek az anya enhanszerekhez hasonlóan E2 hiányában is kötődtek a DNS-hez, mégpedig az ERE-n keresztül (II. csoport; n=6535). A harmadik csoport viszonylag nagyobb elemszámú ER α kötőhelyet foglalt magába, ahol bár azonosítani tudtuk az ERE-t, a receptor kötődése csak kezelést követően volt megfigyelhető (III. csoport; n=16533). Azon típusú kötőhelyek pedig, melyek nem rendelkeztek ERE-vel, a negyedik csoportba lettek sorolva (IV. csoport; n=54408).

4.2.2. Az ösztradiol hatása az ER α kötésének erősségére a különböző csoportokban

A négy csoport ER α kötőhelyeinek lefedettség értékeit ábrázolva azt tapasztaltuk, hogy bár a II. típusú kötőhelyek az anya enhanszerekhez hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek és ezt kihasználva a dinamikájuk is azonos (értem ez alatt az ERE meglétét és a ligand hiányában történő DNS-kötést), kötésük erőssége az E2 hatására alig haladja meg a leány enhanszerekét. Ezt a markáns különbséget okozhatja az, hogy az anya enhanszereknek erősebb válaszadó elemeik vannak, illetve a szuper-enhanszerek tagjaiként a leány enhanszerek tovább növelhetik a DNS/fehérje kölcsönhatások számát. Az ösztradiol hatása bár mindegyik csoportban számottevő volt, a III. típusú, újonnan, ERE-n keresztül elfoglalt *de novo* enhanszerek és az indirekt módon kötöttek, végeredményében sokkal kisebb fehérjemennyiséget mutattak

4.2.3. A FoxA1, AP2 γ és GATA3 fehérjék megléte a különböző csoportokban

A 4 különböző típusba sorolt ~88.000 ER α transzkripciós faktor kötőhely motívumpreferenciái részben utaltak arra, hogy mely fehérje/fehérjék közvetlen DNS-hez történő kapcsolódásán keresztül jön létre az ER α kötése, ugyanakkor nem zárták ki az ER α transzkripciós szabályozásában résztvevő további fehérjék másodlagos jelenlétét. Ebből kiindulva megvizsgáltuk a FoxA1, AP2 γ és a GATA3 fehérjék, továbbá magának az ER α -nak a jelenlétét a FoxA1 fehérje siRNS-mediált géncsendesítését követően a szuper-enhanszerek egyedi elemein és a II-IV. típusú ER α kötőhelyeken.

A FoxA1 meghatározó szerepét érzékelteti, hogy hiánya teljes körű csökkenést eredményez az ER α kötések erősségében, a leány enhanszerek egy nagy hányada pedig el is tűnik. Mindez arra utal, hogy a FoxA1-nek bár csupán másodlagos, de nagyon fontos szerepe van

az ER α -vezérelt szuper-enhanszerek kialakulásában. A FoxA1 hatását tovább fokozza az AP2 γ jelenléte az anya enhanszereken, ugyanakkor a GATA3 csak elenyésző mértékű kötődést mutat.

A II. típusú kötőhelyeket mind a FoxA1, mind az AP2 γ globális jelenléte jellemezte E2 kezelést követően, ugyanakkor a FoxA1 hiánya nem eredményezett olyan drámai hatást az ER α kötésében; alighanem az AP2 γ megléte képes ellensúlyozni a FoxA1 hiányát. A III. típusú, *de novo* megjelenő kötőhelyek az ERE-n kívül bár minden egyéb fehérje motívumától és azok közvetlen jelenlététől függetlenek, a FoxA1 hiányában az ER α kötések teljes egészében eltűntek. A FoxA1 valószínűleg a kromatin hurkolódásának köszönhetően, távoli szabályozás révén kerül fizikai közelségbe ezekkel az ER α kötőhelyekkel és hatását ily módon képes kifejteni.

