

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Jelölt szabályozó elemek szerepének vizsgálata
embrionális őssejtekben és makrofágokban kvantitatív
és kvalitatív módszerekkel**

Horváth Attila

Témavezető: Prof. Dr. Nagy László, MD, PhD, DSc, MHAS

Társtémavezető: Dr. Nagy Benedek, PhD



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

Debrecen, 2019

Jelölt szabályozó elemek szerepének vizsgálata embrionális őssejtekben és makrofágokban kvantitatív és kvalitatív módszerekkel

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

Írta: **Horváth Attila** okleveles programtervező informatikus

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

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

Társtémavezető: Dr. Nagy Benedek, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, az MTA rendes tagja

tagok: Prof. Dr. Boros Imre, az MTA doktora

Dr. Nagy István, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Biokémia és
Molekuláris Biológiai Intézet Tárgyalója, 2017. május 23. 12:00 óra

Az értekezés bírálói: Prof. Dariusz Plewczyński, DSc
Dr. Penyige András, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, az MTA rendes tagja

tagok: Prof. Dariusz Plewczyński, DSc

Dr. Penyige András, PhD

Prof. Dr. Boros Imre, az MTA doktora

Dr. Szántó Magdolna, PhD

Az értekezés védésének helye és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület
tantermében, 2019. május 16. 13:00 óra

1. BEVEZETÉS

A sejtek az élet szerkezeti és funkcionális építőkövei. Az emberi test sok milliárd sejtből épül fel, amelyek kb. 200 különböző sejttypusba sorolhatóak bizonyos alaki és/vagy funkcionális jellemzők alapján. Mindössze néhány - bár jelentős - kivételtől eltekintve a genomi DNS bázisszrendje az adott élőlény minden diploid sejtjében azonos. Habár a DNS az adott élőlény minden sejttypus létrejöttéhez tartalmazza a szükséges információt, a differenciálódó sejt sorsa erősen függ a környezeti szignáloktól is. Az így kifejeződő egyedi génexpressziós mintázat határozza meg az érett sejt működését. A „posztgenomikus” korszak két nagyon izgalmas kutatási területe, hogy melyek a genomi meghatározói ennek az egyedi génexpressziós profilnak, illetve mi azok szerepe a különböző külső szignálokra adott sejtválaszok kialakulásában. A sejttypus-specifikus génexpressziós profil kialakulása számos szabályozási folyamat összessége, beleértve a transzkripció iniciációt, elongációt, valamint a transzkriptek érési folyamatát és degradációját.

Transzkripció szabályozása eukariótákban

A transzkripció folyamata során a DNS szekvenciában tárolt genetikai információ egy újonnan létrejövő RNS molekula formájában kerül átmásolásra. Ellentétben a prokariótákkal, az eukariótákban nem csak egy, hanem három RNS polimeráz található (Pol I, Pol II és Pol III), amelyek különböző típusú RNS molekulákat hoznak létre. A Pol I írja át a riboszómális RNS-eket (rRNS), a Pol III szintetizálja a transzfer RNS-eket (tRNS), rövid RNS-eket, 5S riboszómális RNS-eket (rRNS) és számos hosszú nem kódoló RNS-t (lncRNS) is. A Pol II írja át a hírvivő RNS-eket (mRNS), kis magi RNS-eket (snRNS) és a mikroRNS (miRNS) prekurzorokat. A transzkripció elindításához kulcsfontosságú, hogy a Pol II és más fehérjék által együttesen alkotott ún. iniciációs komplex egy a géntest kezdő pozíciójához képest jól meghatározott genomi pozícióban keletkezzen.

Promóternek nevezzük azt a minimális DNS régiót, amely elégséges feltétel az RNS polimeráz által végzett transzkripció elindításához. Az egyik leggyakoribb promóterelem az ún. TATA box, amely kb. 25 bázispárral előzi meg a fehérje-kódoló (vagy egy egyéb, nem fehérjét kódoló, hanem pl. lncRNS) génszakaszt, emellett ismert még az Inc („initiator”), amely a transzkripció kezdőpozíciója utáni nukleotidnál található, valamint az ún. DPE elem („downstream promoter element”) amely kb. 30 bázispárral követi azt a kódoló régióban. Ezek

a DNS régiók kötőhelyekként szolgálnak az iniciációs komplexnek, amely útjára indítja majd az RNS polimerázt.

A többsejtű élőlényekben a szövet-specifikus génexpressziós változékonyságot távoli genomi szabályozó régiók biztosítják. Ezek az ún. enhanszer régiók döntő fontosságúak a kapcsolódó gén transzkripciója időzítésének és sebességének szabályozásában.

Az enhanszer koncepció

Az enhanszerek rövid DNS elemek, amelyek ún. transzkripciós faktorokkal (TF) kötődve képesek fokozni valamely gén expresszióját, annak promóteréhez kapcsolódva. Egy enhanszer több gént is szabályozhat és egy génnek több enhanszere is lehet. Kimutatták, hogy egyes gének promóterei más gének enhanszereként is funkcionálhatnak. Ellentétben a promóterekkel, az enhanszerek távolságtól és irányultságtól függetlenül is képesek betölteni a szerepüket, azaz nem feltétlenül kell a transzkripció kezdőpozíciójához közeli DNS szakaszon lenniük.

Egy adott sejttípusban, adott időpontban jellemzően több tízezer enhanszer régió vesz részt génexpressziós szabályozásban. Az enhanszerek génexpressziós rugalmasságot biztosítanak a rendszernek azáltal, hogy különböző transzkripciós szabályozó fehérjéket kötnek, amelyek esetleg csak bizonyos körülmények között, például bizonyos külső stimulus hatására jelennek meg a sejtben. Az enhanszerek génexpressziós szabályozó funkciójukat a szabályozott gén promóterének iniciációs komplexéhez történő kapcsolódással fejtik ki. Ez az úgynevezett promóter-enhanszer hurkolódás elméletileg bármilyen távolságból megtörténhet, azonban a kromatin térbeli szerveződése (pl. topológiai asszociált domének, TAD-ok jelenléte) szűkíti a lehetséges interakciók számát. Továbbá kimutatták, hogy az enhanszer régiók a transzkripciós folyamat (ciklus) több lépését, például az RNS polimeráz (RNAPII) kapcsolódását, a promóter-közeli ún. polimeráz „pause” feloldását és a transzkripciós elongációt is szabályozhatják. Az enhanszerek azonosítása és karakterizálása kritikus szerepet tölt be a sejttípusra jellemző funkciók betöltésében játszott szerepük tisztázásában.

Enhanszer régiók azonosítása

Egy adott gén enhanszereinek azonosítása több okból is kihívások elé állít bennünket. Egyrészt az enhanszerek igen nagy (akár 1 Mb) távolságra is elhelyezkedhetnek a szabályozott gén transzkripciós kezdőpozíciójától mind 5', mind 3' irányban. Továbbá több tanulmány igazolta, hogy nem csupán az intergenikus régiók, de a gének intronjai és exonjai is

tartalmazhatnak enhanszer elemeket. Meglepő módon a gének promóterei távoli szabályozó elemekként is szolgálhatnak más gének számára. Egy gén gyakran több enhanszer régióval áll kapcsolatban, és egy enhanszer több gént is szabályozhat. Végül a promóterekkel ellentétben az enhanszerek esetében még nem azonosítottak általános szekvencia kódot, amely segíthetné az *in silico* módszerekkel történő predikciót. Az enhanszer predikcióhoz széles körben használt módszer a hiszton módosítások és egyéb epigenetikai markerek térképezése nagy áteresztőképességű szekvenálás-alapú technikák, például kromatin immunprecipitáció (ChIP-seq) segítségével.

