

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**COUP-TFII árva magreceptor általi kötőesemények genomszintű vizsgálata
daganatos sejtekben**

Erdős Edina

Témavezető: Dr. Bálint Bálint László



**DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**

DEBRECEN, 2020

COUP-TFII árva magreceptor általi kötőesemények genomszintű vizsgálata daganatos sejtekben

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

Írta: **Erdős Edina**
okleveles klinikai laboratóriumi kutató

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

Témavezető: Dr. Bálint Bálint László

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, az MTA rendes tagja
tagok: Dr. Pankotai Tibor, PhD
Dr. Nagy Béla, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2020. július 15., 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Patócs Attila, az MTA doktora
Dr. Penyige András, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, az MTA rendes tagja
opponensek: Dr. Patócs Attila, az MTA doktora
Dr. Penyige András, PhD
tagok: Dr. Pankotai Tibor, PhD
Dr. Nagy Béla, PhD

Az értekezés védésének (online formában) időpontja: 2020. július 15., 14:00

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze edina.erdos@med.unideb.hu e-mail címre a vitát megelőző munkanap (2020. július 14.) 16 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Bevezetés

A szervezetünkben nagyon sok olyan hírvivő molekula létezik, melyek hidrofób tulajdonsággal rendelkeznek, azaz rosszul oldódnak vízben. Ezeknek a molekuláknak az eloszlásához hordozó fehérjékre van szükség (például globulinok), azonban a zsírdékony tulajdonságaiknak köszönhetően könnyen átjutnak a plazmamembránon és a sejtben specifikus intracelluláris receptorokhoz kötődnek. Ezeknek a receptoroknak egy része DNS-kötő fehérje, és transzkripciós faktorként működik. Feladatuk, hogy a környezetből származó stimulusokra génexpressziós szinten hozzanak létre választ. Ezeket a receptorokat gyűjtőnéven magreceptoroknak nevezzük. A magreceptorok számos biológiai folyamatban játszanak szerepet, mint például a növekedés és embrionális szabályozás, fenotípus fenntartás és metabolikus folyamatok szabályozása (koleszterol, epesav és zsírsav metabolizmus). Ezekben a folyamatokban bekövetkező zavarok terméketlenséghez, elhízáshoz, cukorbetegséghez és akár daganatok kialakulásához is vezethetnek.

A kardiovaszkuláris betegségek után a daganatos megbetegedések a második vezető halálok világszerte (WHO, 2018). Magyarországon közel azonos a rosszindulatú daganatok és kardiovaszkuláris betegségek miatti halálozások száma (~33 000 haláleset évente) a Központi Statisztikai Hivatal adatai alapján. A WHO adatai alapján globálisan 2016-ban férfiak esetén a tüdőrák, míg nők esetén az emlőrák volt a leggyakoribb halálozás a daganatos megbetegedések közül, és ezen halálozások száma évről évre növekszik az egyre hatékonyabb terápiás beavatkozások ellenére is.

Munkánk során a COUP-TFII árva magreceptor szerepének vizsgálatát tűztük ki célul funkcionális genomikai módszerekkel különböző eredetű daganatsejtekben, ezek közül is elsősorban az emlődaganatra fókuszálva.

1.2. Magreceptorok

A magreceptorok ligand-aktivált transzkripciós faktorok. A ligandjaik olyan hidrofób hírvivő molekulák lehetnek, melyek a szervezetünkben is előfordulnak, mint például tiroid hormonok, retinoidok, szteroidok, D vitamin, zsírsavak, epesavak vagy xenobiotikumok. A magreceptorok struktúrájuk alapján nagyfokú konzerváltságot mutatnak, és hasonló funkcionális doménekből állnak. Ezek a domének a nagymértékű variabilitást mutató N-terminális domén (A/B), a DNS-kötő domén (DBD) két cinkujj motívummal, a D domén és a C-terminális domén (E/F), amely a ligand-kötő domént (LBD) tartalmazza.

A magreceptorok működésük alapján két csoportra oszthatóak. Az egyik csoport, amelyek citoplazma és sejtmag között mozognak, ők főként a szteroid receptorok, a másik csoport, pedig amelyek tartósan a sejtmagban foglalnak helyet. A szteroid receptorok a citoplazmában hőssok fehérjék segítségével dimerizálódnak és megkötik a ligandjukat. A ligand kötődése olyan konformáció változásokat okoz a magreceptor híd és LBD-jében, amely majd a sejtmagba való transzlokációt segíti elő. Miután leváltak a magreceptorok a hordozó fehérjékről, a sejtmagban a specifikus DNS válaszadó elemekhez kötődnek, és homodimerként szabályozzák a transzkripciót. A DNS-hez való kötődést követően a magreceptorokhoz számos fehérje fog kötődni, melyeket gyűjtőnéven koregulátoroknak nevezünk. A másik csoportot képezik azok a magreceptorok (RAR, PPAR), melyek gyakran ligand nélkül kötődnek a DNS válaszadó elemekhez ko-represszorokkal és kromatin módosító enzimekkel együtt a DNS-t kevésbé hozzáférhető állapotban tartják. Ligand kötődés hatására olyan konformáció változás történik a magreceptoron belül, amely által a korepresszorok ko-aktivátorokra fognak lecserélődni létrehozva egy transzkripciósan aktív állapotot.

1.3. Ösztrogén receptor alfa (ER α) magreceptor

Az ösztrogén receptor alfa (ER α) egy szteroid hormon magreceptor, melynek a természetes ligandja az ösztrogén. Az ösztrogént az ösztron (E1), az ösztradiol (E2) és az

ösztrol (E3) alkotja, melyek közül a keringésben az 17β -ösztrol a legjelenebb. 17β -ösztrol kötődik a legnagyobb affinitással az ösztrogén receptorhoz.

Ösztrol (E2) hatására a szteroid receptorokra jellemző mechanizmus játszódik le, azaz közvetlenül a genomhoz kötődve az ERE motívumon keresztül fejt ki hatását. Ezenkívül ismert még, hogy más transzkripciós faktorokon (AP-1 elemen keresztül a FOS/JUN dimerhez kötődve) keresztül fejt ki a szabályozó hatását. Az $ER\alpha$ -nak ismertek nem genomi úton megvalósuló szabályozó mechanizmusai. Ez több módon történhet. Az egyik az, amikor sejtmembránon asszociált úgynevezett G-protein kötött ER (GPER) köti az E2-t, amely egyéb jelátviteli útvonalakat aktiválva indít transzkripcionális válaszreakciót. A másik pedig, amikor E2 hiányában egy ligand független aktiváció történik, ilyenkor a jel foszforiláció formájában egyéb jelátviteli útvonalakból (például EGF vagy IGF1) származik.

