

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Erdős Edina

COUP-TFII árva magreceptor általi kötőesemények genomszintű vizsgálata daganatos sejtekben

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2020

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**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

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
1.1. Bevezetés	6
1.2. Magreceptorok csoportosítása és struktúrája	7
1.3. Magreceptorok DNS válaszadó elemei	12
1.4. Magreceptorok által mediált transzkripció és koregulátorok szerepe	15
1.5. Ösztrogén receptor alfa (ER α) magreceptor	17
1.5.1. ER α által mediált szabályozási program	19
1.6. COUP-TFII árva magreceptor	21
1.6.1. COUP-TFII fiziológiás szerepe.....	23
1.7. Magreceptorok jelentősége daganatos megbetegedésekben.....	24
1.8. Funkcionális genomikai eszközök magreceptorok általi szabályozások feltérképezéséhez	25
2. CÉLKITŰZÉSEK	28
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	29
3.1. <i>In vitro</i> kísérletek.....	29
3.1.1. Sejtek tenyésztése és kezelése	29
3.1.2. Genetikailag módosított sejtek létrehozása	29
3.1.3. Fág termelés poliklonális antitest epitópjának leképezéséhez	29
3.1.4. Kromatin immunprecipitáció fág kontrollal	31
3.1.5. Kromatin immunprecipitáció emlődaganat sejtekből	32
3.1.6. RNS izolálás és RT-PCR.....	33
3.1.7. Kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR)	34
3.1.8. Új generációs szekvenálás.....	35
3.2. Bioinformatikai elemzések	36
3.2.1. Adatok	36
3.2.2. Új generációs szekvenálási adatok elemzése	37
3.2.3. Betegekből származó adatok elemzése	38
3.2.4. Statisztikai számítások	38
3.2.5. Vizualizáció.....	39

4. EREDMÉNYEK	40
4.1. Kromatin immunprecipitáció karakterizálása ER α epitópot kifejező fág kontrollal .	40
4.2. COUP-TFII, mint ER α koregulátor ER-pozitív emlődaganatban	43
4.3. COUP-TFII szerepe emlődaganat sejtek génexpressziójában.....	47
4.4. COUP-TFII jelentősége emlődaganatos betegekben.....	50
4.5. COUP-TFII kötőhelyek feltérképezése különböző eredetű daganatsejtekben	52
4.6. COUP-TFII kötőhelyekhez kötődő kofaktorok azonosítása	55
4.7. COUP-TFII kötőhelyek a sejt-típus specifikus szabályozásban.....	58
4.8. A VEGFA gén szabályozása COUP-TFII által.....	61
4.9. COUP-TFII expressziójának hatása különböző daganatos betegek túlélésére.....	63
5. MEGBESZÉLÉS	65
6. ÖSSZEFOGLALÁS	77
7. SUMMARY	78
Felhasznált irodalom	79
Saját közlemények.....	96
Kulcsszavak/keywords	98
Köszönetnyilvánítás	99
Függelék	100

Rövidítések jegyzéke

AF-1	activation function 1	1-es aktivációs funkció
AF-2	activation function 2	2-es aktivációs funkció
ALT	alternative lengthening of telomeres	alternatív telomermeghosszabbodás
AP2 γ	activator protein 2 γ	aktivátor fehérje 2 γ
BSA	bovine serum albumin	borjú szérum albumin
BWA	Burrows-Wheeler Aligner	Burrows-Wheeler Illesztő
CHD	congenital heart defect	veleszületett szívbetegség
ChIA-PET	Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag Sequencing	kromatin interakció analízis kétoldaltól történő szekvenálás által
ChIP	chromatin immunoprecipitation	kromatin immunoprecipitáció
ChIP-Seq	chromatin immunoprecipitation following sequencing	kromatin immunoprecipitációt követő szekvenálás
CNV	copy number variation	kópiaszám változás
COUP-TFII	chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II	csirke ovalbumin 5' vég felőli promóterhez kötődő transzkripció faktor II
CTCF	CCCTC-binding factor	CCCTC-kötő faktor
CTE	C-terminal extension (of nuclear receptor)	C-terminális vég (magreceptorok DBD-jének)
DBD	DNA binding domain	DNS kötő domén
DES	diethylstilbestrol	dietilstilbesztrol
DiffBind	differential binding analysis of ChIP-Seq peak data	ChIP-seq csúcs adatok különböző kötődéseinek elemzése
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	„Dulbecco's modified eagle medium”
dNTP	deoxynucleoside triphosphate	dezinukleotid-trifoszfát
DR	direct repeat (element)	direkt ismétlődés
DREAM	dimerization partner, RB-like, E2F and MuvB (DREAM) complex	dimerizációs partner, RB-szerű, E2F és MuvB komplex
DTT	dithiothreitol	ditiotreitól
E2	estradiol	ösztadiol
ENCODE	Encyclopedia of DNA Elements	DNS Elemek Enciklopédiája
ER α	estrogen receptor alpha	ösztrogén receptor alfa
ERE	estrogen responsive elements	ösztrogén válaszadó elem
FBS	fetal bovine serum	magzati borjú szérum
FPKM	fragments per kilobase of exon per million mapped fragments	fragment per exon kilobázisa per millió térképezett fragment
FOXA1	Forkhead box protein A1	Forkhead box fehérje A1
GATA	GATA-binding factor	GATA-kötő faktor
GREAT	Genomic Regions Enrichment of Annotations Tools	Genomi régiók feldúsulásának annotációs eszköze
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis	Génszett Feldúsulási Analízis
H3K27ac	histone H3 lysine 27 acetylation	H3 hiszton 27-es lizinének acetilációja
H3K4me1	histone H3 lysine 4 monomethylation	H3 hiszton 4-es lizinének monometilációja
H3K4me3	histone H3 lysine 4 trimethylation	H3 hiszton 4-es lizinének trimetilációja
HAT	histone acetyltransferase	hiszton acetiltranszferáz
HER2	human epidermal growth factor receptor 2	humán epidermális növekedési faktor receptor 2
HMT	histone methyltransferase	hiszton metiltranszferáz
HNF4	hepatocyte nuclear factor 4	hepatocita nukleáris faktor 4
HOMER	Hypergeometric Optimization of Motif Enrichment	Motívum feldúsulás hipergeometrikus optimalizációja
IDC	invasive ductal carcinoma	invazív ductál karcinóma
IgG	Immunoglobulin G	Immunglobulin G