Hisztonmódosítások

Az eukarióták sejtmagjaiban a DNS hiszton fehérjék segítségével tömörödve, részben ún. nukleosómák formájában van jelen. Öt különböző hisztont különböztethetünk meg: a H1 hiszton (ún. linker hiszton), amely a magasabb rendű kromatin struktúrák létrehozásában játszik szerepet, illetve a H2A, H2B, H3 és H4 hisztonok (core, azaz mag hisztonok), amelyek az ún. hiszton oktamert alkotják. A nukleosómák a mag hisztonokból és a körük teleredő DNS-ből épülnek fel. A humán sejtek egyenként körülbelül 2 méter hosszúságú DNS-t tartalmaznak, amely az előbb leírt kondenzált formában körülbelül 90 nm-re rövidül.

A hisztonfehérjék különböző poszttranszlációs módosításokat hordozhatnak (hiszton módosítások), amelyek a génexpresszió szabályozásában vesznek részt azért, hogy elérhetővé teszik a DNS-t a transzkripció számára. A mag hisztonok közül a H3 hiszton az egyik leggyakrabban módosuló fehérje. A H3 módosításai lehetővé teszik az eukromatikus és heterokromatikus régiók, illetve a különböző típusú szabályozó elemek megkülönböztetését. A H3 hiszton 4. pozíciójában lévő lizin trimetilációja (H3K4me3) az aktív transzkripciós gének kezdőpozíciói körül dúsul. Az aktívan átíródó géntesten ezzel szemben 36-os lizinen trimetilált H3 hisztonok (H3K36me3) jellemzőek. A H3 4. pozícióban lévő lizinének monometilációja (H3K4me1) főként enhanszer elemeken dúsul fel, bár jelenlétét promóter elemeken is kimutatták. A H3K4me1 enhanszer elemeken jellemzően pioneer transzkripciós faktorokkal kolokalizálódik, és jelenléte független a transzkripciós aktivitástól, így általános enhanszer jelzőként szolgál. Végül a 27. pozícióban elhelyezkedő lizin acetilációja (H3K27ac) mind promóter, mind enhanszer régiókon megjelenik, és aktív transzkripcióra utal.

A enhanszerek lehetséges állapotainak osztályozása epigentikai jellemzők alapján

A makrofág biológiában a PU.1 és a H3K4me1/2 kolokalizálódó régiókat enhanszer-szerű régióknak tekintjük, míg a H3K27ac-státusz a poised („készenléti”) és az aktív enhancerek közötti különbségtételre szolgál. Ez az osztályozás felfedte az ún. látens vagy más néven *de novo* enhanszerek létezését, amelyek stimulus előtt sem PU.1-t nem kötnek, sem H3K4me1/2-t nem hordoznak, ám stimulust követően, szignálfüggő transzkripció faktorok (SDTF-ek) hatására aktiválódnak. Azonban a korábbi tanulmányok nem vizsgálták a kromatin nyitottság szerepét, amely jobb mechanisztikus betekintést nyújthat az enhanszerek kialakulásának különböző állomásaiba.

2. A DOLGOZAT CÉLKITŰZÉSEI

Célkitűzés 1. A kulcs makrofág transzkripció faktorok hozzájárulásának meghatározása a kromatin nyitottsághoz és enhanszer aktivációhoz a nyugvó és a polarizált egér makrofágokban.

- Meghatározzuk a kulcs makrofág TF-ok (PU.1, IRF8, JUNB, RUNX1 és CEPBA) kötőhelyeit és megvizsgáljuk a közöttük fennálló összefüggéseket.
- A Random Forest és Support Vector Regressor gépi tanuló eljárások segítségével osztályozó modelleket építünk, amik alapján kiértékeljük, hogyan járul hozzá a kulcs TF-ok kötési mintázata a kromatin nyitottsághoz és enhanszerek aktivációhoz.
- Minden egyes vizsgált kulcs makrofág TF esetében felosztjuk a kötőhelyeket alacsony és magas nyitottságú csoportokra, valamint funkcióvesztéses/-nyeréses kísérletek segítségével megvizsgáljuk az alacsony nyitottságú csoportok génexpresszió szabályzásban betöltött szerepét mind a nyugvó makrofágban mind külső stimulusok kontextusában
- Megvizsgáljuk, vajon léteznek-e olyan egyedi TF modulok, amelyek tagjai együtt kötnek alacsony nyitottságú régiókat, és makrofág polarizációban résztvevő génexpressziós programokat szabályoznak.
- A már ismert és az újonnan azonosított enhanszertípusok és a köztük előforduló állapotátmenetek leírására automataelméleti eszközökkel formális modellt konstruálunk.

Célkitűzés 2. AZ OCT4 szerepének vizsgálata az RA-indukált neurogenesis korai szakaszában.

- Az OCT4 genomi kötőhelyeinek feltérképezése és a kromatin nyitottsággal való viszonyának vizsgálata naiv és alapállapotú embrionális őssejtekben
- Az alacsony nyitottságú OCT4 kötőhelyek és a (neuronális differenciáció korai szakaszában kritikus szerepet játszó) retinsav (RA) szignalizációs útvonal kölcsönhatásának jellemzése
- Az OCT4 determinisztikus szerepének vizsgálata a differenciációhoz kapcsolódó enhanszerképződés és retinsav target gének szabályozása során funkcióvesztéses kísérletek segítségével
- Az OCT4 kettős szerepének - pluripotens állapot fenntartása és RA-indukált neurogenesis korai szakaszának szabályozása - leírása összetett hálózat létrehozásával, hálózati motívumok segítségével.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Csontvelői makrofágok differenciáltatása

Vadtípusú C57Bl/6J hím egerek combcsontjából kimostuk a csontvelőt, Ficoll-Plaques grádiens (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL) segítségével izoláltuk a sejteket. Az izolált sejteket 20% endotoxin-csökkentett főtájs borjú szérummal (FBS) és 30% L929-kondicionált médiummal kiegészített DMEM médiumban tenyésztettük 5 napig. Az izolált csontvelő-eredetű sejteket 6 napig differenciáltattuk L929 felülúszó jelenlétében. A differenciáció hatodik napján a sejtek IL-4 (20 ng/ml) és LPS (100 ng/ml) kezelést kaptak az Eredmények részben jelzett ideig.

Embrionális őssejtek tenyésztése

Egér E14 embrionális őssejteket primer egér embrionális fibroblaszt feeder sejteken (PMEF) tenyésztettünk (5% CO₂, 37°C). Az embrionális őssejtek tenyésztéséhez szükséges médium a következő összetevőket tartalmazta: DMEM Glutamax (Gibco), 15% FBS (Hyclone), 1000 U leukémia inhibíciós faktor (LIF), penicillin/streptomycin, nemesszenciális aminosavak és 2-merkaptoetanol. A '2i' embrionális őssejteket legalább öt passzáson keresztül növesztettük a következő médiumban: szérumentes N2B27-alapú médium LIF, PD0326901 (1 mM) és CHIR99021 (3 mM) hozzáadásával.

Ligandok és kezelés

Az embrionális őssejteket oldószer kontrollal (DMSO) vagy all-trans-retinsavval (Sigma, 1 mM DMSO-ban, 1/1000 hígítás) kezeltük.

siRNS-alapú géncsendesítés

Az OCT4 és kontroll siRNS-eket a Thermo Fisher cégtől szereztük be. Az Egér E14 sejteket zselatinozott tenyésztőedénybe helyeztük 12 órával a transzfekciót megelőzően, majd az siRNS-eket lipofektaminnal (Lipofectamine 3000, Invitrogen) transzfektáltuk. Az siRNS oligók szekvenciái a következők: siOCT4_A_Fw: 5'-AUG CUA GUU CGC UUU CUC UUC CGG G-3', 5'- CCCGGAAGAGAAAGCGAACUAGCAU-3', siOCT4_A_Rev: 5'-CCC GGA AGA GAA AGC GAA CUA GCA U-3', siOCT4_B_Fw: 5'-ACC UUC UCC AAC UUC ACG GCA UUG G-3', siOCT4_B_Rev: 5'-CCAAUGCCGUGAAGUUGGAGAAGGU-3'. A transzfektált sejteket embrionális őssejt médiumban tenyésztettük 24 óráig a további kísérletek előtt. A sejteket 3-24 órán keresztül kezeltük különböző ligandokkal eRNS és mRNS kísérletekhez való felvétel előtt (azaz a transzfekciót követően 24+3 vagy 24+24 órával). A CHIP kísérleteket hasonlóképpen 24 órával transzfekciót követően, illetve ligandkezelés esetén maximum 48 órával transzfekciót követően végeztük el.