Hisham Mohammed és munkatársai endogén fehérjék gyors immunprecipitációját követő tömegspektrometriát (RIME) alkalmazva azonosítottak $ER\alpha$ -asszociált kofaktorokat. Az azonosított 108 kofaktor között jelen van a jól ismert FoxA1, TLE1, AP2- γ , GATA3, p300, NCOA3, NRIP1 és RAR. Ezek mellett kevésbé ismert transzkripciós asszociációt találtak az $ER\alpha$ -val GREB1 és COT2 (COUP-TFII) esetében. Mivel keveset tudunk az $ER\alpha$ és COUP-TFII közötti transzkripcionális kapcsolatról, így munkánk egyik célja ennek a kapcsolatnak a tanulmányozása.

1.4. COUP-TFII árva magreceptor

Csirke ovalbumin gén 5' vég felőli promóterhez kötődő transzkripciós faktor 2 (COUP-TFII, egyéb nevei az NR2F2, ARP-1, COT2) a szteroid/tiroid magreceptor család tagja. COUP-TF fehérjéket először 1980-as években izolálták HeLa sejtmag kivonatból. A humán és egér COUP-TFII aminosav szinten 100% azonosságot mutat, továbbá *Drosophila* 1-es típusú *svp* fehérje és humán COUP-TF DBD-je között 94% és az LBD-je között 93% azonosság van. Mindez azt feltételezheti, hogy a COUP-TF fehérjék a magreceptor család

egyik legősibb tagjai. A COUP-TFII-t általánosságban árva magreceptorként tartjuk számon, mert természetes ligandja még nem ismert, de retinsav képes strukturális aktivációt okozni a COUP-TFII LDB-jében *in vitro*, azonban ez a retinsav koncentráció bőven a fiziológiás szint fölött van. COUP-TF-k képesek felismerni a magreceptor család egyéb tagjainak, mint például TR, RAR, VDR, HNF4 vagy ER α kötőhelyét, ezzel versengést kialakítani a kötőhely hozzáférhetőségéhez. COUP-TFII árva magreceptorral kapcsolatban több tanulmány beszámolt arról, hogy számos biológiai folyamat szabályozásában részt vesz, például szervképződés, neurális fejlődés, kardiovaszkuláris folyamatok, szaporodás, metabolizmus és betegségek (veleszületett szívfejlődési rendellenesség (CHD) és daganat). COUP-TFII^{-/-} homozigóta knock-out egér a fejlődés embrionális 10. napja körül meghal szív- és érrendszeri zavarok, illetve angiogenezis defektusa miatt. Angiogenezisben betöltött szerepéről egyéb tanulmányokban is beszámoltak, ahol a COUP-TFII hatással van olyan angiogenikus folyamatokra, mint a vaszkuláris endotél növekedési faktorok (VEGF) és receptoraik (VEGFR), Angiopoietin-1/Tie2 és Notch gének kifejeződése. COUP-TFII minden emberi szövetben expresszálódik, magas expressziós szintet mutat endokrin, metabolikus, reprodukív és kardiovaszkuláris szövetekben.

1.5. Magreceptorok jelentősége daganatos megbetegedésekben

A magreceptorok kulcsfontosságú szerepet játszanak számos biológiai folyamatban azáltal, hogy komplex génszabályozási hálózatot hoznak létre, melyben keletkező hiba daganatos eseményekhez vezethet. Bizonyos magreceptorok jelenléte kapcsolatban van a betegek túlélésével és kezelésével, mivel terápiás célpontként szolgálnak. Erre az egyik legjobb példa az ösztrogén és progeszteron receptor (ER és PR) jelenléte emlődaganatban, amely meghatározza az emlődaganat típusának besorolását. Az ER és PR-pozitív emlődaganat jobb prognózissal és jobb túléléssel jár, mint azok az emlődaganat típusok, ahol nem fejeződnek ki ezek a receptorok. Az ER-pozitív emlődaganatos betegek kezelésében az

áttörést a szelektív ösztrogén receptor modulátorok (SERM) hozták. Az elmúlt évtizedekben SERM-ek mellett megjelentek szelektív ösztrogén receptor lebontók (SERD-ek), aromataz és szulfataz inhibitorok ER jelátviteli útvonalak célpontjához. Ennek ellenére a betegek ~40%-ánál endokrin rezisztencia jelenik meg, ami a daganatos megbetegedés kiújulásához vezet. Az endokrin rezisztenciának kialakulásához számos tényező hozzájárulhat. Egy tanulmány alapján az emlődaganat sejtek endokrin szenzitivitásának fenntartásában fontos szerepet játszhat a COUP-TFII is. A COUP-TFII alacsony expressziót mutat tamoxifen-rezisztens humán emlődaganat sejtekben, azonban a COUP-TFII újraexpresszáltatása ezekben a sejtekben visszaállítja a tamoxifenre való érzékenységet. Egy másik tanulmányban pedig azt mutatják, hogy a COUP-TFII sejt és gyógyszer típusfüggő módon van hatással a kemorezisztenciára emlődaganat sejtekben. Emlődaganatos betegekben a COUP-TFII expressziós szintjének jelentőségére nincs konkrét következtetés, mivel különböző tanulmányok eltérő eredményeket mutatnak. A COUP-TFII expressziójának szerepét egyéb daganatos megbetegedésekben is vizsgálták, például prosztatadaganatban, gyomordaganatban, kolorektális daganatban, hasnyálmirigy adenokarcinómában és petefészekdaganatban. Ezekből azt láthatjuk, hogy a COUP-TFII prognosztikai jelentősége tanulmányoktól és daganat típusától függően eltérő, pontos szerepe még nem ismert.

1.6. Funkcionális genomikai eszközök magreceptorok általi szabályozások vizsgálatához

Az elmúlt évtizedekben a genomi technológiák olyan fejlődésen mentek keresztül, mely megengedi a magreceptorok általi génszabályozások jobb megértését teljes genom szinten. Funkcionális genomikai módszerekkel lehetővé vált a génexpresszióban, kötések célhelyében, DNS metilációban és kromatin hozzáférhetőségben történő változásokat nyomon követni. A magreceptorok, koregulátorainak és egyéb DNS-kötő fehérjék kötőhelyeinek feltérképezése kromatin immunprecipitációt követő szekvenálással (ChIP-Seq) lehetséges. A kromatin

immunprecipitáció (ChIP) fehérje és DNS közötti interakción alapul. A módszer során az általunk vizsgálni kívánt fehérje ellen termeltett antitesttel “kihalásszuk” azokat a DNS fragmenteket, melyet a fehérjénk köt. A ChIP során kritikus lépéseinek számítanak a megfelelő kiindulási sejtszám, mely 10-20 millió sejtet jelent, a fragmentek mérete, a megfelelő „ChIP-grade” antitest kiválasztása, megfelelő kontrollok kiválasztása és szekvenálás mélység. Mindezen kritikus lépések miatt a ChIP-Seq kevésbé alkalmazható betegekből származó minták közvetlen vizsgálatához.