ILC	Invasive lobular carcinoma	Invazív lobuláris karcinóma
IP	Immunoprecipitation	immunprecipitáció
IR	inverted repeat	fordított ismétlődés
LBD	ligand-binding domain	ligand-kötő domén
MACS2	Model-based Analysis of ChIP-Seq	ChIP-Seq model alapú elemzése
MDa	Mega Dalton	Mega Dalton
MOI	multiplicity of infection	fertőzés sokasága
mRNA	messenger ribonucleic acid	hírvivő ribonukleinsav
NCoA	nuclear receptor coactivator	magreceptor koaktivátor
NCoR	nuclear receptor corepressor	magreceptor korepresszor
NES	normalised enrichment score	normalizált feldúsulási pontszám
NR	nuclear receptor	magreceptor
PBS	phosphate-buffered saline	foszfát pufferes sóoldat
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
PVDF	polyvinylidene difluoride	polivinilidén-fluorid
RIPA	radioimmunoprecipitation assay buffer	radioimmunprecipitációs esszé puffer
RNA-Seq	ribonucleic acid sequencing	ribonukleinsav szekvenálás
RPKM	reads per kilobase of a region per million mapped reads	leolvasás per egy régió kilobázisa per millió feltérképezett leolvasás
shRNA	short hairpin ribonucleic acid	rövid hajtű ribonukleinsav
SRA	Sequence Read Archive	Szekvencia Leolvasás Archívum
SRC	steroid receptor coactivator	szteroid receptor koaktivátor
SSII	SuperScript II	SuperScript II
TAD	trans-activation domain	transz-aktivációs domén
TBS	Tris buffered saline	Tris pufferes sóoldat
TBST	Tris buffered saline with Tween® 20	Tris pufferes sóoldat Tween® 20 oldattal
TBX5	T-box transcription factor 5	5-ös T-box transzkripció faktor
TF	transcription factor	transzkripció faktor
TFBS	transcription factor binding site	transzkripció faktor kötőhely
TSS	transcription start site	transzkripció start hely
UCSC	University of California, Santa Cruz	Kaliforniai Egyetem, Santa Cruz
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	vaszkuláris endotelális növekedési faktor A
WHO	World Health Organization	Világ Egészségügyi Organizáció

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 zsírolékony tulajdonságaiknak köszönhetően könnyen átjutnak a plazma membránon 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 (Mangelsdorf et al., 1995; Tsai & O'Malley, 1994). 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 tüdődaganat, míg nők esetén az emlődaganat volt a leggyakoribb halálozás a daganatos megbetegedések közül, és ezen halálozások száma évről évre növekszik az egyre hatékonyabb terápiás beavatkozások ellenére is.

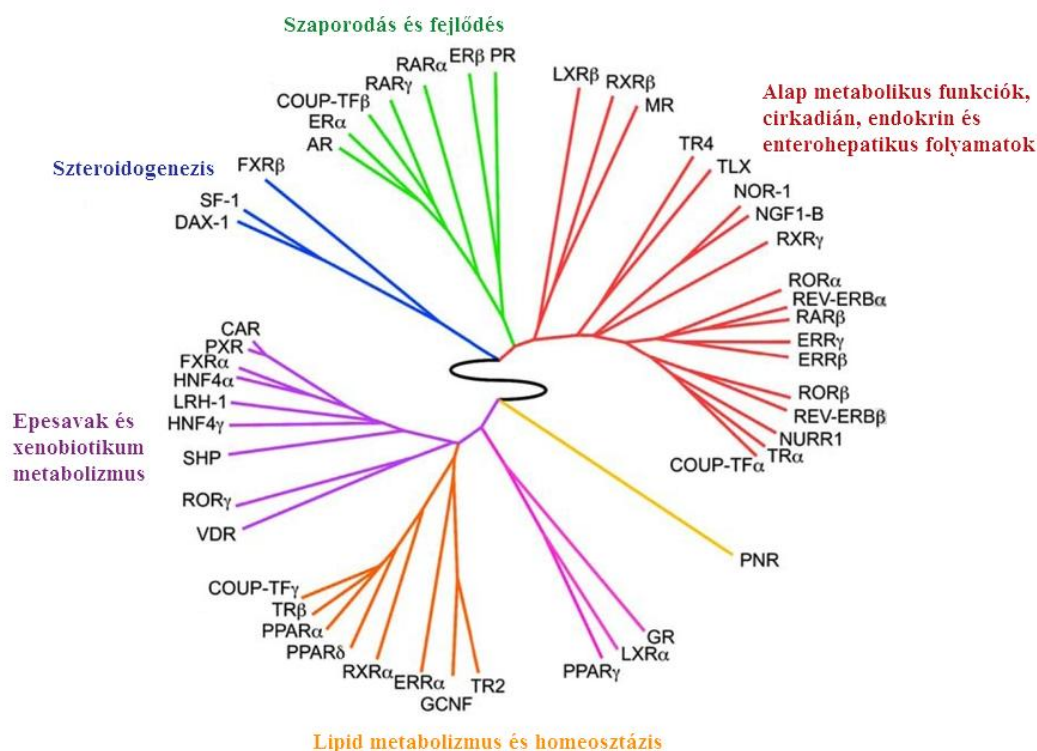
Munkánk során a COUP-TFII árva magreceptor szerepének vizsgálatát tűztük ki célul funkcionális genomikai módszerekkel különböző eredetű daganatsejtekben, ezek közül is elsősorban az emlődaganatra fókuszálva.

1.2. Magreceptorok csoportosítása és struktúrája

A magreceptorok ligand-aktivált transzkripció faktorok. A ligandjaik olyan hidrofób hírvivő molekulák lehetnek, melyek a szervezetünkben is előfordulnak, mint például tiroid hormonok, retinoidok, szteroidok, D vitamin, zsírsavak, epesavak, de ezen kívül külső eredetűek is lehetnek, mint például gyógyszerek vagy xenobiotikumok. Vannak olyan magreceptorok is, melyeknek még nem azonosították a természetes ligandjukat, őket orfán vagyis árva magreceptoroknak hívjuk (Giguère, 1999). A magreceptor családnak 48 tagját sikerült azonosítani emberben (Mangelsdorf et al., 1995), és egy pszeudogént, az FXR β -t (Otte et al., 2003). A család tagjainak evolúciós tanulmányozása alapján hat alcsoport azonosítható (Laudet, 1997), melyet szisztematikus elnevezéshez is felhasználtak és további egy alcsoport (NR0) is megkülönböztethető (Auwerx et al., 1999). Az **1. táblázatban** találhatóak a magreceptor család alcsoportosítása ligandjaikkal feltüntetve. Egyéb organizmusokban további magreceptorok is megfigyelhetők, például olyanok, amelyeknek két DNS-kötő doménjük van (Wu et al., 2007). Egy másik ettől eltérő csoportosítása látható a magreceptoroknak a **1. ábrán**, ahol a magreceptorok közötti kapcsolatot láthatjuk szövet specifikus expressziós szintjeikre alapozva, azt is bemutatva, hogy főként mely biológiai folyamatokban játszanak szerepet (Bookout et al., 2006).

1. táblázat: Magreceptorok osztályozása szekvencia homológia alapján a ligandjukkal feltüntetve. *pszudogén emberben