4.2.4. Az ER α célgénének expressziója

A szuper-enhanszerek nem csupán a magukhoz toborzott ko-aktivátorok mennyisége és az ebből fakadó aktivitásuk miatt kivételesek; a génekre gyakorolt hatásuk szintén meghatározó. Többnyire az adott sejt jellegéért felelős gének szabályozását koordinálják, mégpedig szokatlanul magas expressziót produkálva. Utolsó lépésben arra voltunk kíváncsiak, hogy a mi vizsgált rendszerünkben is képesek-e a szuper-enhanszerek valóban markánsabb transzkripciós kimenetet produkálni a tipikus enhanszerek csoportjaival szemben. Ehhez meghatároztuk az ER α kötőhelyekhez/szuper-enhanszerekhez legközelebbi fehérjekódoló géneket, majd ábrázoltuk az E2 kezelést követő különböző időpontokban mért expressziójuk átlagos értékét. Míg a II., III. és IV. típusba sorolt ER α kötőhelyek nagyon hasonló, átlagosan 10 FPKM körüli génexpressziót mutattak, az I-es típusba sorolt szuper-enhanszerek ennek – minden időpontban – legalább a kétszeresét produkálták.

4.2.5. Az ER α -vezérelt szuper-enhanszerek által szabályozott gének

Az ER α -vezérelt szuper-enhanszerek által szabályozott gének között olyan, az emlőrákos folyamatokban szerepet játszó géneket azonosítottunk, mint például a BCAS3, KRT8, KRT19, AZIN1, SLC9A3R1, CXXC5, SLC7A5, HES1 vagy a CCND1. Példaként, a BCAS3 (Breast Carcinoma Amplified Sequence-3) míg az emlőrákos sejtekben az ER α ko-aktivátoraként ismert, a KRT8 és KRT19 (Keratin 8 és 19), az AZIN1 (Antizyme inhibitor 1), SLC9A3R1 (SLC9A3 Regulator 1), SLC7A5 (Solute Carrier Family 7 Member 5), CXXC5 (CXXC Finger Protein 5) és a HES1 (Hes Family BHLH Transcription Factor 1) gének megváltozott expressziójuk révén a rossz prognózissal, a kemoterápiás rezisztenciával vagy metasztatikus állapottal mutatnak korrelációt az emlőrákos betegekben.

Az általunk azonosított ER α -vezérelt szuper-enhanszerekről is elmondható, hogy többnyire olyan gének közelében helyezkednek el, amelyek az emlő-eredetű MCF-7 sejtvonalban valóban kulcsfontosságú szereppel bírnak, az őket felépítő egyedi enhanszerek együttműködése révén az általuk produkált transzkripciós kimenet pedig sokkal markánsabb a tipikus enhanszerekéhez képest.

5. Diszkusszió

A szabályozó régiók genom-szinten való megismerését a szekvenálási technikák folyamatos fejlődése tette lehetővé. A szekvenálásból származó adathalmaz feldolgozásának igénye magával hozta a bioinformatika exponenciális fejlődését, és ma már az újabbnál újabb programcsomagok megjelenésével adatainkat egyre hatékonyabb módon tudjuk elemezni.

Az ER α , mely az ösztrogén-szenzitív emlőrákos betegekben az elsődleges gyógyszercélpontot jelenti, szerepe a transzkripciós szabályozásban bár közel három évtizede ismert, annak pontos működése csak az utóbbi egy évtizedben, a ChIP-seq technika révén körvonalazódott. Az addigi tudásunkkal ellentétben a genom-szintű adatok arra utaltak, hogy az ER α transzkripciós faktor kötőhelyeknek csupán 7%-a található közvetlenül a gének promóterén, 93%-uk pedig *cisz* szabályozó elemeken keresztül fejt ki hatását.

2013-ban *Richard A. Young* és munkacsoportja a különböző sejttípusok specifikációjára alkalmas, ún. sejttípus-specifikus gének közelében olyan szabályozó elemek csoportját azonosította, melyekről bebizonyosodott, hogy hatásuk összeadódik és együtt a szabályozott gének extrém magas expresszióját képesek kiváltani. Ezeket a szabályozó régiókat szuper-enhanszereknek nevezték el.