Micorarray elemzés

A kontroll, Nanog RNAi és OCT4 RNAi GSE4189 microarray kísérletekből származó CEL fájlokat az NCBI/GEO adatbázisból töltöttük le, majd importáltuk a GeneSpring (v13.0) szoftverbe. A Gene Level Experimentet (génszintű kísérletet) a következő paraméterekkel futtattuk: nyers jelekre alkalmazott küszöbérték: 1.0, kvantilis normalizáló algoritmus, mediánnormalizációt alkalmazva (GSM94856-GSM94860), a replikákat átlagoltuk a kondíciók mentén. A heatmap-eken előreválogatott retinsav célgéneket és az útvonalak komponenseit ábrázoltuk.

RT-qPCR

Az RNS-t Trizol reagenssel (Ambion) izoláltuk. Az RNS-t a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) segítségével írtuk át cDNS-sé a gyártó által megadott protokoll alapján. A transzkript kvantifikációt qPCR-al végeztük SYBR green master mix (BioRad) segítségével. A transzkript szinteket a *Ppia* génre normalizáltuk.

ChIP-seq

A ChIP kísérleteket apróbb módosításokkal korábban leírt protokollok alapján végeztük (Barish et al., 2010; Daniel et al., 2014b; Siersbaek et al., 2012). Az immunoprecipitációhoz a következő antitesteket használtuk: OCT4 (sc-8628), PU.1 (sc-352), IRF8 (sc-6058x), JUNB (sc-46x), CEBPA (sc-61x), RUNX1 (sc-8563x), STAT6 (sc-981x), p65 (sc-372), H4ac (millipore 06-866), H3K4me1 (ab8895), H3K27ac (ab4729), IgG (Millipore, 12-370), OCT4 (Santa Cruz, sc-8628), RXR (Santa Cruz, sc-774), RAR (Santa Cruz, sc-773), P300 (Santa Cruz, sc-585), H3K27me3 (Millipore, 07-449) és RNAPII-pS2 (ab5095). A szekvenálási könyvtárakat az Ovation Ultralow Library Systems (Nugen) segítségével, a forgalmazó ajánlásai alapján végeztük két biológiai replikából.

Western blot

20 µg teljes sejt lizátumot vagy magi extraktumot futtattunk 10 vagy 12,5%-os poliakrilamid gélen, majd transzferáltuk a következő membránra: Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore Crp., Billerica, Massachusetts). A membránokat anti-Oct3/4 (Santa Cruz; sc-5278), anti-RAR (Santa Cruz, sc-773), vagy anti-GAPDH (Santa Cruz, sc-32233) antitestek segítségével hívtuk elő a gyártó ajánlásai alapján.

GRO-seq

A Global Run-On szekvenálást és könyvtárkészítést egy korábban leírt módszert követve végeztük el (Core, Waterfall, & Lis, 2008). A könyvtárakat két BMDM biológiai replikából készítettük, majd Illumina HiScanSQ szekvenátoron szekvenáltuk meg.

ChIP-seq, GRO-seq and ATAC-seq analízisek

A ChIP-seq, GRO-seq és ATAC-seq minták elsődleges analízisét a (Barta, 2011) által publikált pipeline használatával végeztük el. Röviden a Burrows-Wheeler Alignment Tool (BWA) nevű szoftvert használatával illesztettünk az mm10 referenciagenomra (GRCm38) alapértelmezett paraméterekkel. A TF kötőhelyeket MACS2 2.0.10 programmal prediktáltuk (q -érték $< 0,01$), míg a hisztonmódosítások feldúsulását a findPeaks.pl programmal analizáltuk ('-style histone'). A potenciális műtermékeket az ENCODE által készített gyűjtemény alapján szűrtük ki. Távoli régióknak az intronikus és intergenikus régiókat tekintettük a HOMER annotáció alapján. Az RPKM (Reads per kilobase per million mapped reads) értékeket a coverageBed (BedTools) nevű programmal és saját szkriptekkel számítottuk ki. A differenciáltan változó STAT6 (kontroll és 1 óra IL-4 kezelt) és p65 (kontroll és 1 óra LPS

kezelt) régiókat az RNAPII-pS2 szignál alapján határoztuk meg duplikák alapján (p -érték $< 0,05$ és $FC > 2$) mind a távoli régiókon (és normalized DiffBind érték > 30), mind a génszakaszokon (normalizált DiffBind érték > 50) a nyugvó rendszerhez viszonyítva. A génszakaszok és a távoli régiók klaszterezésére K-közép módszert alkalmaztunk a stats R csomagból származó *kmeans* függvénnyel. A GO analízist a clusterProfiler nevű R csomaggal végeztük. A régiókkal végzett halmazművelete (metszet, különbség, összefűzés) Bedtools-szal (v2.23.0) végeztük. Két régiót átfedőnek tekintettünk, ha legalább egy nukleotidban átfedtek. A konszenzushalmazt azon régiók alkotják, amelyek legalább két mintában megtalálhatóak.

A proporcionális („aránytartó”) Venn-diagramokat a VennMaster nevű programmal generáltuk. A lefedettségi fájlokat („bedgráfok”) a makeUCSCfile.pl és az igvtools toTDF használatával tdf fájlokat generáltunk belőlük. A genomi eloszlási adatokat a HOMER kategóriái alapján gyűjtöttük össze (az UTR régiókat egyben kezeltük). A *de novo* motívum elemzéseket a HOMER findMotifsGenome.pl programmal végeztük a régiók csúcspontjai körül (+-150bp, ‘-length -len ‘12,14,16,18,20,22’ and ‘-size 200) a (repeat régiókra szűrt) házi egér (mm10) genomon.

A genomi lókusztokat IGV-ben (Integrative Genomics Viewer - IGV2.3, Broad Institute) vizualizáltuk. A metahisztogramokhoz és az RD plotokhoz használt normalizált értékeket a HOMER annotatePeaks.pl nevű programmal generáltuk (‘-ghist’ and ‘-hist 25’) és egy reprezentatív mintát felhasználva szemléltettük R-ben vagy Java TreeView-ban. A motívummátrixokat az annotatePeaks.pl ‘-mscore’ opcióval számoltuk ki, visszaillesztve a genomra a talált motívumokat. A régiók lehetséges csúcspontjai közül a legmagasabb MACS pontszámmal rendelkezőt választottuk ki és használtuk fel az RD plotok készítéséhez.

Gépi tanulás

A gépi tanuló módszereken alapuló analíziseket R-ben végeztük a randomForest és az e1071 nevű csomag és egyéb saját készítésű szkriptek felhasználásával. A tanuló halmaz 2 000 véletlenszerűen választott alacsony és magas nyitottságú régióból került ki. A „rátanulás” kockázatát 10-es keresztvalidációval csökkentettük. Összesen 31 modellt teszteltünk Random Forest módszerrel: csak egy TF, $n=5$; 2 TF, $n=10$; három TF, $n=10$; 4 TF, $n=5$; mind az 5 TF, $n=1$. Validációhoz egy független 2 000 véletlenszerűen választott alacsony és magas nyitottságú régiót használtunk, amelyek egyike sem szerepelt a tanuló halmazokban. A hozzájárulás mértékét a MeanDecreaseGini érték szolgáltatta, amelyet a randomForest

függvénnyel számítottuk ki (importance = T). Az Érzékenység, Specificitás és a ROC értékeket a caret és ROCR R csomagok felhasználásával számítottuk ki. A 31 felépített modellt boxplot és ROX ábráit a ggplot2 R csomaggal készítettük. Az SVM modellhez Pearson korrelációs együtthatót ugyancsak egy független validációs halmazon határoztuk meg a stats R csomag felhasználásával.