	NRNC szimbólum	Magreceptor	Rövidítés	Ligand
1-es típus	NR1A1	tiroid hormon receptor	TR α	tiroid hormon
	NR1A2		TR β	tiroid hormon
	NR1B1	retinsav receptor	RAR α	retinsav
	NR1B2		RAR β	retinsav
	NR1B3		RAR γ	retinsav
	NR1C1	peroxiszóma proliferátor aktivált	PPAR α	zsírsav, leukotrén B4
	NR1C2	receptor	PPAR β	zsírsav, proszttaglandin I2
	NR1C3		PPAR γ	zsírsav, proszttaglandin D2
	NR1D1	reverz-ErbA	Rev-Erb α	hem
	NR1D2		Rev-Erb β	hem
	NR1F1	RAR-hoz vonatkoztatott	ROR α	koleszterol
	NR1F2	árva receptor	ROR β	csupa transz retinsav (ATRA)
	NR1F3		ROR γ	csupa transz retinsav (ATRA)
	NR1H2	máj X-receptor	LXR β	oxiszterol
	NR1H3		LXR α	oxiszterol
	NR1H4	farnezoid receptor	FXR α	epesavak, fexaramine
	NR1H5*		FXR β	epesavak, fexaramine
	NR1I1	D vitamin receptor	VDR	1,25-dihidroxi D3 vitamin
	NR1I2	pregnán X-receptor	PXR	xenobiotikumok
	NR1I3	konstitutív androsztán receptor	CAR	androsztán
2-es típus	NR2A1	hepatocita nukleáris faktor	HNF4 α	zsírsavak
	NR2A2		HNF4 γ	zsírsavak
	NR2B1	retinoid X-receptor	RXR α	9-cisz-retinsav
	NR2B2		RXR β	9-cisz-retinsav
	NR2B3		RXR γ	csupa transz retinsav (ATRA)
	NR2C1	tesztikuláris receptor	TR2	árva
	NR2C2		TR4	árva
	NR2E1	Drosophila fark nélküli gén homológja	TLX	árva
	NR2E2	fotoreceptor specifikus magreceptor	PNR	árva
	NR2F1	csirke ovalbumin 5' vég felőli	COUP-TFI	árva
	NR2F2	promóterhez kötődő transzkripció faktor	COUP-TFII	árva
	NR2F6	V-ErbA2-hoz vonatkoztatott	EAR2	árva
3-es típus	NR3A1	ösztrogén receptor	ER α	17- β -ösztradiol, tamoxifen
	NR3A2		ER β	17- β -ösztradiol
	NR3B1	ösztrogén receptorhoz	ERR α	árva
	NR3B2	vonatkoztatott receptor	ERR β	dietilstilbesztrol (DES)
	NR3B3		ERR γ	dietilstilbesztrol (DES)
	NR3C1	glükokortikoid receptor	GR	kortizol, dexametazon
	NR3C2	minerálkortikoid receptor	MR	aldoszteron
	NR3C3	progeszteron receptor	PGR	progeszteron
	NR3C4	androgén receptor	AR	tesztoszteron, flutamide
0, 4, 5 és 6-os típus	NR4A1	NGF-indukált faktor B	NGFIB	árva
	NR4A2	Nur-hoz vonatkoztatott faktor	NURR1	telítetlen zsírsavak
	NR4A3	neuron eredetű árva	NOR1	árva
	NR5A1	szteroidogénikus faktor-1	SF1	foszfolipid
	NR5A2	máj receptor homológ	LRH1	foszfolipid
	NR6A1	csírasejt nukleáris faktor	GCNF	árva
	NR0B1	DSS-AHC régió az X kromoszómán	DAX1	árva
	NR0B2	rövid heterodimer partner	SHP	árva

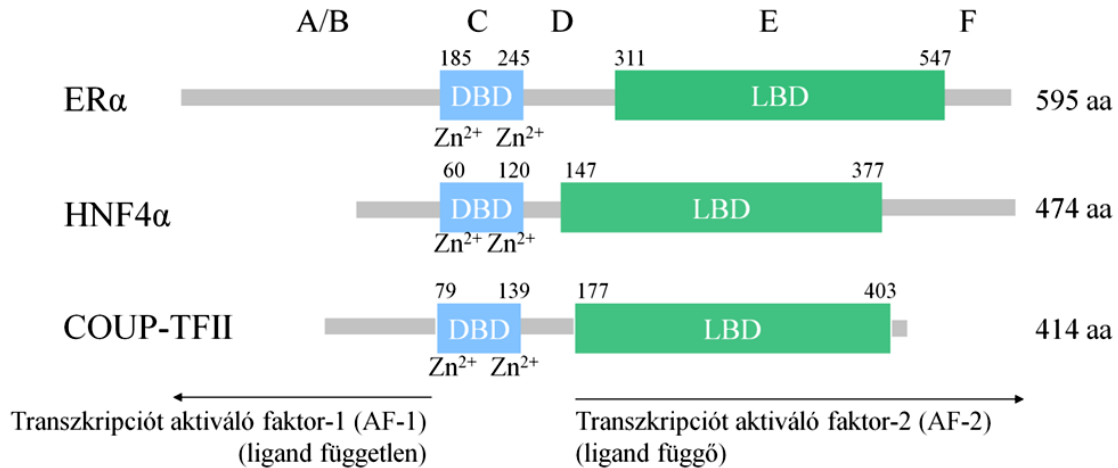


1. ábra: Magreceptorok csoportosítása szöveti expresszió és funkció alapján. (Forrás: Bookout et al., 2006)

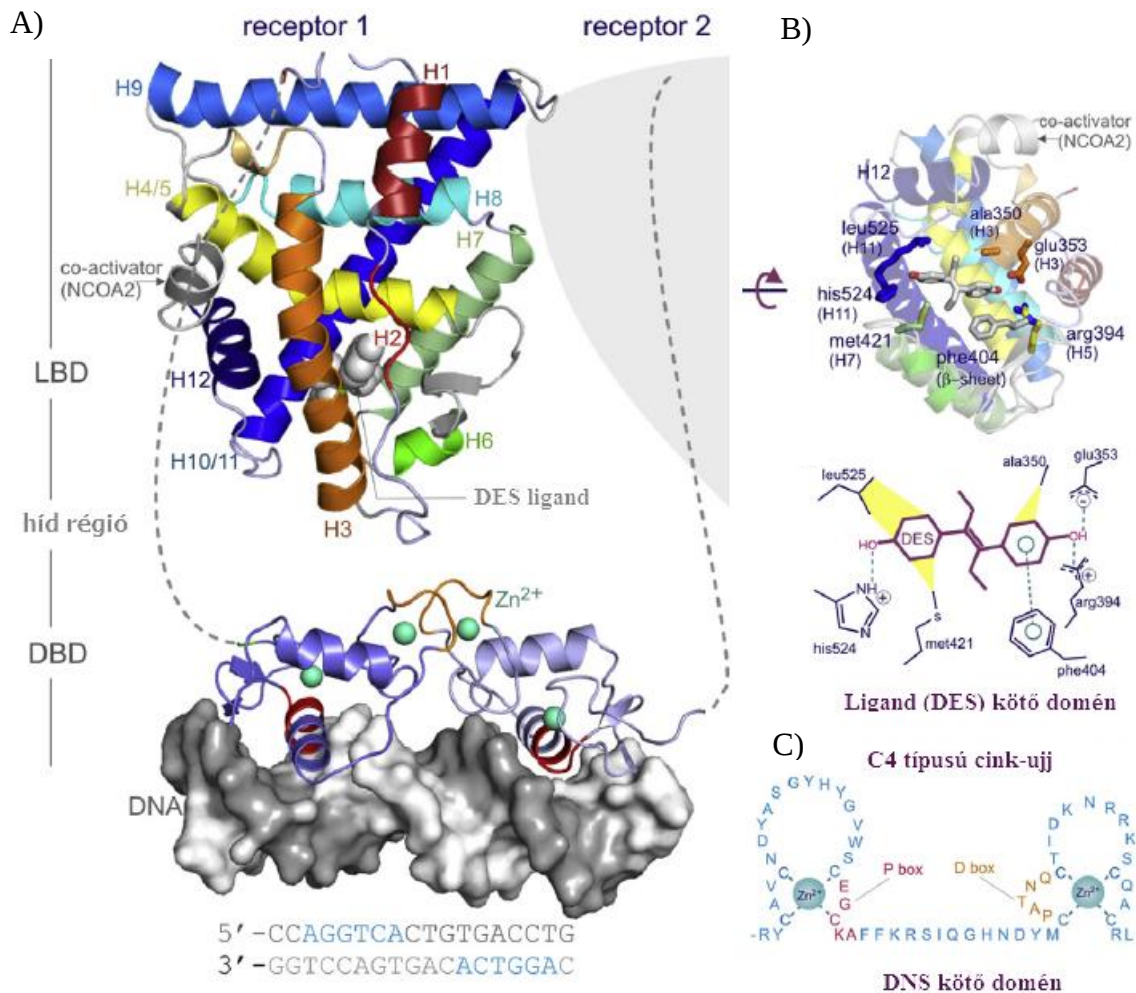
A magreceptorok struktúrájuk alapján nagyfokú konzerváltságot mutatnak, és hasonló funkcionális doménekből állnak. Ezek a domének a nagymértékű variabilitást mutató N-terminális domén (A/B), a DNS-kötő domén (DBD) két cinkujj motívummal, a D domén és a C-terminális domén (E/F), amely a ligand-kötő domént (LBD) tartalmazza (Green & Chambon, 1988). Ezeket a doméneket két transzkripciót aktiváló funkció helyre oszthatjuk. Az egyik az aktivációs funkció 1 (AF-1) az N-terminális domén A/B régiójában, amely ligand független, míg a másik az aktivációs funkció 2 (AF-2) az E/F régióval megegyező régiójában található, mely ligandfüggő (**2. ábra**). A magreceptorok LBD-jének számos kristályszerkezetét határoztak meg természetes és szintetikus ligandjaikkal képzett komplexben (Huang et al., 2010). Az LBD tizenkét α -hélix struktúrából rendeződik össze egy háromrétegű szendvics struktúrává, így létrehozva egy hidrofób zsebet (Bourguet et al., 1995; Renaud et al., 1995). A ligand kötött struktúrát a C-terminálison lévő H12 hélix zárja le. A