ChIP-Seq adatok kombinálása RNS szekvenálással hozzájárul a magreceptorok kötőhelyeinek és annak transzkripciós következményének vizsgálatához teljes genom szinten. Ezeket együtt kombinálva megvizsgálhatjuk, hogy bizonyos hormon vagy gyógyszeres kezelések hogyan befolyásolják a magreceptorok kötődését és a gének kifejeződését, így megjósolható a terápiás lehetőségekre adott válasz. Mivel a sejtekben egyszerre több magreceptor is jelen van, és ezeknek bizonyos szabályozó régiói átfedést mutatnak, így a magreceptor család tagjai közötti kapcsolat vizsgálata hozzájárulhat új szerepek megismeréséhez a tumor progressziójában és kezelésében.

2. CÉLKITÚZÉSEK

A COUP-TFII árva magreceptor jelentőségéről daganatos folyamatokban számos tanulmány beszámolt, azonban genom szintű tanulmányok kevésbé elérhetőek. Célunk az volt, hogy megértsük teljes genom szinten a COUP-TFII általi szabályozási mechanizmusokat különböző daganatsejtekben. Ehhez a következő célkitűzéseket alkottuk:

- Magreceptorok általi kötőhelyek vizsgálatához kiemelt jelentőséggel bíró kromatin immunprecipitáció (ChIP) karakterizációja ER α epitópot kifejező fág kontrollal
- COUP-TFII, mint kevésbé tanulmányozott ER α koregulátor, cisztromjának és transzkriptomjának feltérképezése ER-pozitív emlődaganat sejtekben
- COUP-TFII génexpresszójának vizsgálata különböző altípusú emlődaganatos betegekre vonatkozólag, és túlélésre gyakorolt hatásának megállapítása
- COUP-TFII cisztromjának karakterizálása egyéb különböző eredetű daganatsejtekben (emlődaganat, májdaganat és leukémia eredetű sejtekben)
- Angiogenezisben szerepet játszó gének COUP-TFII általi szabályozásának vizsgálata
- A COUP-TFII expressziójának jelentősége a túlélésre különböző daganatos betegekből

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Sejtek tenyésztése és kezelése

MCF-7 és HEK293T sejtek DMEM médiumban tenyésztettük, melyet 10% FBS-sel, 1% L-glutaminnal és 1% penicillin-streptomycinnel egészítettünk ki. T47D sejteket RPMI-1640 médiumban tenyésztettük, melyet szintén kiegészítettünk 10% FBS-sel, 1% L-glutaminnal és 1% penicillin-streptomycinnel. COUP-TFII géncsendesített MCF-7 és T47D sejt vonalakat hoztunk létre a MISSION® Lentivirális Transzdukciós Partikulájának használatával. A kész lentivírus tartalmazza a COUP-TFII csendesítéséhez szükséges shRNS szekvenciát (NM_000125, TRCN0000003300 Clone). Kontrollként pedig egy olyan shRNS szekvenciát tartalmazó lentivírust használtunk, melynek nincs célpontja humán sejtekben (MISSION® pLKO.1-puro Non-Target shRNA Control Lentiviral Transduction Particles, SHC016V-1EA, Sigma). A kísérletet a gyártó ajánlásának megfelelően hajtottuk végre.

3.2. Fág termelés poliklonális antitest epitópjának leképezéséhez

New England Biolabs (Ph.D.TM-7 Phage Display Peptide Library Kit) előkészített random heptapeptid könyvtárát használtuk olyan fágok létrehozásához, melyek nagy affinitással kötődnek a széles körben használt ER α antitest hipervariábilis régiójához. Nagy vonalakban a kísérletről: 5 μ l (10^{11} pfu) fág peptid könyvtárát 1 ml 1% BSA tartalmú TBST pufferrel előblokkoltunk, majd 10-60 percen keresztül inkubáltuk. A blokkolt fághoz 10 μ g antitestet, majd 50 μ l előblokkolt mágneses gyöngyöt adtunk az antitest-fág komplexhez. A reakciót 20 percig inkubáltuk szobahőn enyhe rotálással. A gyöngyöket tízszer mostuk TBST/BSA pufferrel, majd eluáltuk kétszer savas elúciós oldattal (0,2 M glicin-HCl (pH 2,2), 1 mg/ml BSA) 20 percig szobahőn. A savas elúciós oldat semlegesítéséhez 150 μ l 1 M Tris-HCl puffert (pH 9,1) adtunk 1 ml eluátumhoz.

Fág amplifikáció. Ezután a fágokat F+ER2738 baktérium törzsben szaporítottuk úgy, hogy 25 ml baktérium kultúrát a korai log fázisban megfertőztük és 4,5-5 órán keresztül nem szelektív LB médiumban erősen rázattuk, majd centrifugáltuk a mintákat. A fágokat, melyek a felülúszóban voltak megtalálhatóak, egy éjszakán át precipitáltuk 4°C-on 1/6 térfogatú 20% (v/w) PEG-8000/2.5M NaCl oldattal, majd a centrifugált pelletet TBS-ben vettük fel. A fágokat ismét precipitáltuk ugyanazzal az oldattal. A centrifugált pelletet 200 µl TBS pufferben vettük fel. A fág partikulák koncentrációjának méréséhez spektrofotométerrel mértük az abszorbanciát 260 nm-en. Hosszabb idejű tároláshoz 50% végkoncentrációban gliceroltadtunk és -20°C-on tároltuk.

Monoklonális fág termelés. Ehhez a New England BioLabs fág titrálási és plakk amplifikációs protokollját használtuk néhány módosítással. Az amplifikált poliklonális fágokat 10^9 - 10^{13} -szorosra hígítottuk LB médiumban, majd 200 µl ER2738 baktérium törzset fertőztünk 10 µl hígított faggal a középső log fázisban, majd a fertőzött sejteket LB/IPTG/Xgal lemezekre szélesztettük és 37°C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Másnap, egy éjszakát inkubált ER2738 baktérium kultúrát 1:100 arányban hígítottunk és a korai log fázisig (OD₆₀₀ 0,3-0,5 között) növesztettük, majd a lemezről egy különálló kolóniát 2 ml baktérium kultúrába oltottunk. Ezután a „*Fág amplifikáció*” lépéseit követtük.

3.3. Kromatin immunprecipitáció (ChIP)

Fág ChIP. A kísérlethez HEK293T fragmentált kromatint használtunk. A HEK293T kromatinhoz kísérletnek megfelelő térfogatú és mennyiségű (1, 10 és 100 millió) fágot adtunk, majd a kromatin-fág mixet antitest (ERα: sc-543X) konjugált mágneses gyöngyökkel precipitáltuk. Ezt követően a mágneses gyöngyökhöz kötődő komplexet mostuk különböző sótartalmú ChIP mosó pufferrel. Az antitest-kromatin komplexet elúciós pufferrel eluáltuk, majd a keresztkötéseket NaCl hozzáadásával feloldottuk. A mintákat RNázal és Proteináz K-

val emésztettük. Az immunprecipitált DNS-t High Pure PCR Template Preparation Kitet használva tisztítottuk a gyártó utasításainak megfelelően.