4. EREDMÉNYEK

A Random Forest módszerrel elvégzett analízis alapján a PU.1 jelentős részben alacsony nyitottságú genomi régiókat köt

A Random Forest gépi tanuló módszerrel szisztematikusan megvizsgáltuk a kulcs transzkripció faktorok (TF-ek) összes lehetséges kombinációját és megmértük a felépített modellek kromatin nyitottságra vonatkozó jóslási pontosságát. Abban a modellben, ahol csak a PU.1 kötési mintázatazt vettük figyelembe, nagyon gyenge jóslási pontosságot kaptunk (64.4%), amely csak éppen magasabb mint a véletlenszerű választás. Emellett az összes többi olyan modell, ahol csak egyetlen TF kötését vettük figyelembe, hasonlóan gyenge jóslási erővel rendelkezett, bár mindegyik magasabb volt az előbbi modelltől. Ezzel szemben, az ún. „teljes modell”, amelyben az összes TF kötési mintázata szerepelt, igen magas pontosságot mutatott egy független validációs halmazon is (Pontosság = 0,82, Érzékenység = 0,88, Specificitás = 0,77, AUC = 0,90 - ROC görbe alatti terület, ROC: Receiver Operating Characteristics – „vevő működési karakterisztika”). A Random Forest módszer azt is megmutatta, hogy a a teljes modellben a PU.1 kötésnek volt a legkisebb hozzájárulása a jóslás meghatározásához, amely felveti a lehetőséget, hogy a PU.1 alacsony nyitottságú vagy zárt kromatint is képes kötni.

Ezek alapján a PU.1 kötőhelyeket három különböző osztályba soroltuk: (1) PU.1 *jelölt szabályozó elemek* (46 280 régió), amelyek nem fednek át prediktált nyitott kromatin régióval, (2) PU.1 poz. nyitott régiók, melyek nyitott régiókban találhatóak (17 448 régió), valamint (3) PU.1 neg. nyitott régiók, amelyek ugyan nyitott régiók, de nem fednek át PU.1 kötési eseménnyel (18 967). Meglepő módon mindössze a PU.1 kötési események egyharmada helyezkedik el nyitott régióban.

Összességében elmondható, hogy a PU.1 kötési események kétharmada nem nyitott kromatin régióban helyezkedik el és transzkripciósan inaktív (*jelölt szabályozó elemek*).

Továbbá, mind a PU.1 *jelölt szabályozó elemek* vizsgálata, mind a ChromHMM szoftverrel elvégzett analízis felveti annak a lehetőségét, hogy több vizsgált TF (IRF8, RUNX1 és CEBPA) is rendelkezik ilyen genomi elemekkel, sőt akár együtt is köthetnek ilyen régiókat a genomban.

A kulcs makrofág szabályozó fehérjék rendelkeznek jelölt szabályozó elemekkel

Vizsgálatink megmutatták, hogy a *jelölt szabályozó elemek* igen gyakoriak a genomban, a vizsgált TF-ok között a PU.1 rendelkezik a legtöbb ilyen elemmel és köt a legtöbb esetben egyedül. A többi vizsgált TF (IRF8, CEBPA és RUNX1) *jelölt szabályozó elemei* sok esetben átfedtek a PU.1 ilyen régióival. Ezek közül a kombinációk közül a PU.1+IRF8 a gyakoribb, hiszen háromszor annyi található a genomban mint a második leggyakoribb kombinációnak, amely szintén tartalmazza ezt a két TF-t.

A PU.1 és az IRF8 által közösen kötött jelölt szabályozó elemek szerepe az IL-4-re adott sejtválaszban

Eredményeink azt mutatják, hogy a PU.1 és az IRF8 által közösen kötött *jelölt szabályozó elemek* aktív enhanszerré válhatnak IL-4 kezelés hatására. Ezen *jelölt szabályozó elemek* szükségességét az IL-4 célgének szabályozásában IRF8-hiányos és PUER sejtekben végzett kísérletekkel vizsgáltuk. Három ismert IL-4 célgén mRNA szintjét mértük meg PUER sejtekben, ahol alapállapotban a PU.1 transzkripciósan inaktív, de tamoxifen hozzáadásával bekapcsolható. Kísérleteink alapján elmondható, hogy a PU.1 aktiválása növelte az IL-4 célgének szintjét a nyugvó rendszerben és az aktivitása szükséges feltétele volt a hatékony IL-4 válasz meglétének. Az IRF8-hiányos sejtekben végzett kísérletek pedig megmutatták, hogy az IRF8 hiányában az IL-4 függő indukció gyengébb volt (Hbegf és Arg1), vagy teljesen elmaradt (Retnla).

Az IRF8 által kötött jelölt szabályozó elemek alacsony nyitottságának egy bizonyos része IRF8-függő

37%-a volt IRF8 pozitív a vad típusú sejtben azon régióknak, amelyek az IRF8-hiányos sejtekben nyitottabbá váltak, amely felveti annak a lehetőségét, hogy az IRF8 kötése megakadályozza ezen genomi régió nyitottá válását vagy közvetett kötéssel vagy valamely nem ismert nem-kanonikus elem kötésével, hiszen nem találtunk sem PU.1-IRF kompozit motívumot, sem ISRE elemet. Eredményeink alapján az IRF8 egy fontos kromatin szabályozó

TF-nak bizonyult és felveti a PU.1 és IRF8 által együtt kötött *jelölt szabályozó elemek* létezését, ahol az IRF8 kötése fenntartja az alacsony nyitottságot.

A jelölt szabályozó elemeket dinamikusan felhasználják a különböző makrofág polarizációs szignálok

A STAT6 és p65 kötőhelyeinek összevetése megmutatta, hogy 10 619 STAT6-specifikus, 8 466 p65-specifikus, valamint 3 781 olyan átfedő genomi régió létezik, amit mindkét polarizációs szignál használ. Mindkét TF kötőhelyei között hasonló számú *de novo, jelölt szabályozó elem* és magas nyitottságú régió található. Az átfedő régiók jelentős mértékben magas nyitottságú (2 720), 892 *jelölt*, valamint 169 *de novo* elemek voltak.

A p65 és STAT6 kötőhelyek motívumelemzése megmutatta, hogy: 1) a *de novo* és a jelölt szabályozó elemek esetében a PU.1 motívuma szinte minden esetben gyengébb volt mint a magas nyitottságú régiók esetében függetlenül attól, hogy p65-specifikus, STAT6-specifikus, vagy átfedő régió-e; 2) az NF- κ B motívumának p-értéke kisebb volt a p65-specifikus helyeken, és a *de novo* helyeken találtuk a legerősebb motívumokat. Az átfedő helyeken sokkal gyengébb, a STAT6-specifikus helyeken viszont szinte egyáltalán nem találtunk NF- κ B motívumot; 3) Analóg módon a STAT6 motívum specifikus volt a STAT6 által kötött helyekre és a legerősebb a *de novo* régióknál volt.