Jelen munka alapját egy olyan 2010-ben publikált ER α ChIP-seq minta képezte, amely már 81518 ER α kötőhely azonosítását tette lehetővé az emlő-eredetű MCF-7 sejtvonalban, ösztradiol kezelést követően. A sejtvonal ER α -vezérelt szuper-enhanszereinek azonosítása során arra lettünk figyelmesek, hogy minden szuper-enhanszerre jellemző egy, legfeljebb kettő ER α kötőhely jelenléte már az ösztradiol kezelést megelőzően is. Feltételeztük, hogy ezek az elsődleges – később anya enhanszereknek elnevezett – régiók alapját képezik a szuper-

enhanszerek kialakulásának, ezért célunk volt az anya-, és a másodlagosan megjelenő, ún. leány enhanszerek jellemzése és szerepük megértése az ER α általi transzkripciós szabályozásban.

Az anya enhanszerek nagy affinitású, kanonikus válaszadó elemekkel rendelkeznek; ez jelentheti a kiindulópontját a szuper-enhanszerek kialakulásának – már a ligand kezelést megelőzően. Az ER α kötése szinte kizárólag a saját válaszadó elemén, az ERE-n keresztül jön létre, és a kötés fenntartásához alapvetően nincs szükség ko-faktorok közvetlen jelenlétére sem. Jellemző rájuk a MED1 és különböző ko-regulátorok, mint a P300 és a BRD4 jelenléte, továbbá az aktív hiszton (H3K27ac) jelek feldúsulása. Ligandkezelést követően a ko-regulátorok mennyisége fokozódik, a FoxA1 és AP2 γ fehérjék is megjelennek, de kizárólag másodlagos, stabilizáló szerepet látnak el.

A másodlagosan, ösztadiol stimulációt követően megjelenő leány enhanszerek dinamikájukat tekintve sokkal inkább jellemezhetőek tipikus enhanszerekként. Többnyire kevésbé specifikus, nem kanonikus ösztrogén válaszadó elemén, vagy a magreceptorokra jellemző félhelyen és az irodalomból is jól ismert FoxA1 és AP-1 ko-faktorok motívumán keresztül foglalják el helyüket a DNS-en, kötésük erőssége pedig az anya enhanszerek kötéserősségének töredéke, nagyjából tizede. A különbséget a tipikus és leány enhanszerek között mégis az jelentheti, hogy a leány enhanszerek feladatukat más enhanszerekkel együtt, egy funkcionális egységként látják el.

Kialakulásukat illetően azt feltételezzük, hogy az anya enhanszerekhez stabilan kötődő, illetve a további, gyakori előfordulást mutató ER α fehérjék sokkal nagyobb valószínűséggel foglalják el az anya enhanszerekhez közeli leány enhanszereket, mint a genomnak egy távoli, kevésbé specifikus régióját. A jelenséget 5 különböző egér és humán sejtvonalon, 7 transzkripciós faktor vonatkozásában validáltuk.

A rendelkezésünkre álló 81518 ER α transzkripciós faktor kötőhelyet aszerint rendszerezve, hogy kötődnek-e a DNS-hez már ösztradiol hiányában vagy csak annak hozzáadását követően, továbbá rendelkeznek-e ERE-vel – a szuper-enhanszereken felül – három további típusra különítettünk el.

Azon túlmenően, hogy jellemeztük a kötésük dinamikáját és megvizsgáltuk a különböző ko-faktorok jelenlétét, arra voltunk kíváncsiak, van-e különbség a különböző csoportok célgénjeinek expressziója között. Azt találtuk, hogy sem a II. típusba sorolt ER α kötőhelyek, melyek az anya enhanszerekhez hasonlóan már ligand hiányában az ERE-n keresztül képesek voltak kötődni a DNS-hez, sem a III. típus kötőhelyei, melyek szintén kizárólag az ERE-n keresztül, de csak a ligand hatására foglalták el helyüket, sem a IV. típus kötőhelyei, melyek kötését társfaktorok segítették elő, nem voltak képesek olyan erős génexpressziót produkálni, mint a szuper-enhanszerek.