ligandkötő zseb H3, H4/5, H7 és H11 hélixel van körülvéve, melyek apoláris és aromás aminosavakat tartalmaznak (alanin, metionin, leucin és fenilalanin). A zseb nyitott részénél poláris aminosavakat (arginin, glutamát és hisztidin) tartalmaz. **3. ábrán** az ösztrogén receptor LBD-jének dietil-sztilbeszterol (DES) liganddal kötött komplexét láthatjuk példaként. A zseb mérete magreceptoronként változik. Gyakran a zseb mérete megegyezik a természetes ligand méretével és nagy affinitással képes kötni azt (K_D nanomól tartományban). Vannak olyan magreceptorok mint például az oxiszterol (NR1H2/3) és epesav receptorok (NR1H4/5) is amelyek alacsony affinitással képesek kötni ligandjukat (mikromól tartomány), de számos ligandot képesek felismerni. A xenobiotikus receptoroknak (NR1I2/3) van a legnagyobb és legflexibilisebb zsebük, kétszer nagyobb mint a tiroid receptoroknak, míg az NR4A2 árva magreceptornak gyakorlatilag nincs zsebe. A ligand kötése olyan változást idéz elő a H11 és H12 hélix hosszában és pozíciójában, amely hozzájárul fehérjék (koregulátorok) kötéséhez (Nagy & Schwabe, 2004; Wurtz et al., 1996).

Az LBD domént a flexibilis híd régió köti a DBD doménhez (Robinson-Rechavi et al., 2003). A híd régió tartalmazza a sejtmag lokalizációs szignált, ezenkívül a DNS kötésben is szerepe van (Haelens et al., 2007). A híd régió kevésbé konzervált a magreceptorok között. Gyakran történnek poszttranszlációs módosítások ebben a régióban, és koregulátorokkal való kötődésben is szerepet játszik ez a domén (Jeong et al., 2004; Nishizawa et al., 2002; Pourcet et al., 2010).



2. ábra: A magreceptorok domén struktúrájának bemutatása néhány példán keresztül. Rövidítések: DBD: DNS-kötő domén, LBD: ligand-kötő domén.



3. ábra: Magreceptor domének kristály szerkezetének bemutatása az ösztrogén receptor alfa példáján keresztül. A) Az ösztrogén receptor alfa kristályszerkezete. B) Az ERα ligand kötő doménje DES liganddal. C) DNS-kötő domén cinkujjának sematikus ábrázolása. A cink molekula négy cisztein által van közrefogva (C4 típusú). A „P-box” kötődik az AGGTCA DNS szekvenciához, míg a „D-box” fehérje-fehérje interakcióban vesz részt. (Ábra forrása: Gomperts et al., 2009)

A magreceptorok DBD-je két C4 típusú cinkujjból tevődik össze (J W Schwabe & Rhodes, 1991). A C4 azt jelenti, hogy a cink atomot négy cisztein aminosav veszi körbe, ahol a cinknek a fehérje szerkezet stabilitásának kialakításában van szerepe (Claessens & Gewirth, 2004). A szteroid receptorok DBD-jének első cinkujjában lévő P-box (EGCKA) határozza meg a DNS felismerés specifikusságát (Umesono & Evans, 1989), míg a második cinkujjában lévő D-box (PATNQ) a fehérje-fehérje interakciók (dimerizáció) kialakulásáért felelős (Zechel et al., 1994). A P-box ismeri fel az 5'-AGGTCA-3' szekvenciát a DNS nagy árkában. Más szteroid receptorokban lévő P-box GSCKV aminosav szekvenciával az 5'-AGAACA-3' DNS szekvenciát ismeri fel. EGCKG szekvenciájú P-box olyan magreceptorokban van, amelyek RXR-rel heterodimerizálnak. Nem szteroid receptoroknak is van P-box-a, azonban a D-box hiányzik. A DBD C-terminális vége a CTE, amely további bázis specifikus kötést hoz létre a DNS kis árkával (Meinke & Sigler, 1999; Solomon et al., 2005; Weikum et al., 2016; Wilson et al., 1992; Zhao et al., 1998).