ChIP emlődaganat sejtekből. A kromatin immunprecipitációhoz 15-20 millió emlődaganatból származó sejtvonalból (MCF-7 és T47D) indultunk ki. A sejteket 1% metanolmentes formaldehiddel fixáltuk 10 percig szobahőmérsékleten, majd a fixálást 0,125 M glicinnel állítottuk le. A sejteket jéghideg 1xPBS pufferrel mostuk. A sejteket 1 ml ChIP lízis pufferben kapartuk fel, majd maximális fordulaton centrifugáltuk. A sejtmag izolálás során a pelletet háromszor szuszpendáltuk ChIP lízis pufferrel. A kromatin fragmentálását Bioruptor Plus Szonikátor készülékkel végeztük. Szekvenáláshoz 15-20 millió sejtnek, míg kvantitatív PCR-hez 5 millió sejtnek megfelelő kromatin mennyiséget hígítottunk tízszeresen. Az immunprecipitáció egy éjszakán át 4°C-on történt a következő antitesteket használva: ER α (sc-543X), COUP-TFII (sc-271265X) és IgG (sc-2027X). Az antitestek mennyisége szekvenálásra szánt minták esetén 8 μ g, míg kvantitatív PCR-re szánt minták esetén 4 μ g. Az inkubációt követően előblokkolt Protein A és G konjugált mágneses gyöngyöket adtunk. A mintákat ismét inkubáltuk minimum 6 órán keresztül 4°C-on. Ezt követően a mágneses gyöngyökhöz kötődő komplexet különböző sótartalmú ChIP mosó pufferrel és TE pufferrel mostuk. Az antitest-kromatin komplex eluálása, és keresztkötés feloldása után a mintákat RNázal és Proteináz K-val emésztettük. Az immunprecipitált genomi DNS-t Qiagen MinElute PCR Purification Kitet használva tisztítottuk a gyártó utasításainak megfelelően.

3.4. RNS izolálás és reverz transzkriptáz PCR (RT-PCR)

A sejteket RNS izoláláshoz 6 lyukú lemezen növesztettük, majd PBS-sel történő mosás után 0,5 ml Trizolate reagensben (UD-Genomed) vettük fel és a gyártó protokollját követtük. RNS koncentrációmérést NanoDrop segítségével végeztük.

cDNS szintézishez minden esetben 1 μ g totál RNS-t írtunk át SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermofisher 18064071) segítségével. A gyártó instrukciójától eltérően a

laborunkra specifikusan egy reakcióra számolva a következő mennyiségeket állítottuk be a szükséges reagensekből: 4 μ l SSII puffer (5x), 2 μ l DTT (100 mM), 4 μ l dNTP (2.5 mM), 0,08 μ l random hexamer (3 μ g/ μ l) és 0,08 μ l SSII MnIv enzim (200 U/ μ l), és 10 μ l RNS minta. A reakcióhoz a következő hőmérsékleti profilt használtuk: 10 perc 25°C, 2 óra 42°C és 15 perc 70°C. A PCR-t követően a mintákat 5x mennyiségben hígítottuk nukleázmentes vízzel.

3.5. qPCR

Kvantitatív polimeráz láncreakcióhoz 2x SYBR Green Master Mix-et használtunk, melyhez 2,5 μ M végkoncentrációban primereket, ROX passzív referencia festéket és nukleázmentes vizet adtunk. A mix végtérfogata 7,5 μ l, és ehhez 2,5 μ l mintát adtunk. Ez a minta háromféle lehetett: egyszálú fág DNS vagy ChIP-ből származó genomi DNS vagy cDNS. A PCR hőmérsékleti profiljának 5 perc 95°C, 30 mp 60°C és 30 mp 72°C lett beállítva 40 ciklusszámmal és olvadáspont analízissel ABI QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR készüléken. Az elemzés során a Δ CT módszert alkalmaztuk. A ChIP során a normalizálás input DNS-hez, míg génexpressziós mérés esetén ACTB (β -aktin) génhez történt.

3.6. Új generációs szekvenálás

Az új generációs szekvenálást és az azt megelőző könyvtárkészítést a Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium végezte. A ChIP DNS könyvtárak Illumina's TruSeq ChIP Sample Preparation protokollja szerint készültek 10 ng ChIP DNS-ből kiindulva, majd a könyvtárak 50 bp-nyi egyirányú leolvasásban voltak szekvenálva Illumina NextSeq 500 rendszeren. RNS szekvenáláshoz 1 μ g totál RNS-ből kiindulva Illumina's TruSeq RNA Sample Preparation kettes verziójú protokoll alapján történt a könyvtárkészítés. Az elkészült könyvtárak Illumina NextSeq 500 rendszeren lettek megszekvenálva 50 bp-nyi egyirányú leolvasásban.

3.7. Új generációs szekvenálási adatok elemzése

ChIP-Seq adatok. Általunk generált ChIP-Seq és RNA-Seq adatok megtalálhatóak az NCBI BioProject PRJNA602619 szám alatt, egyéb ChIP-Seq adatok nyilvánosan elérhető adatbázisokból származnak. A ChIP-seq adatok analízise házon belül létrehozott számítógépes elemzési lépések követésével valósult meg. Ezek a lépések nagyvonalakban a következők: A szekvenálási leolvasások Burrows-Wheeler Alignment v0.7.17 (BWA) programmal voltak hg19 (GRCh37) genomhoz illesztve. Majd a csúcsok predikciója Model-based Analysis for ChIP-Seq (MACS2) v2.1.1 programmal történt. Az általunk generált ER α és COUP-TFII ChIP-Seq adatok csúcs predikciója HMCAn programmal történt a DNS amplifikációk miatti torzítások kiküszöbölése végett. A műtermékek az ENCODE által elérhető lista alapján lettek kiszedve Bedtools v2.27.1 (intersectBed) programmal. ENCODE által elérhető ChIP-Seq adatok esetén lefedettség (RPKM) alapján sorbarendeztük a csúcsokat és a felső 25%-ba eső csúcsot használtuk további elemzésekhez. A prediktált csúcsok közötti átfedések, kivonások és összevonások BedTools v2.27.1 programmal történtek. Átfedések vizsgálata diffBind R csomag használatával történt. A motívum analíziseket HOMER v4.9.1 program findMotifsGenome.pl parancsával végeztük. Szekvencia feldúsulási eloszlásokat a HOMER program annotatePeaks.pl parancsával számoltuk ki 1000-2000 bp hosszúságú régiókon, majd hőtérképen vagy hisztogramon ábráztuk a kapott eredményeket. A csúcsok génekhez való asszociálása szintén a HOMER program annotatePeaks.pl parancsával történt. Génontológiai elemzést pedig a Genomic Regions Enrichment Annotations Tools (GREAT) v3.0.0 segítségével végeztük.

RNA-seq adatok. A nyers adatok humán hg19 referencia genomhoz illesztése TopHat v2.1.1 programmal történt. Az egyes génekhez tartozó leolvasások számát a featureCounts v1.6.2 program segítségével határoztuk meg. A minták között különbözően expresszázó gének

azonosítása R v3.5.1 alatt futó edgeR v3.22.3 programmal történt FDR 0.01 határérték beállításával. Génszett feldúsulási elemzést a GSEA v4.0.0 programmal végeztük.