Mind a p65, mind a STAT6 által kötött régiók átfedtek a PU.1, a PU.1+IRF8, PU.1+IRF8+CEBPA+RUNX1 (összes TF) jelölt szabályozó elemekkel, habár a STAT6 nagyobb arányban. A p65 kötés gyakoribb volt az IRF8, RUNX1 és CEBPA jelölt szabályozó elemekkel, ami felveti a lehetőségét annak, hogy szignálfüggő TF-ok specifikusan kötnek bizonyos típusú jelölt szabályozó elemeket (függetlenül az adott régiót kötő TF-ok számától). Összességében elmondható, hogy a két polarizációs program szignálfüggő TF-jai kötnek jelölt szabályozó elemeket, azonban nem feltétlenül csak a több TF által kötött helyeket, hanem specifikus TF kombinációkat (modulokat).

Eredményeink megmutatták, hogy jelölt szabályozó elemeket is részt vesznek a két polarizációs program korai szakaszában. Ezután megvizsgáltuk, hogy a jelölt szabályozó elemek részt vesznek-e a két polarizációs program későbbi szakaszaiban is: IL-4-gyel és LPS-sel kezelt makrofágokban RNAPII-pS2 ChIP-seq kísérteket hajtottunk végre 1, 3, 6 és 24 óras időpontoknál.

6 356 olyan *jelölt szabályozó elemet* azonosítottunk, amelyet vagy az IL-4 vagy az LPS felregulált legalább egy időpontban a nyugalmi állapothoz képest (legalább kétszeres expressziós szint és $p\text{-érték} < 0,05$). Ezután nyolc különböző kinetikát mutató klaszterbe (EK-ek) soroltuk ezeket a régiókat: az EK1, EK2 és EK3 IL-4-specifikus, míg a többi (EK4-EK8) LPS-specifikusnak bizonyult. A kaszterek méretei alapján a *jelölt szabályozó elemek* minden modulban hasonló arányban vannak jelen.

Ezután összevetettük a több TF által kötött *jelölt szabályozó elemek* és a hozzájuk rendelt gének transzkripciós kinetikáját. A gének kiválasztására vonatkozó kritériumaink a következők voltak: 1) az adott génszakaszon (géntest - GT) a Pol II S2 legalább kétszeres expressziós szint növekedés legyen mérhető ($p\text{-érték} < 0,05$), 2) valamint a transzkripciós kezdőpozíciótól 100-kb távolságra legyen legalább egy EK régió. A GT-ket szintén nyolc klaszterbe osztottuk és azok hasonló transzkripciós kinetikát mutattak.

Vizsgálataink igazolták, hogy különböző makrofág polarizációs programokban a szignálfüggő TF-k kötik és aktiválják a *jelölt szabályozó elemeket*, illetve fontos szerepük van a retinsav indukált neuronális differenciáció kezdeti szakaszában is. Összességében elmondhatjuk, hogy embrionális őssejtekben és makrofágokban is jelentős számú *jelölt szabályozó elem* található. Ez az újonnan karakterizált enhanszertípus, amelynek fontos szerepe van a génexpressziós szabályzásban, kiterjeszti a korábban elfogadott modellt.

Az azonosított enhanszertípusok és a köztük előforduló lehetséges állapotátmenetek modellezése nemdeterminisztikus véges automatával

A feltárt enhanszerállapotok és a köztük meglévő állapotátmenetek formális leírásához egy nemdeterminisztikus véges automatát konstruáltunk. A mi esetünk, a Q állapothalmaz a kromatin lehetséges állapotait reprezentálja, amelyet három komponens határoz meg: TF Kötés („van kötés” vagy „nincs kötés”), Nyitottság („alacsony” vagy „magas” nyitottság) és az Aktivitás („lereregulált”, „inaktív” vagy „felregulált”). A megalkotott automata leírja a kulcs makrofág TF-ek (nyugvó rendszer) és a szignálfüggő TF-ek közötti interakciókat. A leírt paradigma más emlős modellrendszerekben is tesztelhető és tesztelendő.

Az OCT4 által kötött jelölt szabályozó elemek szerepe az retinsav-indukált neuronális differenciációban

Eddigi eredményeink alapján felmerült a kérdés, vajon más sejttípusokban is előfordulnak-e *jelölt szabályozó elemek*, illetve azok aktiválhatóak-e külső szignálok hatására. Mintegy 21

ezer OCT4 kötőhelyet azonosítottunk mind naív, mind alapállapotú embrionális őssejtekben. Összehasonlítva ezen régiókat DNase-seq kísérlettel jóslott nyitott kromatin régiókkal azt találtuk, hogy az OCT4 kötőhelyek 37%-a alacsony nyitottságú és nagyon hasonlóak a naív őssejtekben található alacsony nyitottságú régiókhoz.

Az alacsony nyitottságú OCT4 régiókhoz rendelhető gének útvonal-analízise alapján az alábbi útvonalak dúsultak fel: WNT/b-catenin, Axonal Guidance Signaling, Epithelial Adherens Junction Signaling, PTEN Signaling, Signaling by Rho Family GTPases és RAR signaling: olyan WNT/b-catenin célgének alapján mint a Wnt3 és T/Bra vagy a Hoxa1, Prmt8 és Cdx2, amelyek ismert RXR:RAR célgének.

Az OCT4 RNS alapú csendesítése megmutatta, hogy bizonyos retinsav célgének szintje jelentősen megemelkedett, míg a NANOG leütésének nem volt jelentős hatása ezekre a génekre. Ezek az eredmények megerősítik, hogy van egy OCT4-függő mechanizmus, amely retinsav géneket represszál (pl. Hoxa1) és ez független a kanonikus pluripotencia génhálózattól. További qPCR mérések azt is igazolták, hogy a Hoxa1 gén RNS szintje valóban represszálódik, csakúgy mint egy, a közelében található, a nyugvó rendszerben OCT4 kötött szabályozó régió enhanszer RNS szintje.

Ezután az OCT4 és a retinsav útvonal elemei közötti összefüggést kívántuk feltárni. Érdekes módon szinte kizárólag a Rar α and Rar γ szintje (utóbbi sokkal nagyobb mértékben) csökkent az OCT4 leütésekor, ami azt bizonyítja, hogy a pluripotens állapotban az OCT4 fenntartja ezen gének expresszióját. Továbbá a Rar γ esetében qPCR mérésekkel azt is igazoltuk, hogy egy, a közelében levő genomi régiót is szabályoz az OCT4 ilyen módon.

Az OCT4-függő transzkripció szabályozás modellezése hálózati motívumokkal

Az összegyűlt adatok alapján formalizáltuk az OCT4 szerepét a neuronális differenciáció korai szakaszában: egy kompozit motívumhálózatot terveztünk, amely két alapvető modulból épül fel: (1) Egy ún. konzisztens jeltovábbító motívum, amelyben az OCT4 közvetlenül és pozitívan szabályozza a Rar γ génexpresszióját a pluripotens állapotban, valamint közvetve szabályozza ezt a gént együttesen kötve egy RXR:RAR heterodimerrel retinsav kezelés hatására (2) Az OCT4 és a Hoxa1 egy ún. kölcsönös represszáló motívumot alkot: az OCT4 represszálja a Hoxa1 génexpressziós szintjét (embrionális őssejt állapot) és fordítva (hosszútávú retinsav szignaling).

5. MEGBESZÉLÉS

A „posztgenomikus” korszak egyik legnagyobb kihívása az egyre növekvő mennyiségű, újgenerációs szekvenálásból származó adatok integrálása, értelmezése, és az ezek alapján történő modellek alkotása. Ez a folyamat egyre nagyobb intellektuális hozzájárulást igényel a számítástudománnyal foglalkozó kutatóktól is, hiszen csakis interdiszciplinális csapatok képesek megérteni összetett molekuláris biológiai folyamatokat és kifejező modelleket megalkotni, amelyek alapján közelebb juthatunk a sejtfunkciókhoz, replikációhoz, transzkripcióhoz és transzlációhoz kapcsolódó folyamatok megértéséhez.