1.3. Magreceptorok DNS válaszadó elemei

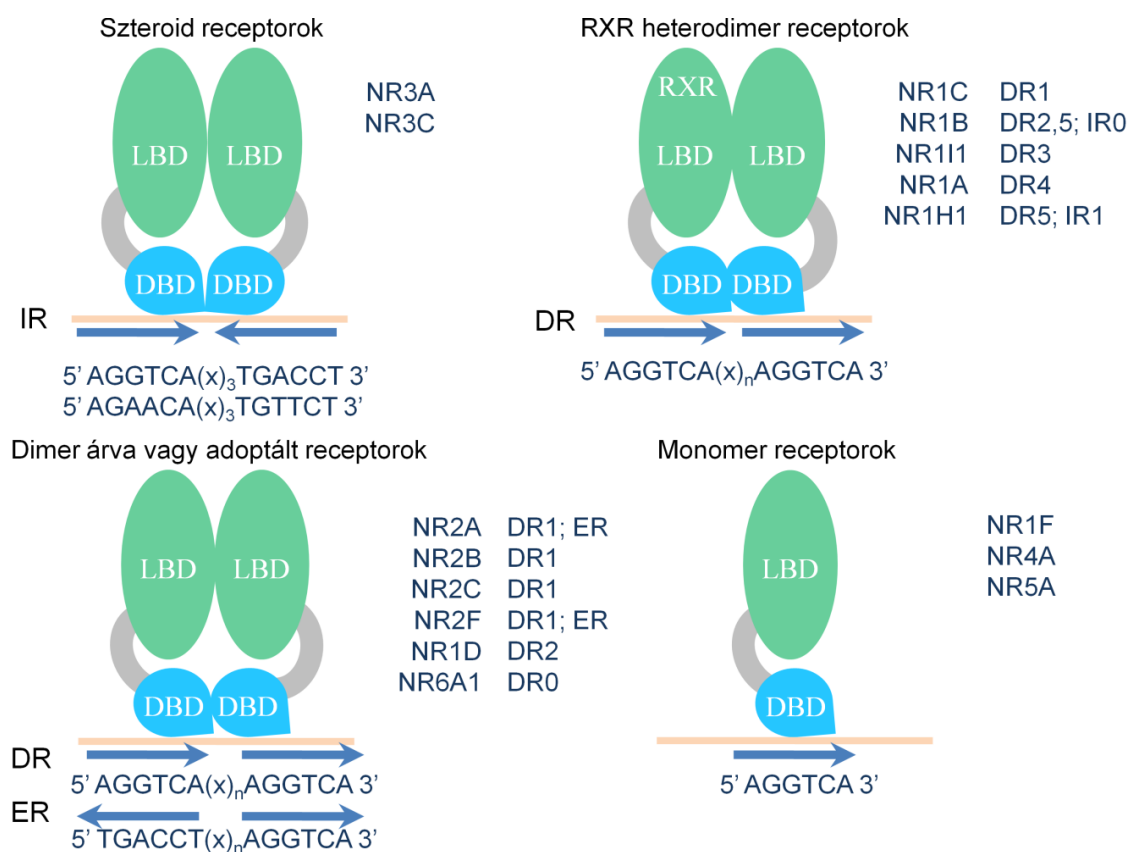
A magreceptorok mint transzkripciós faktorok DNS kötő doménjükön keresztül képesek egy adott specifikus DNS szekvencia motívumot felismerni, melyet nagymértékben meghatároz a fent említett P-box aminosav szekvenciája. A magreceptorok általában az 5'-AGGTCA-3' szekvenciához kötődnek. Mivel a magreceptorok jelentős része dimerként kötődik a DNS-hez, így két ilyen egymást követő szekvenciát ismernek fel. Ezért önmagában ezt az AGGTCA szekvenciát félhelynek is nevezik. A magreceptorok DNS válaszadó elemei két félhelyből állnak, melyek különböző orientációban lehetnek és különböző számú bázispárral vannak elválasztva egymástól (Mangelsdorf et al., 1995). Amikor a magreceptorok dimerként kötődnek, a válaszadó elemeknek három fő típusát különböztetjük meg a félhelyek orientációja alapján (**4. ábra**). Az egyik az „inverted” úgynevezett fordított ismétlődések (IR), ahol a félhelyet a félhely tükörképe (palindrom szekvenciája) követ.

Ezekhez homodimer formában főként szteroid receptorok kötődnek. A másik fő típus a direkt ismétlődések (DR), ahol a félhelyet félhely követ orientációváltozás nélkül. A direkt ismétlődéshez a magreceptorok homodimerként vagy heterodimerként (RXR-ral) képesek kötődni. Az RXR DBD-je mindig a partnere kötőhelyének az 5' vége felől helyezkedik el (Zechel et al., 1994). A direkt ismétlődésekben 1-5 bázispárnyi szakasszal lehetnek elválasztva az NR félhelyek (DR1-5). Egy bázispárnyi elkülönülés 3.4 Å távolságot és $\sim 35^\circ$ relatív elfordulást jelent (Khorasanizadeh & Rastinejad, 2001). RXR-PPAR heterodimer vagy HNF4-HNF4 homodimer DR1, RXR-RAR DR2 és DR5, míg a RXR-VDR DR3 kötőhelyet képes felismerni (**4. ábra**). A harmadik típusban a félhelyet a félhely palindrom szekvenciája előzi meg, melyet „everted” ismétlődésnek (ER) nevezünk. A két félhely között tetszőleges számú bázispár előfordulhat. „Everted” ismétlődéshez például homodimerizált tiroid magreceptor képes kötődni. Vannak olyan magreceptorok (LRH1, NGF1-B és SF-1) is, amelyek monomerként kötődnek a félhelyhez (Little et al., 2006; Weikum et al., 2016). Ezek a receptorok a CTE elemüket is használják a stabilabb kötés érdekében.

A válaszadó elemekben egyetlen nukleotid cseréje is jelentős változást idéz elő a kötés affinitásban és konformációban (Isakova et al., 2016; Osz et al., 2015; J W Schwabe et al., 1995). A DNS hasonlóan a ligandhoz a magreceptorok alloszterikus regulátoraként működik, ugyanis a DNS strukturális és dinamikus változásokat okoz a magreceptorok DBD-jében (Meijsing et al., 2009; Osz et al., 2019). A glükokortikoid receptor esetében leírták, hogy a válaszadó elem által létrehozott változások a GR-ben megváltoztatják a dimerizációs felületet és koregulátorok kötődését, így pozitív és negatív hatást gyakorol egy adott gén kifejeződésére (Hudson et al., 2016; Surjit et al., 2011; Watson et al., 2013; Weikum et al., 2017).

A promóter régióban (transzkripció start hely (TSS) $\pm$ 1000 bázispár) elhelyezkedő válaszadó elemek közvetlenül hatnak az adott gén kifejeződésére. A promótertől távolabbi

régiókban található magreceptor válaszadó elemek esetében a kromoszóma konformációja a mérvadó az adott gén szabályozását illetően. A kromatin hurkok vizsgálata megerősíti, hogy a magreceptorok részt vesznek nagy hatótávolságú hurkok kialakításában is (ER α ChIA-PET) összekötve ezzel a távoli régióban található válaszadó elemet a gén promóterével (Fullwood et al., 2009). Újabb teljes genom szintű vizsgálatok azt is mutatják, hogy a magreceptorok kötődése nemcsak a rájuk specifikus válaszadó elemeken történik, hanem egyéb magreceptor kötőhelyen is (Carroll et al., 2006). Egy adott magreceptorra jellemző DNS kötőhelyek összességét a genomban cisztromnak nevezzük (T. Liu et al., 2011).



4. ábra: Magreceptorok dimerizációja és DNS válaszadó elemeik. IR: „inverted” fordított ismétlődés, DR: direkt ismétlődés; ER: „everted” ismétlődés