Eredményeink tovább erősítik azt a sokak által vitatott nézetet, hogy a szuper-enhanszerek egy szabályozó egységként működnek, továbbá a tipikus enhanszerekhez képest sokkal markánsabb transzkripciós kimenetet képesek eredményezni, még akkor is, ha azok az anya vagy leány enhanszerekhez hasonló tulajdonságokkal és dinamikával rendelkeznek. Elmondhatjuk, hogy elsőként jellemeztük a ligand-indukálható szuper-enhanszerek működését és eredményeink más kutatócsoportokat is arra ösztönöztek, hogy tovább vizsgálják az ER α -vezérelt szuper-enhanszerek egyedi elemeinek működését, fontosságát és a közöttük megfigyelhető – általunk addig csak feltételezett – interakció meglétét.

6. Összefoglalás

A szuper-enhanszerek a genom olyan szabályozó egységei, ahol az enhanszerek klaszterekben rendeződnek és hatásukat a célgénekre – a nevükhöz híven – „szuper fokozókként”, együtt fejtik ki. A fogalmat először 2013-ban említették, azóta több mint 500 olyan publikáció jelent meg, mely a szuper-enhanszerek vizsgálatára irányul. Közöttük számos olyan található, amelyben a különböző betegségekre hajlamosító gének szuper-enhanszerek általi szabályozását azonosították.

Kutatásunk során az ER α -vezérelt szuper-enhanszerek működését vizsgáltuk az emlő eredetű MCF-7 sejtvonalban. Azt találtuk, hogy az ER α -vezérelt szuper-enhanszerek helyét tipikusan már a ligand általi aktivációt megelőzően kijelöli a kanonikus válaszadó eleméhez kötődő ER α . Az ilyen válaszadó elemek olyan specifikusak és olyan nagy mennyiségű fehérjét képesek a genom adott szakaszához toborozni E2 hatására, hogy az egyúttal elősegíti a szomszédos, gyengébb válaszadó elemek ER α általi elfoglalását is – kialakítva így a szuper-enhanszereket.

Az elsődleges, „kijelölő” szereppel rendelkező kötőhelyeket anya enhanszereknek, míg a ligand általi aktivációt követően elfoglalt kötőhelyeket leány enhanszereknek neveztük el. A szuper-enhanszerek kialakulásának ezen mechanizmusát 5 további humán és egér sejtvonalon, 7 ligand által indukálható transzkripciós faktor vonatkozásában validáltuk.

A genomban azonosítható ~80000 ER α transzkripciós faktor kötőhely csoportosítása és vizsgálata során azt találtuk, hogy az anya enhanszerekkel azonos tulajdonságokkal és dinamikával rendelkező tipikus enhanszerek önmagukban nem képesek ugyanazt a transzkripciós kimenetet eredményezni, mint az egységként működő szuper-enhanszerek. Eredményeink nemcsak az anya enhanszerek kivételes szerepét igazolják a szuper-enhanszereken belül, hanem a

fokozó szereppel bíró leány enhanszerek fontosságát is, és indokolttá teszik a szuper-enhanszerek különböző sejtekben történő azonosítását és az általuk szabályozott gének megismerését.



Nyilvántartási szám: DEENK/296/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

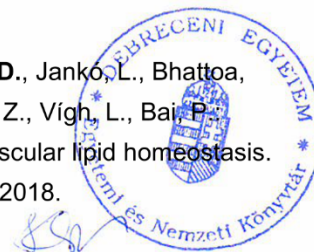
Jelölt: Bojcsuk Dóra
Neptun kód: BD1BZT
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bojcsuk, D.**, Bálint, B. L.: Classification of different types of estrogen receptor alpha binding sites in MCF-7 cells.
J. Biotechnol. 299, 13-20, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.04.016>
IF: 3.163 (2018)
2. **Bojcsuk, D.**, Nagy, G., Bálint, B. L.: Inducible super-enhancers are organized based on canonical signal-specific transcription factor binding elements.
Nucleic Acids Res. 45 (7), 3693-3706, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw1283>
IF: 11.561