3.8. Betegekből származó adatok elemzése

Emlődaganatos betegek adatai a „The Cancer Genome Atlas” adatbázisból származnak, melyet a cBioPortal segítségével töltöttünk le. Feldolgozott RNA-Seq-ből származó „z-score” adatokat használtunk génexpressziós analízishez. A túlélési adatokat a betegek nagy csoportját összegyűjtő KMPlotter adatbázis adatai alapján dolgoztuk fel.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Kromatin immunprecipitáció karakterizálása ER α epitópot kifejező fág kontrollal

A kromatin immunprecipitáció komplex és több lépéses folyamat, amely több szinten kíván kontrollt és normalizációt. Az egyik legfontosabb, hogy ismerjük a kiválasztott antitestünket az alkalmazott módszerben. Célunk volt, hogy egy jól ismert antitesttel (ER α sc-543x) egy szabványosított, kontrollal ellenőrizhető ChIP kísérletet állítsunk be, ezért a laborunkban kifejlesztett módszer segítségével ER α epitópot kifejező fágot hoztunk létre fág bemutatással. A fág kiválóan alkalmas fehérje és DNS közötti interakció tanulmányozásához, ugyanis a fág burok fehérjéje képes az általunk vizsgálni kívánt fehérje egy bizonyos rövid részletét kifejezni, míg a fágban lévő ismert egyszálú DNS szekvenciával ki tudjuk mérni a DNS-t qPCR-rel. A NEB Ph.D.TM-7 random heptapeptid könyvtár segítségével több körös ciklus után egyedi monoklonális fágklónokat hoztunk létre. Először tíz monoklonális fág esetében azt teszteltük, hogy melyik klónok használhatóak ChIP reakcióhoz. Megvizsgáltuk, hogy mennyi fágot tudunk visszanyerni a teljes ChIP elúcióból, illetve mennyi marad veszteségként az IP pufferben. Két olyan klónt találtunk, amelyet a vissza tudtunk nyerni a

teljes folyamat után. Tovább vizsgálva ezeket a klónokat azt vizsgáltuk meg, hogy 100, 10 000 és 1 000 000 fágklónt hozzáadva a ChIP-hez, mennyit tudunk visszanyerni az antitestünkkel. Az eredményeink azt mutatják, hogy 100 fágot használva ~60%-ot, míg ha ennél több fágot használtunk, akkor ~80%-ot tudtunk visszamérni az elúcióban. További kísérleteinkben megvizsgáltuk ER α epitópot kifejező fág a reprodukálhatóságát és stabilitását. Két külön ChIP kísérletben teszteltük a megismételhetőséget, melynek eredményeként azt láthatjuk, hogy két kísérletben a különböző mennyiségű fágok ellenére is ugyanazt az eredményt kaptuk. A fagyasztás hatásának vizsgálta során pedig azt találtuk, hogy ~10%-kal csökkent az IP hatékonyság, míg a frissen termelt fágok esetében az korábbi eredményekhez hasonló IP hatékonyságot figyelhetünk meg. A fág rendszer lehetővé teszi, hogy megvizsgáljuk a ChIP reakció során létrejövő epitóp veszteségeket. Eddigiek alapján azt láttuk, hogy az elúcióban lévő fágvisszanyerés ~50-60% volt, míg az IP pufferben a fágveszteség 20% körüli. Fág kontrollal a kísérletek megkezdése előtt jól kiszűrhető az antitesteknél gyakran előforduló termelési sarzs variabilitás. Összességében ezek az eredmények azt sugallják, hogy a fágok mint „spike-in” kontrollok alkalmazhatóak a kromatin immunprecipitáció során.

4.2. COUP-TFII, mint ER α koregulátor ER-pozitív emlődaganatban

A COUP-TF árva magreceptorral kapcsolatban már számos kutató beszámolt arról, hogy kölcsönhatásban van ER α magreceptorral, azonban genomszintű tanulmányok kevésbé állnak rendelkezésre. Kutatásunk során a COUP-TFII szerepét vizsgáltuk meg ER α mediált szabályozásokban teljes genom szinten emlődaganat sejtekben, ehhez ER α és COUP-TFII ChIP-et követő szekvenálást alkalmaztunk ER α -pozitív MCF-7 és T47D sejtekből. Azt találtuk, hogy a COUP-TFII kötőhelyek ~90%-a fed át ER α kötőhelyekkel MCF-7 sejtekben, ami azt jelzi, hogy a COUP-TFII jelentős része van jelen az ER α általi szabályozási programban. Az átfedő kötőhelyeknél magasabb az ER α és COUP-TFII ChIP-seq

jelintenzitás van, mint a magreceptoroknál önmagukban. Ugyanezeket az eredményeket meg tudtuk erősíteni T47D sejtekben is. Megvizsgálva aktív hiszton módosítások jelenlétét COUP-TFII-el együtt kötött ER α és csak ER α kötőhelyeknél, azt találtuk, hogy COUP-TFII-el együtt kötött ER α régiók magasabb jelintenzitását mutatják azoknak a hiszton módosításoknak, amelyek aktív enhanszer jelenlétével függenek össze. Annak vizsgálatára, hogy a COUP-TFII és ER α átfedő kötőhelyek milyen egyéb transzkripciós faktorok lehetnek jelen, motívumelemzést hajtottunk végre. Eredményeink azt mutatják, hogy az ER α és COUP-TFII átfedő kötőhelyeknél a magreceptorokra jellemző NR félhely, FOXA1 és GATA3 motívum mutat jelentős feldúsulást, melyet kötés szinten is igazolni tudtunk. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a COUP-TFII jelen van FOXA1 és GATA3 kofaktorokkal kötött ER α mediált transzkripciós programban.

4.3. COUP-TFII szerepe emlődaganat sejtek génexpressziójában

Emlődaganat sejtekben a COUP-TFII általi génexpressziós szabályozások vizsgálatához, COUP-TFII csendesített ER-pozitív emlődaganatból származó sejt vonalakat hoztunk létre lentivirális alapú shRNS géncsökkentést alkalmazva. Azt találtuk, hogy a COUP-TFII csökkentés hatására magasabban kifejeződő génjeink olyan folyamatokhoz köthető génekhez hasonlítanak, melyeknek csökkent expressziója van tamoxifen rezisztens sejtekben, viszont ösztrogén kezelés hatására expressziójuk fokozódik. Mindez azt sugallja, hogy a változó génjeink ER α által is szabályozott gének. Az alacsonyabban kifejeződő génszettünk összehasonlításánál olyan géneket találtunk, melyek DREAM komplex célgének is, azaz fontos szerepet töltenek be a sejtciklus szabályozásában.