1.4. Magreceptorok által mediált transzkripció és koregulátorok szerepe

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 hősokk fehérjék (Hsp70 és Hsp90) segítségével dimerizálódnak és megkötik a ligandjukat (Picard et al., 1990). A ligand kötődése olyan konformáció változásokat okoz a magreceptor híd és LBD-jében, amely majd a sejtmagba való transzlokációt segíti elő (Lorenz et al., 2014). Miután leváltak a magreceptorok a hordozó fehérjékről, a sejtmagban a specifikus DNS válaszadó elemekhez kötődnek, és homodimerként szabályozzák a transzkripciót. Ligand kötött magreceptorok nem minden esetben kötődnek közvetlenül a DNS-hez, ilyenkor tipikusan a híd régiójával más transzkripciós faktorokkal komplexben kötődik a kromatinhoz (Hong et al., 2008; M. H. Liu et al., 2008). A DNS-hez való kötődést követően a magreceptorokhoz számos fehérje fog kötődni, melyeket gyűjtőnéven koregulátoroknak nevezünk, amelyeknek két fő típusa a koaktivátor és a korepresszor (Lonard et al., 2007; Millard et al., 2013). A koaktivátorok hozzájárulnak a transzkripciós aktivációhoz azáltal, hogy olyan fehérje komplexek fognak hozzákapcsolódni, amelyek a kromatin hozzáférhetőségét vagy nyitottságát segítik (Lonard & O'Malley, 2005). A korepresszorok ellenkező hatást fejtenek ki, azaz a transzkripciót gátolják, olyan fehérjék kötődésével, amelyek zárt, kevésbé hozzáférhető kromatin struktúrát hoznak létre. Az irodalomban közel 300 koregulátorról számoltak be, amelynek a listája a NURSA honlapján elérhető (<https://www.nursa.org/nursa/molecules/index.jsf>). Eukarióta sejtekben, a DNS sejtmag fehérje komplexekkel (hisztionokkal) szerveződve alkotja a kromatint, így tömörítve a DNS mennyiségét egy háromdimenziós struktúrába. Ahhoz, hogy a DNS hozzáférhetővé váljon, különböző poszttranszlációs módosítások szükségesek a hisztion fehérjéken. A koregulátorokhoz olyan további fehérjék fognak kapcsolódni, amelyek szabályozzák ezt a

hozzáférhetőséget. A koaktivátorok olyan hiszton módosító enzimeket kötnek, mint például a hiszton acetiltranszferáz (HAT) vagy hiszton metiltranszferáz (HMT) aktivitással rendelkező fehérjék (Bulyenko & O'Malley, 2011), míg a korepresszorok ennek az ellenkezőjét, például hiszton deacetilázokat kötnek (Hu & Lazar, 2000).

A magreceptorok másik csoportját képezik azok a magreceptorok (RAR, PPAR), melyek gyakran ligand nélkül kötődnek a DNS válaszadó elemekhez korepresszorokkal és kromatin módosító enzimekkel együtt a DNS-t kevésbé hozzáférhető állapotban tartják (Glass & Rosenfeld, 2000). Ligand kötődés hatására olyan konformáció változás történik a magreceptoron belül, amely által a korepresszorok koaktivátorokra fognak lecserélődni létrehozva egy transzkripciósan aktív állapotot (Y. Li et al., 2003; Nagy & Schwabe, 2004).

A magreceptorok koregulátorokkal, hiszton és kromatin módosító enzimekkel és egyéb transzkripciós faktorokkal olyan transzkripciós komplexeket hoznak létre, amely asszociál az alap transzkripciós gépezettel, így kialakítva az úgynevezett „transzkripciós gyárat” (Lonard et al., 2007; McKenna et al., 1999; Tata, 2002). Mivel a koregulátorok fontos szerepet játszanak a magreceptorok funkciójában, így a különböző megbetegedésekben egyre kiemeltebb szerepet kap ezeknek a vizsgálata.

1.5. 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 öszttron (E1), az öszttradiol (E2) és az öszttriol (E3) alkotja, melyek közül a keringésben az 17 β -öszttradiol a legjelenősebb. 17 β -öszttradiol kötődik a legnagyobb affinitással az ösztrogén receptorhoz (Gruber et al., 2002). Az ösztrogént az egyik legfontosabb női nemi hormonok egyikeként azonosították, azonban mára világosan látszik, hogy nemcsak a női reproduktív rendszerben van szerepe, hanem egyéb szövetekben (neuroendokrin, vaszkuláris, váz- és immunrendszerben) is mindkét nemben. Az ösztrogén számos olyan betegséggel kapcsolható össze, mint például az elhízás, metabolikus szindróma, osteoporózis, szisztémás lupus erythematosus (SLE), endometriózis és számos daganattípus (Burns & Korach, 2012; Deroo & Korach, 2006; Hamilton et al., 2017). Az ösztrogén biológiai hatását az ösztrogén receptorhoz való kötődésével mediálja.

Az ER α -t először 1985-ben klónozták (Walter et al., 1985). Az ER α teljes kristályszerkezetének meghatározása a méretéből és flexibilis régióiból adódóan bonyolult volt, így először a DBD-jének a szerkezetét írták le 1993-ban (John WR Schwabe et al., 1993), majd később az LBD-je szerkezetét agonista és antagonist ligandjával együtt (Brzozowski et al., 1997). Technika fejlődésének köszönhetően krio-elektronmikroszkóppal sikerült háromdimenziós képet kapnunk az ER α szerkezetéről DNS-sel és két koregulátorral (SRC3 és p300) való kötődésével együtt (Yi et al., 2015). A többi magreceptorhoz hasonlóan hat funkcionális doménből áll. A krio-elektronmikroszkópos kép alapján azt láthatjuk, hogy az ER α A/B régiójának szerepe van a koaktivátorok kötődésében (Yi et al., 2015). DBD doménjével pedig specifikus DNS válaszadó elemhez 5'-GGTCAnnnTGACC-3' képes kötődni nagy affinitással, ezt a motívumot ösztrogén válaszadó elemnek, ERE-nek hívjuk (Seilcr-Tuyns et al., 1986). A receptor flexibilis híd régiója ER α interakciók allosztérikus módosítója (Kumar & McEwan, 2012), továbbá hatással van a transzkripció szabályozásra,

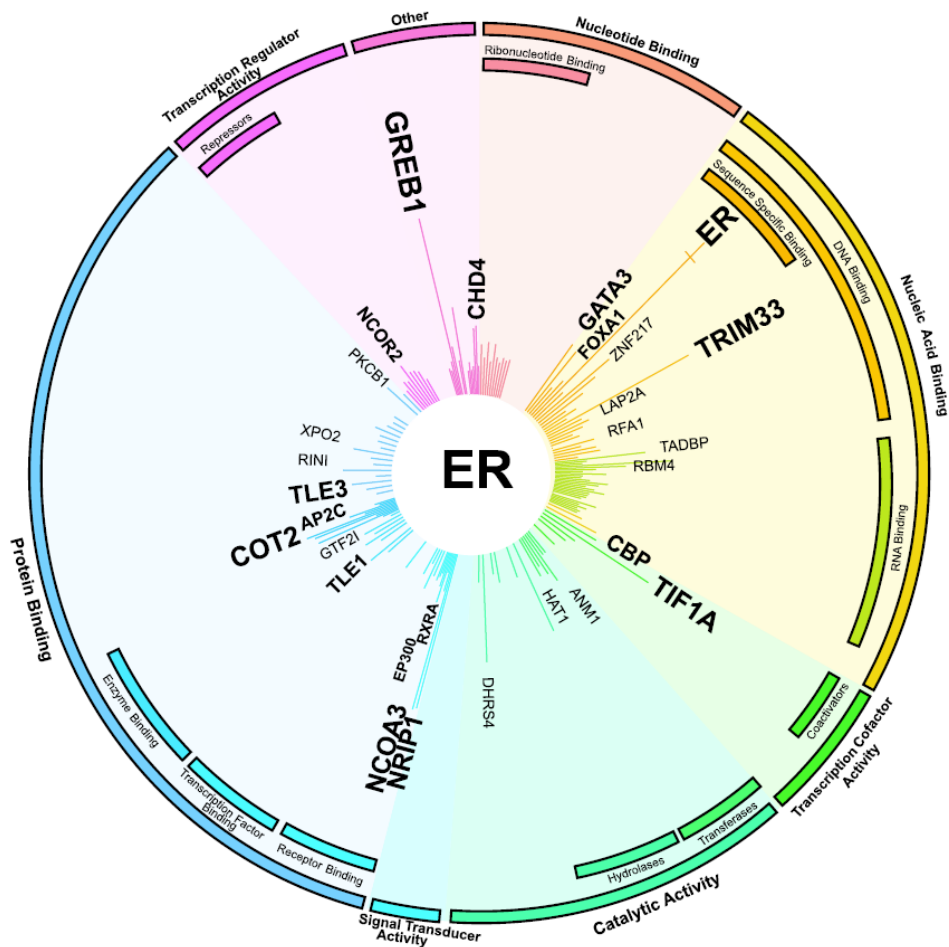
ugyanis olyan poszttranszkripció módosításai lehetnek ennek a régióknak, mint például a szumoiláció vagy p300 mediált acetiláció (Le Romancer et al., 2011; Sentis et al., 2005; C. Wang et al., 2001). LBD doménjével nagy affinitással képes kötni az ösztradiolt (K_D 0.1 nanomól tartományban) (Kumar & McEwan, 2012). Továbbá köt olyan ligandokat is, mint az endogén ösztrogének (ösztroon, ösztriol), természetes ösztrogének, szintetikus ösztrogének (DES), fitoösztrogének (genisztein), szelektív ösztrogén receptor modulátorok (tamoxifen, raloxifen) és szelektív ösztrogén receptor lebontók (fulvestrant) (Farooq, 2015; McDonnell & Wardell, 2010). Meg kell még említeni a receptor F doménjét, mely a többi magreceptor esetében nem jellemző. Viszonylag keveset tudunk ennek a funkciójáról, valószínűleg az intramolekuláris interakciókban és fehérje stabilitásban van szerepe (Skafar & Zhao, 2008). Nemrégiben megjelent tanulmányban kimutatták, hogy a tamoxifen mediált transzaktivációban van szerepe faj specifikus módon (Arao & Korach, 2018).