A Random Forest és Support Vector Regressor gépi tanuló eljárások újszerű eszközök arra, hogy osztályozó és regressziós modellek építésével validáljuk hipotéziseinket. Ezek az eszközök nemcsak a jóslási pontosság meghatározására alkalmasak, hanem a bemeneti változók hozzájárulását is meg tudják határozni. Megmutattuk, hogy az ATAC-seq alapján meghatározott kromatin nyitottság megjósolható a jelenlévő TF-ok kötési mintázatából. A két módszer alkalmazása rávilágított arra is, hogy (1) annak dacára, hogy a PU.1 a legfontosabb kulcs makrofág TF, sem ezen faktor, sem a többi TF kötési mintázata nem elegendő önmagában a hatékony jósláshoz, (2) az összes TF-t használó osztályozó magas pontossága (82%) azt sugallja, hogy a legfontosabb TF-ok szerepelnek a modellben.

A gépi tanulás eljárások alkalmazása vezetett el azon megfigyeléshez, miszerint a PU.1 kötések több mint alacsony nyitottságú kromatin régióhoz köt. Következő lépésként megvizsgáltuk ezen régiók lehetséges szerepét LPS és IL-4 által stimulált klasszikus és alternatív makrofág polarizációs programokban. Eredményeink azt mutatják, hogy a *jelölt szabályozó elemek* egy bizonyos része szignálfüggő módon (STAT6 – IL4 és p65 - LPS kötés hatására) nyitottá és aktívvá válik. Egy valószínű magyarázat, hogy a nyugvó makrofágban a bizonyos TF-k megpróbálják fenntartani a kromatin nyitottságát, de ehhez nem állnak rendelkezésre a megfelelő társfaktorok a sejtmagban. A jelenlegi modellünk kiterjesztése akkor válik majd lehetségessé, ha a TF kötési események egyedi sejtek szintjén is vizsgálhatóvá válnak és perces pontosságú helyett ezred másodperces pontosságú módszereket tudunk alkalmazni. Ily módon kiküszöbölhetjük a sejtpopulációkon végzett kísérleti módszerekben (pl. ChIP-seq) előforduló torzításokat. Eredményeink azt az összefüggést is feltárták, miszerint a transzkripciós választ a sejtmagban jelenlévő kulcs TF-ok és a szignálfüggő TF-ok együtt határozzák meg (“spektrum” modell).

A „spektrum” egyik végén a *de novo* enhanszerek találhatók, amelyek nagyon erősen függnék a szignálfüggő TF motívumától, és a nyugvó rendszerben a kulcs TF-ok nem képesek sem kinyitni, sem aktiválni ezeket a régiókat. Tehát ezekben az esetekben a szignálfüggő TF-ok jelenléte szükséges feltétel ezen enhanszerek kialakulásához. A második enhanszertípus az újonnan karakterizált *jelölt szabályozó elemek*, amelyeket ugyan kötnek TF-okat a nyugvó rendszerben, de azok nem képesek kinyitni/nyitva tartani ezeket a régiókat. A harmadik típus az ún. készenléti („poised”) enhanszerek. Ezek a régiók nyitottak a nyugvó sejtben szignálfüggő TF-ok nélkül, de aktívvá csak azok megjelenésével válhatnak. Korábbi tanulmányokban a H3K4me1/2 feldúsulás és PU.1 kötés alapján definiálták az enhanszer-szerű régiókat és a H3K27ac hisztonmódosítást használták a készenléti és az aktív enhanszerek szétválasztásához. A negyedik a felregulált, konstitutívan aktív enhanszerek csoportja, amelyek már a nyugvó rendszerben is aktívak és a szignálfüggő TF-ok tovább növelik az aktivitásukat. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy ez a csoport igényli legkevésbé az erős szignálfüggő TF motívumot, ami felveti a lehetőséget, hogy a nyitott kromatin önmagában is rekrutálhat szignálfüggő TF kötést nem specifikus DNS kötés és/vagy fehérje-fehérje kölcsönhatás révén.

Bonyolult biológiai folyamatokat leíró formális modellekre már az újgenerációs szekvenálási technológiák megjelenése előtt is égető szükség volt. A modellezési folyamat során a legfontosabb lépés az absztrakció, amely során elhagyjuk a szükségtelen elemeket és kiemeljük a fontosnak ítélt komponenseket. Az első pontosan leírt szabályozási folyamat az Operon modell volt; egy rendkívül hatékony prokarióta génszabályozási mechanizmus, amely során az élőlény villámgyorsan képes adaptálódni külső stimulusokhoz. Egy másik fontos példa a Chemoton-model, amely egy absztrakt automatát használva fogalmazza meg az élet alapvető feltételeit (önszabályozó anyagcsere-, vezérlő és egy határoló alrendszer). Ebben a dolgozatban egy Szabályozó Automatának elnevezett nemdeterminisztikus véges automatát konstruáltunk, amely az enhanszerek képződésének legfőbb lépéseit írja le mindössze három attribútum használatával: Kötés, Nyitottság és Aktivitás.

Hasonló mechanizmust találtunk embrionális őssejtekben is. Az OCT4 TF, ami pluripotencia faktorként ismert, olyan retinsav célgéneket közelében dúsul fel, amik inaktívak az őssejt állapotban. Ezek a régiók tipikusan alacsony nyitottságú kromatinhoz kötnek és gyakran találunk itt H3K27me3 feldúsulást. Bizonyos stimulusok hatására azonban nyitottá

válnak ezek a régiók a szignálfüggő TF-ok kötődésének hatására. Ezek a TF-k koaktivátorokat rekrutálnak és aktívvá teszik a genomi régiót éppen úgy, ahogy a polarizációs szignálok aktiválják a makrofágban azonosított *jelölt szabályozó elemeket* (p65 vagy STAT6 kötés által). Az OCT4 fenntartja a Rary génexpressziós szintjét a stimulálatlan állapotban, emellett alacsony nyitottságú régiókon keresztül represszál bizonyos retinsav célgéneket (pl. Hoxa1). Ebből a szempontból az OCT4 az IRF8-hoz hasonlít, amely minden bizonnyal hasonló represszor funkciót tölt be makrofágokban bizonyos alacsony nyitottságú régiókon, habár a pontos mechanizmus felderítéséhez még további kutatás szükséges. Vegezetül egy formális modellt is alkottunk az OCT4-függő génszabályozás leírására egy két hálózati motívumból felépülő motívumhálózattal: (1) egyrészt az OCT4 pluripotens állapotban fenntartja az Rary génexpressziós szintjét, másrészt 24 órás retinsav stimulus hatására felregulálja a Hoxa1 gén expressziós szintjét a RXR:RAR heterodimerrel együtt kötve, másrészt (2) az OCT4 és a Hoxa1 kölcsönösen represszálják egymás génexpressziós szintjét, ezáltal egy kétállapotú kapcsolót hoznak létre a pluripotens állapot és a neurális differenciáció között. Ebben a szakaszban kulcsfontosságú a Hoxa1 szerepe, amely fontos szerepet tölt be a hátsóagy és a hozzátartozó velőcső kialakulásában. Ilyen jellegű modellek lehetnek egy enhanszerképződés elméletének építőkövei.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Összegzés 1. Meghatároztuk a kulcs makrofág transzkripció faktorok hozzájárulását a kromatin nyitottsághoz és enhanszer aktivációhoz mind nyugvó mind polarizált egér makrofágokban.

Eredményeink alapján a következő megállapításokat tettük:

- A Random Forest és Support Vector Regressor gépi tanuló eljárások alkalmazásával a kromatin nyitottsága nagy pontossággal megjósolható a kulcs TF-ok kötési mintázatából függetlenül attól, hogy „magas nyitottságú” és „alacsony nyitottságú” csoportokba osztjuk a kötőhelyeket (osztályozási feladat) vagy folytonos értéként kezeljük a nyitottságot (regressziós feladat).
- Az osztályozó gépi tanuló eljárás alkalmazása arra is rámutatott, hogy a PU.1 kötőhelyek több mint fele alacsony nyitottságú genomi régiót köt, amelyeket *jelölt szabályozó*

elemeknek neveztünk el. Eredményeink alapján azt is elmondhatjuk, hogy ez általános jelenség a többi kulcs TF (IRF8, CEBPA és RUNX1) esetében is.