4.4. COUP-TFII jelentősége emlődaganatos betegekben

COUP-TFII génexpressziójának vizsgálatához különböző alcsoportjait használtuk az emlődaganatos betegeknek azért, hogy közelebbi képet kapjunk a COUP-TFII fontosságáról

az egyes altípusokban. A HER2-pozitív és bazális alcsoport ER-negatív emlődaganat, így a vártak megfelelően az ER α szintje alacsony, és ugyanez figyelhető meg a COUP-TFII esetében is. Az ER-pozitív alcsoportokban a COUP-TFII expressziója is jelentős az ER α mellett. Az eredményekből még az látható, hogy a COUP-TFII expressziója invazív lobuláris karcinóma (ILC) luminális A csoportban szignifikánsan ($p < 0,0001$) magasabb, mint invazív ductális karcinóma (IDC) luminális A csoportban. Ezt követően megvizsgáltuk a betegségmentes túlélési arányt (DFS) arra alapozva, hogy a COUP-TFII-nek magas vagy alacsony az expressziója ER-pozitív és ER-negatív emlődaganatos csoportban. ER-pozitív csoportban a COUP-TFII magas expressziója szignifikánsan (logrank $P < 0,0001$, Mantel-Cox teszt) jobb túléléshez járul hozzá, mint a COUP-TFII alacsony expressziója. Ezután az ER-pozitív csoportot további luminális A és B alcsoportra osztva vizsgáltuk meg a túlélést. Azt találtuk, hogy a COUP-TFII magas expressziójához köthető jobb túlélés csak a luminális A csoportban figyelhető meg, a luminális B csoportban nincs különbség a túlélésben a COUP-TFII expressziós szintjére vonatkozólag.

4.5. COUP-TFII kötőhelyek feltérképezése különböző eredetű daganatsejtekben

A COUP-TFII kötőhelyek genomi eloszlásáról különböző daganatsejtekben keveset tudunk, ezért az emlődaganat sejtek mellett máj és leukémia eredetű daganatsejtekben vizsgáltuk meg a COUP-TFII kötődését genom szinten publikusan elérhető ChIP-Seq adatok alapján. Összesen 64149 COUP-TFII kötőhelyet prediktáltunk a három sejtvonalban, melynek 2,35%-a (1509/ 64149) mutat átfedést mindhárom sejtvonal között (három sejt-típusban átfedő COUP-TFII), míg kötőhelyek nagy része csak egy adott sejt típusban van jelen (sejt-típus specifikus COUP-TFII). A kötőhelyek eloszlását tekintve teljes genomra nézve azt mondhatjuk, hogy a három sejt-típusban átfedő COUP-TFII kötőhelyek ~40%-a, míg az egyedi sejtekre jellemző COUP-TFII kötőhelyeknek csak ~10%-a található promóter régióban. Annak vizsgálatára, hogy a COUP-TFII kötőhelyek az egyes sejt típusokban milyen

biológiai folyamatokhoz köthető gének közelében dúsulnak fel, arra a GREAT programot használtuk. Ennek eredményeként azt találtuk, hogy a COUP-TFII kötőhelyek olyan gének közelében találhatóak, melyek az adott sejtre jellemző biológiai folyamatokhoz köthetőek.

4.6. COUP-TFII kötőhelyekhez kötődő kofaktorok azonosítása

A COUP-TFII mellett jelenlévő kofaktorokról kevés ismereteink vannak, ezért motívumelemzést hajtottunk végre a három sejt-típusban átfedő és sejt-típus specifikus COUP-TFII kötőhelyeknél. A magreceptorokra jellemző AGGTCA motívum (NR) feldúsulását figyelhetjük meg mind az átfedő és mind az egyedi sejtvonalakban. Ezen kívül azt láthatjuk még, hogy MCF-7 és HepG2 sejtekben a FOXA1 motívum, míg K562 sejtekben a GATA motívum jelenik meg jelentős mértékben. A három sejt-típusban átfedő COUP-TFII kötőhelyeknél pedig a CTCF motívum feldúsulását figyelhetjük meg. A sejt-típus specifikus COUP-TFII kötőhelyeket a mester transzkripció faktorok, míg a három sejt-típusban átfedő COUP-TFII kötőhelyeket a CTCF jelenléte határozza meg.

4.7. COUP-TFII kötőhelyek a sejt-típus specifikus szabályozásban

A COUP-TFII kromatin környezetének vizsgálatához először megnéztük, hogy a COUP-TFII milyen arányban van jelen az adott sejtre jellemző mester transzkripció faktor és CTCF mellett a különböző sejtekben. Azt találtuk, hogy mester transzkripció faktorok több mint fele átfed COUP-TFII kötőhelyekkel egy-egy sejtvonalon belül, illetve a CTCF több átfedést mutat COUP-TFII-vel, mint a mester transzkripció faktorokkal. A sejt-típus specifikus COUP-TFII kötőhelyek főként mester transzkripció faktorokkal, míg három sejt-típusban átfedő COUP-TFII kötőhelyek CTCF-el mutatnak nagyobb mértékű átfedést. Mindez megerősíti korábbi eredményünket, hogy a COUP-TFII sejt-típus specifikus kötőesemények az adott sejt mester transzkripció faktorához, illetve a három sejt-típusban közös COUP-TFII kötőesemények főként CTCF-hez köthetőek. A sejt-típus specifikus szabályozás meghatározó

DNS elemei az aktív enhanszer és promóter régiók, melyek jól jellemezhetőek különböző hiszton módosítások jelenlétével. Azt találtuk, hogy a COUP-TFII mester transzkripció faktorral inkább aktív enhanszer elemeknél, míg önmagában vagy CTCF-el aktív promóter régióban találhatóak.

4.8. A VEGFA gén szabályozása COUP-TFII által

Korábbi tanulmányok arról számoltak be, hogy a COUP-TFII fontos szerepet játszik az angiogenezisben, így megvizsgáltuk, hogy az angiogenezisben szerepet játszó génekhez köthető-e három sejt-típusban átfedő COUP-TFII kötőhely. Azt találtuk, hogy tizenegy olyan gén van (*ANG*, *ANGPTL4*, *CTSB*, *MDK*, *NRAS*, *PECAMI*, *PTAFR*, *PTGS1*, *TGFBR3*, *VEGFA* és *ZNF444*), amely angiogenezissel és három sejt-típusban átfedő COUP-TFII kötőhellyel asszociál. ChIP-Seq adatok alapján azt láthatjuk, hogy COUP-TFII kötőhelyek találhatóak a *VEGFA* gén promóterén és disztális szabályozó elemeinél MCF-7, HepG2 és K562 sejtekben. A három sejtben a COUP-TFII kötés mintázata eltérő, de számos olyan régiót is megfigyelhetünk ahol ezek a kötések átfednek egymással, illetve CTCF-el is. CTCF ChIA-PET adat mutatja a CTCF által határolt kromatin hurkokat. Ebből az adatból azt láthatjuk, hogy a *VEGFA* gén promóterétől +45, -69, -183 és -305 kilobázisra olyan COUP-TFII és CTCF kötött régiók vannak, melyek kromatin interakcióban vesznek részt a *VEGFA* promóterével legalább két sejtvonalonban.