Ösztradiol (E2) hatására a szteroid receptorokra jellemző mechanizmus játszódik le, azaz közvetlenül a genomhoz kötődve az ERE motívumon keresztül fejti ki hatását (Hah & Kraus, 2014). Ezenkívül ismert még, hogy más transzkripció faktorokon (AP-1 elemen keresztül a FOS/JUN dimerhez kötődve) keresztül fejti ki szabályozó hatását (Kushner et al., 2000). Az ER α -nak ismertek nem genomi úton megvalósuló szabályozó mechanizmusai is. 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 (Levin, 2015; Prossnitz & Hathaway, 2015). A másik pedig, amikor E2 hiányában egy ligand független aktiváció történik, ilyenkor a jel foszforiláció formájában egyéb jelátviteli útvonalakból (például EGF vagy IGF1) származik (Bennesch & Picard, 2015).

1.5.1. ER α által mediált szabályozási program

Az új-generációs szekvenálási eljárásoknak köszönhetően közelebb kerülhettünk az ER α általi szabályozás megismeréséhez teljes genom szinten. Számos tanulmány feltérképezte az ER α cisztromját különböző emlődaganat sejtekben és betegekből származó mintákból is (Carroll et al., 2006; C. Y. Lin et al., 2007; Ross-Innes et al., 2012). Ezek alapján azt láthatjuk, hogy az ER α jelen van promóter régiókban is (TSS $\pm$ 1kb), de az ER α kötődések nagyrésze távol a transzkripció start helytől (TSS) történik akár >100 kilobázis távolságra. Ezek a távoli ER α kötött DNS régiók aktív hiszton módosításokkal (például H3K27ac és H3K4me1) és transzkripciót mediáló faktorokkal enhanszerként működnek. A távoli enhanszer régiók kromatin hurkok segítségével kerülnek közelebb az adott gén promóter régiójához. A kromatin hurkok magukban foglalnak enhanszer RNS képződést és CTCF-kohezin komplex jelenlétét, megkönnyítve az enhanszer-promóter interakció kialakulását, így befolyásolva az adott gén aktivitását (Hah et al., 2013; W. Li et al., 2015). Jól karakterizált, távoli ER α kötött enhanszerrel régióval szabályozott gének például a *TFF1* (Theodorou et al., 2013; F. P. You et al., 2008), *GREB1* (Deschênes et al., 2007; Fullwood et al., 2009), *CA12* (Barnett et al., 2008) és *PGR* (Bonéy-Montoya et al., 2010). Korábbi tanulmányok arról számoltak be, hogy az ER α által kötött enhanszerekhez további transzkripció faktorok tudnak kötődni kialakítva 1-2 MDa-os komplexet. A komplexben jelenlévő transzkripció faktorok és koaktivátorok nagy része fehérje-fehérje interakcióban vesz részt, úgynevezett „transz” módon kapcsolódnak egymáshoz, így MegaTransz komplexnek nevezték el (Z. Liu et al., 2014). Az ER α által mediált MegaTransz komplexben a FOXA1, mint úttörő faktor játszik szerepet azáltal, hogy közvetlenül a DNS-hez kötődve („cisz” módon) segíti az ER α kötődését. A komplexben transz módon jelen van még a GATA3, AP2 γ , egyéb koaktivátorok mint a DNS-függő protein kinázok, p300 és Med1 (RNS polimeráz II transzkripció mediátorának 1-es alegysége). Ezeken az enhanszereken lévő komplexek gyakran szuper-

enhanszerek részét képezik. A szuper-enhanszerek több enhanszer csoportosulása egy rövid régióon belül, melyek transzkripcionálisan aktív részét képezik a gének kifejeződésének (Whyte et al., 2013). Ezeket hívják még „forró pontoknak” vagy klaszter enhanszereknek is (Rada-Iglesias et al., 2012; Siersbæk, Baek, et al., 2014; Siersbæk, Rabiee, et al., 2014; Yan et al., 2013). Ezeknek a szuper-enhanszerek a kialakulásában meghatározó szerepet tölt be az ERE motívumot tartalmazó „anya enhanszereken” lévő ER α jelenléte ligand kezelés nélkül, majd E2 kezelés hatására az anya enhanszer körül további ER α kötődés jön létre „leány enhanszereken”. Erről a lehetséges mechanizmusról munkacsoportunk számolt be (Bojcsuk et al., 2017). Hisham Mohammed és munkatársai endogén fehérjék gyors immunprecipitációját követő tömegspektrometriát (RIME) alkalmazva azonosították az ER α -asszociált kofaktorokat (Mohammed et al., 2013). Az azonosított 108 kofaktor között jelen van a jól ismert FoxA1, TLE1, AP2- γ , GATA3, p300, NCOA3, NRIP1 és RAR (Carroll et al., 2005; Holmes et al., 2012; Ross-Innes et al., 2010; Tan et al., 2011; Theodorou et al., 2013) (**5. ábra**). Ezek mellett kevésbé ismert transzkripciós asszociációt találtak az ER α -val GREB1 és COT2 (COUP-TFII) esetében. Mivel keveset tudunk az ER α és COUP-TFII közötti transzkripcionális kapcsolatról, így munkánk egyik célja ennek a kapcsolatnak a tanulmányozása.