- A PUER, valamint az IRF8-/- sejtekben elvégzett kísérletek bebizonyították, hogy mind a PU.1-nak, mind az IRF8-nak elengethetetlen szerepe van a nyugvó sejtekben zajló és az IL-4-függő génexpressziós szabályzásban is.
- Számos olyan TF modul létezik, amelyek tagjai együtt kötnek *jelölt szabályozó elemeket*. Ezek a modulok különböző módon válaszolnak a klasszikus (LPS) és alternatív (IL-4) polarizációs stimulusokra és specifikus géncsoportokat szabályoznak eltérő kinetikával.
- Az IRF8 hiányos sejtekben nyitottá váló mintegy 2 300 IRF8-*jelölt szabályozó elem* az IRF8 represszor szerepére utal.
- Az általunk megkonstruált Szabályozó Automatának elnevezett formális modell segítségével leírhatóak a már ismert és az újonnan azonosított enhanszertípusok és a közöttük előforduló állapotátmenetek.

Összegzés 2. Feltártuk az OCT4 transzkripció faktor eddig nem ismert szerepét a neuronális differenciáció korai szakaszában

Eredményeink alapján a következő megállapításokat tettük:

- Genomskálájú vizsgálataink megmutatták, hogy az OCT4 kötőhelyeinek egy jelentős része alacsony nyitottságú genomi régiót köt (OCT4-*jelölt szabályozó elemek*) mind az ún. „naív” mind az ún. „alapállapotú” embrionális őssejtekben.
- Az OCT4-*jelölt szabályozó elemek* és a retinsav útvonal összefüggéseink vizsgálata rámutatott, hogy az OCT4 nemcsak a pluripotens állapot fenntartásában, hanem neuronális differenciáció korai szakaszában is jelentős szerepet játszik.
- Az OCT4 RNS szintű csendesítése megmutatta, hogy az OCT4 hozzájárul fontos gének (pl. Hoxa1) differenciációval összefüggő szabályozó elemeinek aktiválásához.
- Egy összetett motívumhálózat megalkotásával szemléltettük az OCT4 kettős szerepét: egyrészt a pluripotens állapotban fenntartja az Rxry szintjét és represszálja a Hoxa1 gént, másrészt 24 órás retínsav stimulus esetén elengethetetlen a Hoxa1 gén expressziós szintjének növeléséhez.

7. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/175/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Horváth Attila
Neptun kód: BC1RA5
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Horváth, A.**, Dániel, B., Széles, L., Cuaranta-Monroy, I., Czimmerer, Z., Ozgyin, L., Steiner, L., Kiss, M., Simándi, Z., Póliska, S., Giannakis, N., Raineri, E., Gut, I. G., Nagy, B., Nagy, L.: Labelled regulatory elements are pervasive features of the macrophage genome and are dynamically utilized by classical and alternative polarization signals. *Nucleic Acids Res.* 47 (6), 2778-2792, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkz118>
IF: 11.561 (2017)
2. Simándi, Z., **Horváth, A.**, Wright, L. C., Cuaranta-Monroy, I., De, L. I., Károlyi, K., Sauer, S., Deleuze, J. F., Gudas, L. J., Cowley, S. M., Nagy, L.: OCT4 Acts as an Integrator of Pluripotency and Signal-Induced Differentiation. *Mol. Cell.* 63 (4), 647-661, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.039>
IF: 14.714

További közlemények

3. Ozgyin, L., **Horváth, A.**, Hevessy, Z., Bálint, B. L.: Extensive epigenetic and transcriptomic variability between genetically identical human B-lymphoblastoid cells with implications in pharmacogenomics research. *Sci Rep.* 9, 1-16, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-40897-9>
IF: 4.122 (2017)
4. Ivády, G., Madar, L., Dzsudzsák, E., Koczok, K., Kappelmayer, J., Krulisova, V., Macek, J. M., **Horváth, A.**, Balogh, I.: Analytical parameters and validation of homopolymer detection in a pyrosequencing-based next generation sequencing system. *BMC Genomics.* 19, 1-8, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-018-4544-x>
IF: 3.73 (2017)





5. Simándi, Z., Pájer, K., Károlyi, K., Sieler, T., Jiang, L. L., Kolostyák, Z., Sári, Z., Fekecs, Z., Pap, A., Patsalos, A., Contreras, G. A., Rehó, B., Papp, Z., Guo, X., **Horváth, A.**, Kiss, G., Keresztessy, Z., Vámosi, G., Hickman, J., Xu, H., Dormann, D., Hortobágyi, T., Antal, M., Nógrádi, A., Nagy, L.: Arginine Methyltransferase PRMT8 Provides Cellular Stress Tolerance in Aging Motoneurons.
J. Neurosci. 38 (35), 7683-7700, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3389-17.2018>
IF: 5.97 (2017)
6. Czimmerer, Z., **Horváth, A.**, Dániel, B., Nagy, G., Cuaranta-Monroy, I., Kiss, M., Kolostyák, Z., Pólska, S., Steiner, L., Giannakis, N., Varga, T., Nagy, L.: Dynamic transcriptional control of macrophage miRNA signature via inflammation responsive enhancers revealed using a combination of next generation sequencing-based approaches.
Biochim. Biophys. Acta. Gene Regul. Mech. 1861 (1), 14-28, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2017.11.003>
IF: 5.179 (2017)
7. Fejes, Z., Czimmerer, Z., Szűk, T., Pólska, S., **Horváth, A.**, Balogh, E., Jeney, V., Váradi, J., Fenyvesi, F., Balla, G., Édes, I., Balla, J., Kappelmayer, J., Nagy, B. J.: Endothelial cell activation is attenuated by everolimus via transcriptional and post-transcriptional regulatory mechanisms after drug-eluting coronary stenting.
PLoS One. 13 (6), 1-20, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0197890>
IF: 2.766 (2017)
8. Czimmerer, Z., Nagy, Z. S., Nagy, G., **Horváth, A.**, Silye-Cseh, T., Kriston, Á., Jonás, D., Sauer, S., Steiner, L., Dániel, B., Deleuze, J. F., Nagy, L.: Extensive and functional overlap of the STAT6 and RXR cistromes in the active enhancer repertoire of human CD14+ monocyte derived differentiating macrophages.
Mol. Cell. Endocrinol. 471, 63-74, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.034>
IF: 3.563 (2017)
9. Ozgyin, L., **Horváth, A.**, Bálint, B. L.: Lyophilized human cells stored at room temperature preserve multiple RNA species at excellent quality for RNA sequencing.
Oncotarget. 9 (59), 31312-31329, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.25764>
10. Simándi, Z., **Horváth, A.**, Cuaranta-Monroy, I., Sauer, S., Deleuze, J. F., Nagy, L.: RXR heterodimers orchestrate transcriptional control of neurogenesis and cell fate specification.
Mol. Cell. Endocrinol. 471, 51-62, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.033>
IF: 3.563 (2017)