MCF-7 sejtekben a COUP-TFII csendesítése után megvizsgáltuk a *VEGFA* gén expresszióját. A géncsendesítés hatására közel kétszeresére emelkedett a *VEGFA* gén expressziója. Mindez arra enged következtetni, hogy a COUP-TFII gátló hatással van a *VEGFA* gén kifejeződésére. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a COUP-TFII védi a sejteket a rosszabb prognózisú daganatos fenotípus ellen.

4.9. COUP-TFII expressziójának hatása különböző daganatos betegek túlélésére

Előzőekben leírtuk, hogy a COUP-TFII magas szintje jobb túléléssel korrelál ER-pozitív emlődaganatos betegekben. Ennek kapcsán megvizsgáltuk, hogy a májdaganatban és leukémiában szenvedő betegek túlélését hogyan befolyásolja a COUP-TFII expressziója. KMplotter adatbázist használva leukémiára vonatkozólag nincsenek adatok, viszont májdaganatra és egyéb daganattípusra (tüdődaganat, gyomordaganat és petefészekdaganat) találhatunk adatokat. Ezen adatokból azt láthatjuk, hogy májdaganatban, tüdődaganatban, petefészekdaganatban és gyomordaganatban is ugyanazt tapasztalhatjuk, mint az emlődaganat esetén, még pedig, hogy a COUP-TFII magas expressziója szignifikánsan jobb betegségmentes túléléssel korrelál, mint a COUP-TFII alacsony expressziója.

5. MEGBESZÉLÉS

A COUP-TFII a szteroid/tiroid magreceptor család tagja, mely fontos szerepet játszik különböző fejlődési folyamatokban. Számos tanulmány beszámolt arról, hogy szerepet játszik daganatos folyamatokban, azonban a COUP-TFII mediált transzkripciós szabályozásról teljes genom szinten keveset tudunk daganatsejtekben.

Technológiák fejlődésének köszönhetően, melyekkel teljes genom szinten vizsgálhatjuk meg a kötőhelyeket és a génexpressziót, hozzájárulnak a magreceptorok molekuláris mechanizmusának jobb megértéséhez. Ilyen technológiai fejlődések egyike a kromatin immunprecipitációt követő szekvenálás (ChIP-Seq), amely manapságban széles körben elterjedt módszerek egyike transzkripciós faktorok és kromatin módosítások tanulmányozásához. Munkánk során olyan fág alapú rendszert hoztunk létre, mely kontrollként használható ChIP folyamata során az ER α antitest specifikusságának nyomkövetéséhez. A fág külső burka az ER α antitest epitópját fejezi ki, míg a belsejében

lévő egyszálú DNS lehetővé teszi a PCR reakcióban való detektálhatóságát. Ehhez fág bemutatással poliklonális ER α epitópot kifejező fágot termeltünk, majd egy több körös szelekció után monoklonális egyedeket hoztunk létre. A monoklonális ER α epitópot kifejező fágokat ezután ChIP folyamata során teszteltük. Megvizsgáltuk az epitóp veszteségeket ChIP különböző lépéseiben, az ER α epitópot kifejező fág stabilitását és reprodukálhatóságát. Eredményeink egy könnyen kezelhető, reprodukálható kontrollrendszert kínálnak az antitest karakterizációjához a ChIP folyamata során.

Az ER α kulcsfontosságú magreceptor az emlődaganatban, mivel jelenléte jobb prognózissal korrelál, és fontos célpontja az endokrin terápiának. Mindezek ellenére a betegek gyakran rezisztenssé válnak erre kezelésre, ami a betegség kiújulásához vezet. Ezen események megértéséhez meg kell ismernünk az ER α általi szabályozási mechanizmusokat, melyhez hozzátartoznak az ER α koregulátorok működésének ismerete is. Ezek a koregulátorok olyan fehérjék, melyek hídképzőként vagy segítőként működnek ahhoz, hogy egy olyan nagy transzkripciós komplexet képezzenek, melyek a célgének aktivitását fogják befolyásolni. Tanulmányunk során a COUP-TFII árva magreceptort, mint ER α koregulátort azonosítottuk. Emlődaganat eredetű MCF-7 és T47D sejtekből ER α és COUP-TFII ChIP-Seq adatok alapján azt találtuk, hogy a COUP-TFII közel 90%-a mutat átfedést ER α kötőhelyekkel és a ChIP-Seq jelintézés is nagyobb a közös kötőhelyeknél, mint önmagukban ezeknél a faktoroknál. Továbbá a közös kötőhelyek aktív enhanszerre specifikus hiszton módosításokkal (H3K27ac és H3K4me1) korrelálnak. a COUP-TFII része egy olyan transzkripcionálisan aktív komplexnek, ahol az ER α mellett FOXA1 és GATA3 is jelen van. Mindez arra enged következtetni, hogy a COUP-TFII az ER α -val transzkripcionálisan aktív helyekhez kötődik. Választ keresve arra kérdésre, hogy milyen gének kifejeződését befolyásolja a COUP-TFII, COUP-TFII csendesített ER-pozitív emlődaganat sejtekben vizsgáltuk meg a transzkriptom változását. Eredményeink azt mutatják, hogy a csendesítést

követően főként olyan gének szabályozódtak felül, amelyeknek endokrin rezisztenciában van szerepük, és ugyanakkor ezeknek a géneknek az expressziója emelkedett E2 kezelés hatására is. Követzőekben azt vizsgáltuk meg, hogy a COUP-TFII expressziója hogyan változik emlődaganatos betegekben. Azt találtuk, hogy a COUP-TFII expressziója ER α -pozitív emlődaganatos betegekben magasabb, mint az ER-negatív betegekben. Túlélési arány vizsgálata során ER-pozitív betegeket tovább csoportosítva luminális A és B alcsoportra, azt találtuk, hogy a HER2-negatív luminális A csoportban a magasabb COUP-TFII expressziós szint jobb túléléssel korrelál, mint az alacsony COUP-TFII expressziós szint.

A következőkben további daganatsejtekben vizsgáltuk meg a COUP-TFII cisztrómját publikusan elérhető ChIP-Seq adatok alapján. Azt találtuk, hogy a COUP-TFII sejt-típus specifikus kötőhely eloszlást mutat a genomban, csak kevés hányada fed át a három sejt között. A három sejt-típus között átfedő COUP-TFII mellett CTCF kötődést figyelhetünk meg főként aktív promóter régióban. Közvetlen interakcióról a COUP-TFII és CTCF között még nem számoltak be, de vannak olyan eredmények, melyek utalnak arra, hogy jelen lehetnek egy komplexben. A sejt-típus specifikus COUP-TFII pedig az adott sejtre jellemző mester transzkripciós faktor közel felével mutat átfedést, és ezek a helyek aktív enhanszerrel specifikus hiszton módosításokkal (H3K27ac és H3K4me1) korrelálnak. Ugyanakkor nemcsak a mi tanulmányunkban figyelhető meg, hogy a COUP-TFII a mester transzkripciós faktorról képes együttkötődni. Rada-Iglesias és munkatársai azt találták, hogy ganglionléc sejtek fő regulátora, az AP2 α (TFAP2A) mellett aktív enhanszereken a COUP-TFII is jelen van, egy másik tanulmányban pedig a szív fejlődésében kulcs szerepet játszó TBX5 fehérje mellett a COUP-TFII is fontos szerepet játszik kardio-specifikus gének szabályozásában. Eredményeink azt is mutatják, hogy a COUP-TFII a mester transzkripciós faktorokkal aktív enhanszer régiókkal fednek, ezek a régiók pedig sejt-típus specifikus szabályozás meghatározó elemei. Összességében azt mondhatjuk, hogy ezekkel az eredményekkel egy új szerepét

mutatjuk be a COUP-TFII magreceptornak, ami a sejt-típus specifikus szabályozásban való jelenlétét jelenti.