További közlemények

3. Divoux, A., Sándor, K., **Bojcsuk, D.**, Talukder, A., Li, X., Bálint, B. L., Osborne, T. F., Smith, S. R.: Differential open chromatin profile and transcriptomic signature define depot-specific human subcutaneous preadipocytes: primary outcomes.
Clin Epigenet. 10 (1), 1-15, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13148-018-0582-0>
IF: 5.174
4. Márton, J., Péter, M., Balogh, G., Bódi, B., Vida, A., Szántó, M., **Bojcsuk, D.**, Jankó, L., Bhattoa, H. P., Gombos, I., Uray, K., Horváth, I., Török, Z., Bálint, B. L., Papp, Z., Vigh, L., Bai, P.: Poly(ADP-ribose) polymerase-2 is a lipid-modulated modulator of muscular lipid homeostasis.
Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids. 1863 (11), 1399-1412, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.07.013>
IF: 4.402





5. Vető, B., **Bojcsuk, D.**, Bacquet, C., Kiss, J., Sipéki, S., Martin, L., Buday, L., Bálint, B. L., Arányi, T.: The transcriptional activity of hepatocyte nuclear factor 4 alpha is inhibited via phosphorylation by ERK1/2.
PLoS One. 12 (2), 1-19, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0172020>
IF: 2.766
6. Ozgyin, L., Erdős, E., **Bojcsuk, D.**, Bálint, B. L.: Nuclear receptors in transgenerational epigenetic inheritance.
Prog. Biophys. Mol. Biol. 118 (1-2), 34-43, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.012>
IF: 2.581
7. **Bojcsuk, D.**, Erdős, E., Bálint, B. L.: Az ösztrogénreceptor működése a legújabb genomikai kutatások tükrében.
LAM KID. 4 (2), 79-84, 2014.
8. **Bojcsuk, D.**, Sipos, L., Bálint, B. L.: A mikro-RNS-ek mint a hormonok egy új családja.
LAM KID. 3 (4), 29-33, 2013.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 29,647

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
14,724**

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, 2019.08.22.



Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném hálámat és köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, *Dr. Bálint Bálint Lászlónak*, aki MSc tanulmányaim során arra ösztönzött, hogy a munkacsoportja tagjaként a számomra addig teljesen ismeretlen bioinformatikai elemző módszereket megismerhessem. Köszönöm a PhD tanulmányaim során nyújtott folyamatos segítségét, támogatását és értékes szakmai tanácsait.

Köszönettel tartozom *Dr. Horváth Attilának* és *Czipa Eriknek*, hogy az első hónapokban türelemmel és erő felett segítették munkámat; nélkülük talán nem sajátíthattam volna el a bioinformatika alapjait. Köszönettel tartozom *Erdős Edinának*, *Ozgyin Lillának* és *Noura Farajnak*, akik a munkacsoport tagjaként nem csupán szakmai támogatást nyújtottak számomra, hanem barátként a mindennapokban is mellettem álltak.

Köszönöm a Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola jelenlegi és korábbi vezetőinek, *Prof. Dr. Tózsér Józsefnek* és *Prof. Dr. Fésüs Lászlónak*, hogy PhD tanulmányaimat a doktori iskola keretein belül, egy nagyon jó légkörben és nagy szakmai tudással rendelkező kutatók között végezhettem. Köszönettel tartozom a kollaborátoroknak, *Dr. Dánielné Sándor Katalinnak*, *Dr. Adeline Divoux-nak*, *Dr. Timothy F. Osborne-nak* és *Dr. Steven R. Smith-nek*, hogy a közös munka során egyúttal tanulási lehetőséget is biztosítottak számomra. Külön köszönettel tartozom *Szántó-Kiss Líviának* és *Elek Nóranak* mérhetetlen türelmükért és segítségükért – nélkülük számos szakmai rendezvény adta lehetőségről kellett volna lemondjak.

Legnagyobb hálával azonban a családomnak, *Szüleimnek* és *Gergőnek* tartozom. Köszönöm a szüleim pótolhatatlan szeretetét, Gergőnek pedig köszönöm, hogy kritikus hozzáállásával mindig a jobbra ösztönzött, emellett barátként és társként is mindvégig mellettem állt.

A disszertációhoz kapcsolódó kutatások az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-3-DE-140 és az ÚNKP-18-3-III-DE-253 Új Nemzeti Kiválóság Programjának, továbbá az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 ösztöndíjnak a támogatásával készültek.