11. Dániel, B., Nagy, G., **Horváth, A.**, Czimmerer, Z., Cuaranta-Monroy, I., Póliska, S., Hays, T. T., Sauer, S., Francois-Deleuze, J., Nagy, L.: The IL-4/STAT6/PPAR[gamma] signaling axis is driving the expansion of the RXR heterodimer cistrome, providing complex ligand responsiveness in macrophages.
Nucleic Acids Res. 46 (9), 4425-4439, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky157>
IF: 11.561 (2017)
12. Dániel, B., Nagy, G., Czimmerer, Z., **Horváth, A.**, Hammers, D. W., Cuaranta-Monroy, I., Póliska, S., Tzerpos, P., Kolostyák, Z., Hays, T. T., Patsalos, A., Houtman, R., Sauer, S., Francois-Deleuze, J., Rastinejad, F., Bálint, B. L., Sweeney, H. L., Nagy, L.: The Nuclear Receptor PPAR[gamma] Controls Progressive Macrophage Polarization as a Ligand-Insensitive Epigenomic Ratchet of Transcriptional Memory.
Immunity. 49 (4), 615-626, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2018.09.005>
IF: 19.734 (2017)
13. Czimmerer, Z., Dániel, B., **Horváth, A.**, Rückerl, D., Nagy, G., Kiss, M., Peloquin, M., Budai, M., Cuaranta-Monroy, I., Simándi, Z., Steiner, L., Nagy, B. J., Póliska, S., Bankó, C., Bacsó, Z., Schulman, I. G., Sauer, S., Deleuze, J. F., Allen, J. E., Benkő, S., Nagy, L.: The Transcription Factor STAT6 Mediates Direct Repression of Inflammatory Enhancers and Limits Activation of Alternatively Polarized Macrophages.
Immunity. 48 (1), 75-90, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.12.010>
IF: 19.734 (2017)
14. Gál, A., Balicza, P., Weaver, D. A., Naghdi, S., Joseph, S. K., Várnai, P., Gyuris, T., **Horváth, A.**, Nagy, L., Seifert, E. L., Molnár, M. J., Hajnóczky, G.: MSTO1 is a cytoplasmic pro-mitochondrial fusion protein, whose mutation induces myopathy and ataxia in humans.
EMBO Mol Med. 9 (7), 967-984, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.15252/emmm.201607058>
IF: 10.293
15. Imre, L., Simándi, Z., **Horváth, A.**, Fenyőfalvi, G., Ifj., N. P. P., Niaki, E. F., Hegedűs, É., Bacsó, Z., Weyemi, U., Mauser, R., Ausio, J., Jeltsch, A., Bonner, W., Nagy, L., Kimura, H., Szabó, G.: Nucleosome stability measured in situ by automated quantitative imaging.
Sci Rep. 7 (1), 1-15, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-12608-9>
IF: 4.122



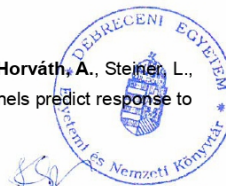


16. Kiss, M., Czimmerer, Z., Nagy, G., Bieniasz-Krzywiec, P., Ehling, M., Pap, A., Pólska, S., Botó, P., Tzerpos, P., **Horváth, A.**, Kolostyák, Z., Dániel, B., Szatmári, I., Mazzone, M., Nagy, L.: Retinoid X receptor suppresses a metastasis-promoting transcriptional program in myeloid cells via a ligand-insensitive mechanism.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 114 (40), 10725-10730, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1700785114>
IF: 9.504
17. Varga, T., Mounier, R., **Horváth, A.**, Cuvellier, S., Dumont, F., Pólska, S., Ardjoune, H., Juban, G., Nagy, L., Chazaud, B.: Highly Dynamic Transcriptional Signature of Distinct Macrophage Subsets during Sterile Inflammation, Resolution, and Tissue Repair.
J. Immunol. 196 (11), 4771-4782, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1502490>
IF: 4.856
18. Varga, T., Mounier, R., Patsalos, A., Gogolak, P., Peloquin, M., **Horváth, A.**, Pap, A., Dániel, B., Nagy, G., Pintye, É., Pólska, S., Cuvellier, S., Ben Larbi, S., Sansbury, B. E., Spite, M., Brown, C. W., Chazaud, B., Nagy, L.: Macrophage PPAR[gamma], a Lipid Activated Transcription Factor Controls the Growth Factor GDF3 and Skeletal Muscle Regeneration.
Immunity. 45 (5), 1038-1051, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.016>
IF: 22.845
19. Simándi, Z., **Horváth, A.**, Nagy, P., Nagy, L.: Prediction and Validation of Gene Regulatory Elements Activated During Retinoic Acid Induced Embryonic Stem Cell Differentiation.
JoVE. 2016 (112), e53978, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3791/53978>
IF: 1.232
20. Czimmerer, Z., Varga, T., Kiss, M., Vázquez, C. O., Doan-Xuan, Q. M., Rückerl, D., Tattikota, S. G., Yan, X., Nagy, Z. S., Dániel, B., Pólska, S., **Horváth, A.**, Nagy, G., Varallyay, É., Poy, M. N., Allen, J. E., Bacsó, Z., Abreu-Goodger, C., Nagy, L.: The IL-4/STAT6 signaling axis establishes a conserved microRNA signature in human and mouse macrophages regulating cell survival via miR-342-3p.
Genome Med. 8 (1), 1-22, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13073-016-0315-y>
IF: 7.071
21. Rácz, R., Bereczki, J., Sramkó, G., Kosztolányi, A., Tóth, J. P., Pólska, S., **Horváth, A.**, **Barta, E.**, Barta, Z.: Isolation and Characterisation of 15 Microsatellite Loci from *Lethrus apterus* (Coleoptera: Geotrupidae).
Ann. Zool. Fenn. 52 (1-2), 45-50, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5735/086.052.0204>
IF: 0.753





22. Simándi, Z., Czipa, E., **Horváth, A.**, Kőszeghy, Á., Bordás, C., Pólska, S., Juhász, I., Imre, L., Szabó, G., Dezső, B., Barta, E., Sauer, S., Károlyi, K., Kovács, I., Hutóczki, G., Bognár, L., Klekner, Á., Szűcs, P., Bálint, B. L., Nagy, L.: PRMT1 and PRMT8 regulate retinoic acid-dependent neuronal differentiation with implications to neuropathology.
Stem Cells. 33 (3), 726-741, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/stem.1894>
IF: 5.902
23. Cuaranta-Monroy, I., Simándi, Z., Kolostyák, Z., Doan-Xuan, Q. M., Pólska, 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: 3.693
24. Gyöngyösi, A., Dócs, O., Czimmerer, Z., Orosz, L., **Horváth, A.**, Török, O., Méhes, G., Nagy, L., Bálint, B. L.: Measuring expression levels of small regulatory RNA molecules from body fluids and formalin-fixed, paraffin-embedded samples.
Methods Mol. Biol. 1182, 105-119, 2014.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-1062-5_10
25. Dániel, B., Nagy, G., Hah, N., **Horváth, A.**, Czimmerer, Z., Pólska, S., Gyuris, T., Keirsse, J., Gysemans, C., Van Ginderachter, J. A., Bálint, B. L., Evans, R. M., Barta, E., Nagy, L.: The active enhancer network operated by liganded RXR supports angiogenic activity in macrophages.
Genes Dev. 28 (14), 1562-1577, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.242685.114>
IF: 10.798
26. 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), 1-10, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0055168>
IF: 3.534
27. Meskó, B., Pólska, S., Váncsa, A., Szekanecz, Z., Palatka, K., Holló, Z., **Horváth, A.**, Steiner, L., Zahuczky, G., Podani, J., Nagy, L.: Peripheral blood derived gene panels predict response to infliximab in rheumatoid arthritis and Crohn's disease.
Genome Med. 5 (6), 59-69, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/gm463>
IF: 4.942





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

28. Laczik, M., Tukacs, E., Uzonyi, B., Domokos, B., Doma, Z., Kiss, M., **Horváth, A.**, Batta, Z.,
Maros-Szabó, Z., Török, Z.: Geno viewer, a SAM/BAM viewer tool.
Bioinformation. 8 (2), 107-109, 2012.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 195,742

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
26,275**

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, 2019.05.03.