Mivel számos tanulmány beszámolt arról, hogy a COUP-TFII magreceptornak szerepe van az angiogenezisben, így megvizsgáltuk, hogy az angiogenezisben szerepet játszó gének közelében megfigyelhetünk-e sejt típustól független COUP-TFII kötőhelyet. Tizenegy olyan angiogenezishez kapcsolódó gént találtunk, amelyhez három sejt-típusban átfedő COUP-TFII kötőhely köthető. Közelebről megvizsgálva ezt a gént azt találtuk, hogy a három különböző eredetű sejt mindegyikében COUP-TFII és CTCF kötött promóter és távoli enhanszer régiók láthatók H3K4me3 hiszton módosítás jelenlétében, amelyek kromatin hurkokba foglaltak. Annak érdekében, hogy kiderítsük, milyen módon befolyásolja a COUP-TFII a *VEGFA* gént, COUP-TFII csendesített MCF-7 sejtekben vizsgáltuk meg a *VEGFA* kifejeződését. Azt találtuk, hogy a *VEGFA* gén kifejeződése megnőtt a COUP-TFII csendesített sejtekben, ami arra utal, hogy a COUP-TFII gátló hatással van a *VEGFA* expressziójára. Mindez azt sugallja, hogy a COUP-TFII magreceptornak tumor ellenes szerepe van.

Emlődaganaton kívül egyéb olyan daganattípusokban, mint májdaganatban, tüdődaganatban, petefészekdaganatban és gyomordaganatban is megvizsgáltuk a COUP-TFII expressziójának hatását a betegek betegségmentes túlélésére (DFS) vonatkozólag. Minden esetben azt találtuk, hogy a COUP-TFII magas expressziója jobb túléléssel korrelál, mint az alacsony COUP-TFII expresszió. Összességében ezek az eredmények tovább erősítik a COUP-TFII jelenlétének jótékony hatását tumoros sejtekben, betegekben és akár fontos terápiás célpontként is szolgálhat a daganatos megbetegedések kezelésében.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A magreceptorok, mint ligand-aktivált transzkripciós faktorok közvetlen hatást gyakorolnak a gének kifejeződésére. A gének kifejeződésében létrejövő változások a daganatos betegségek egyik jellemvonása. Genomszintű vizsgálatokkal lehetővé válik a magreceptorok általi transzkripciós program tanulmányozása, mely által közelebb kerülhetünk a betegség megértéséhez. A magreceptorok általi szabályozások vizsgálatához használt legelterjedtebb módszer, a kromatin immunprecipitáció (ChIP). Kutatásunk során létrehoztunk egy olyan fágbemutatáson alapuló kontroll rendszert az ösztrogén receptor alfa ($ER\alpha$) antitest példáján keresztül, mellyel ChIP antitestek karakterizációja válik lehetővé ChIP-qPCR kísérletekben. Az $ER\alpha$ kulcsfontosságú magreceptor az emlőrák kezelésében és kimenetelében. Munkánk során a COUP-TFII árva magreceptor szerepét vizsgáltuk meg ER-pozitív emlődaganatos sejtekben és betegekben funkcionális genomikai módszerek alkalmazásával. Eredményeink azt mutatják, hogy a COUP-TFII, mint koregulátor jelen van az $ER\alpha$ -mediált transzkripciós komplexben, és hatással van $ER\alpha$ célgének kifejeződésére. Továbbá a COUP-TFII magas expressziós szintje jobb túléléssel korrelál ER-pozitív lúminális A fenotípussal rendelkező betegekben. A COUP-TFII cisztrómját egyéb daganatsejtekben is megvizsgálva, azt találtuk, hogy a COUP-TFII az adott sejt-típusra jellemző mester transzkripciós faktoral kolokalizálódik. Különböző eredetű sejtekben közös COUP-TFII kötőhelyeket azonosítottunk a *VEGFA* gén szabályozó régióiban. Emlődaganat sejtekben a COUP-TFII gátló hatással van ennek az angiogenikus génnek a kifejeződésére. Különböző daganatos betegek túlélésének vizsgálata során azt találtuk, hogy a COUP-TFII magas expressziós szintje jobb túléléssel korrelál. Összességében elmondhatjuk, hogy a COUP-TFII magreceptor jelenlétének tumorszupresszor hatása mester transzkripciós faktorok mellett különböző daganatos betegségekben.



Nyilvántartási szám: DEENK/90/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Erdős Edina
Neptun kód: S6ZPAR
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10037512

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Erdős, E.**, Bálint, B. L.: NR2F2 Orphan Nuclear Receptor is Involved in Estrogen Receptor Alpha-Mediated Transcriptional Regulation in Luminal-A Breast Cancer Cells.
Int. J. Mol. Sci. "Accepted by Publisher", 2020.
IF: 4.183 (2018)
2. **Erdős, E.**, Bálint, B. L.: COUP-TFII is a modulator of cell-type-specific genetic programs based on genomic localization maps.
J. Biotechnol. 301, 11-17, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.05.305>
IF: 3.163 (2018)
3. Keresztessy, Z.*, **Erdős, E.***, Ozgyin, L., Kádas, J., Horváth, J., Zahuczky, G., Bálint, B. L.:
Development of an antibody control system using phage display.
J. Biotechnol. 300, 63-69, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.05.009>
* These authors contributed equally this work.
IF: 3.163 (2018)





További közlemények

4. Patten, D. K., Corleone, G., Györfly, B., Perone, Y., Slaven, N., Barozzi, I., **Erdős, E.**, Saiakhova, A., Goddard, K., Vingiani, A., Shousha, S., Pongor, L. S., Hadjiminias, D. J., Schiavon, G., Barry, P., Palmieri, C., Coombes, R. C., Scacheri, P., Pruneri, G., Magnani, L.: Enhancer mapping uncovers phenotypic heterogeneity and evolution in patients with luminal breast cancer.
Nat. Med. 24 (9), 1469-1480, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-018-0091-x>
IF: 30.641
5. 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
6. Bojcsuk, D., **Erdős, E.**, Bálint, B. L.: Az ösztrogénreceptor működése a legújabb genomikai kutatások tükrében.
LAM KID. 4 (2), 79-84, 2014.
7. **Erdős, E.**, Bálint, B. L.: Miért különböznek az ikerpárok?: az ikerkutatásról.
LAM KID. 2 (3), 33-38, 2012.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 43,731

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,509

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, 2020.03.10.