5. ábra: ER α komplexben résztvevő koregulátorok. (Mohammed et al., 2013)

1.6. COUP-TFII árva magreceptor

Csirke ovalbumin gén 5' vég felőli promóterhez kötődő transzkripció faktor 2 (COUP-TFII, egyéb nevei az NR2F2, ARP-1, COT2) a szteroid/tiroid magreceptor család tagja (Lee Ho Wang et al., 1989). COUP-TF fehérjét először 1980-as években izolálták HeLa sejtmag kivonatból (Sagami et al., 1986). A 1990-es évek elején pedig két független csoportnak sikerült elkülöníteni a COUP-TFII-t a COUP-TFI-től (Ladas & Karathanasis, 1991; L H Wang et al., 1991), ami azért volt kihívás, mert a két fehérje szekvenciája nagyon hasonló. A két fehérje aminosav szekvenciája alapján a DBD-jük 98%-ban, míg az LBD-jük 96%-ban egyezik és nem csak a két fehérje között láthatunk nagymértékű hasonlóságot, hanem evolúciósan is, ugyanis több mint 90%-os egyezést figyelhetünk meg egyéb gerincesek és gerinctelenek ortológjaihoz viszonyítva (Yuhong Qiu et al., 1994). A humán és egér COUP-

TFII aminosav szinten 100% azonosságot mutat (Y. Qiu et al., 1994), továbbá *Drosophila* 1-es típusú svp fehérje és humán COUP-TF DBD-je között 94% és az LBD-je között 93% azonosság van (Mlodzik et al., 1990). Mindez azt feltételezheti, hogy a COUP-TF fehérjék a magreceptor család egyik legősibb tagjai (Yuhong Qiu et al., 1994). A COUP-TFII-t általánosságban árva magreceptorként tartjuk számon, mert természetes ligandja még nem ismert, de retinsav képes strukturális aktivációt okozni a COUP-TFII LBD-jében *in vitro*, azonban ez a retinsav koncentráció bőven a fiziológiás szint fölött van (Kruse et al., 2008). A COUP-TFII a többi magreceptorhoz hasonló DBD-jével egy specifikus DNS szekvencia motívumot képes felismerni. A konszenzus COUP-TFII kötőhely az AGGTCA direkt ismétlődése egy nukleotiddal elválasztva (DR1), azonban a COUP-TF fehérjék nagyon flexibilisek a DNS-hez való kötődésük során (Cooney et al., 1992; C M Klinge et al., 1997; Carolyn M. Klinge, 1999; F A Pereira et al., 2000). A relatív kötés affinitásuk sorrendje a direkt ismétlődésekhez *in vitro* a következő: DR1, DR6, DR4, DR8, DR0 és DR11, de a konszenzus szekvenciához képes „inverted” vagy „everted” ismétlő (IR és ER) módon is kötni (Cooney et al., 1992). Mindezen okokból kifolyólag a COUP-TF képes felismerni a magreceptor család egyéb tagjainak, mint például TR, RAR, VDR, HNF4 vagy ER α (Cooney et al., 1993; C M Klinge et al., 1997; Stroup & Chiang, 2000; Tran et al., 1992) kötőhelyét, ezzel versengést kialakítani a kötőhely hozzáférhetőségéhez. A COUP-TFII a DNS válaszadó elemekhez homodimer vagy COUP-TFI-el heterodimer formában képes kötődni (L H Wang et al., 1991). Számos tanulmány kimutatta a COUP-TFII heterodimerizációját más magreceptorral (RXR, TR vagy RAR) *in vitro* (Cooney et al., 1992; Kliewer et al., 1992; Tran et al., 1992), azonban *in vivo* kísérletekkel ezt nem sikerült megerősíteni (Butler & Parker, 1995). Az utóbbi évek tanulmányai pedig azt mutatják, hogy a COUP-TFII a TR4 magreceptorral GGGTCA motívumok DR0, DR6 és DR7 ismétlődéseire képesek kötődni alternatív telomer meghosszabbodásra képes daganatsejtek (ALT+ daganatsejtek) telomer

régiójában (Déjardin & Kingston, 2009; Marzec et al., 2015; M. Xu et al., 2019).

1.6.1. COUP-TFII fiziológiás szerepe

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) (F.-J. Lin et al., 2011). COUP-TFII^{-/-} homozigóta knock-out egér a fejlődés embrionális 10. napja körül meghal szív- és érrendszeri zavarok, illetve angiogenesis defektusa miatt (Fred A. Pereira et al., 1999). Angiogenesisben 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), Angpoietin-1/Tie2 és Notch gének kifejeződése (Chen et al., 2012; Kang et al., 2010; F.-J. Lin et al., 2010; Nagasaki et al., 2009; Qin, Chen, Xie, et al., 2010; Qin, Chen, Yu-Lee, et al., 2010; L. R. You et al., 2005). COUP-TFII^{+/-} heterozigóta knock-out nőstény egereknek a szaporodási traktusában jelentkeztek problémák a vadtypushoz képest, míg a hím egyedeknek a termékenysége normális maradt (Takamoto et al., 2005). COUP-TFII^{+/-} heterozigóta knock-out egereknek a metabolikus folyamatainak vizsgálatánál azt találták, hogy a COUP-TFII^{+/-} mutáns egereknek kevesebb fehér zsírszövete van, ellenállóbbak az elhízás és inzulin rezisztencia ellen, jobb a glükóz homeosztázisuk és energia felhasználásuk, mint a vadtypusú egyedeknek (L. Li et al., 2009). COUP-TFII minden emberi szövetben expresszálódik, magas expressziós szintet mutat endokrin, metabolikus, reprodukzív és kardiovaszkuláris szövetekben (Bookout et al., 2006).

1.7. 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. A magreceptorok kritikus szabályozói a daganatsejteknek, ugyanis kiváló terápiás célpontok lehetnek, ha ligandként gyógyszert jutattunk a sejtekhez. Mindezen túl bizonyos magreceptorok jelenléte kapcsolatban van a betegek túlélésével és kezelésével. Erre az egyik legjobb példa az ösztrogén és progeszteron receptor 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 első ilyen SERM az ICI 46474 volt, amelynek mérsékelt hatása volt a termékenységre, mégis ígéretes daganatellenes szernek vélték (Cole et al., 1971). Ez a SERM később a tamoxifen nevet kapta, majd 1970-es években elkezdték emlődaganatos betegek kezeléséhez használni (Ward, 1973). A tamoxifen az ER α LBD-jéhez kötődik, meggátolva ezzel az ösztrogén kötődését, így blokkolva a hormonfüggő daganatsejtek proliferációját és tumor kialakulását (Gottardis et al., 1988). Manapság a tamoxifent számos nem kívánt mellékhatással (endometriális daganat, véralvadási zavarok) hozták összefüggésbe, így teret engedve új generációs SERM-ek (raloxifen, bazedoxifen) megjelenésének és használatának. SERM-ek mellett megjelentek szelektív ösztrogén receptor lebontók (SERD-ek), aromatáz és szulfatáz inhibitorok ER jelátviteli útvonalak célpontjához (Saha et al., 2019). Mindezek ellenére a betegek ~40%-ánál endokrin rezisztencia jelenik meg, ami a daganatos megbetegedés kiújulásához vezet (Clarke et al., 2003). Az endokrin rezisztenciának kialakulásához számos tényező hozzájárulhat. Egy tanulmány alapján az emlődaganat sejtek endokrin szenzitivitásának fenntartásában fontos szerepet játszhat a COUP-TFII is (Riggs et al., 2006). A COUP-TFII alacsony expressziót

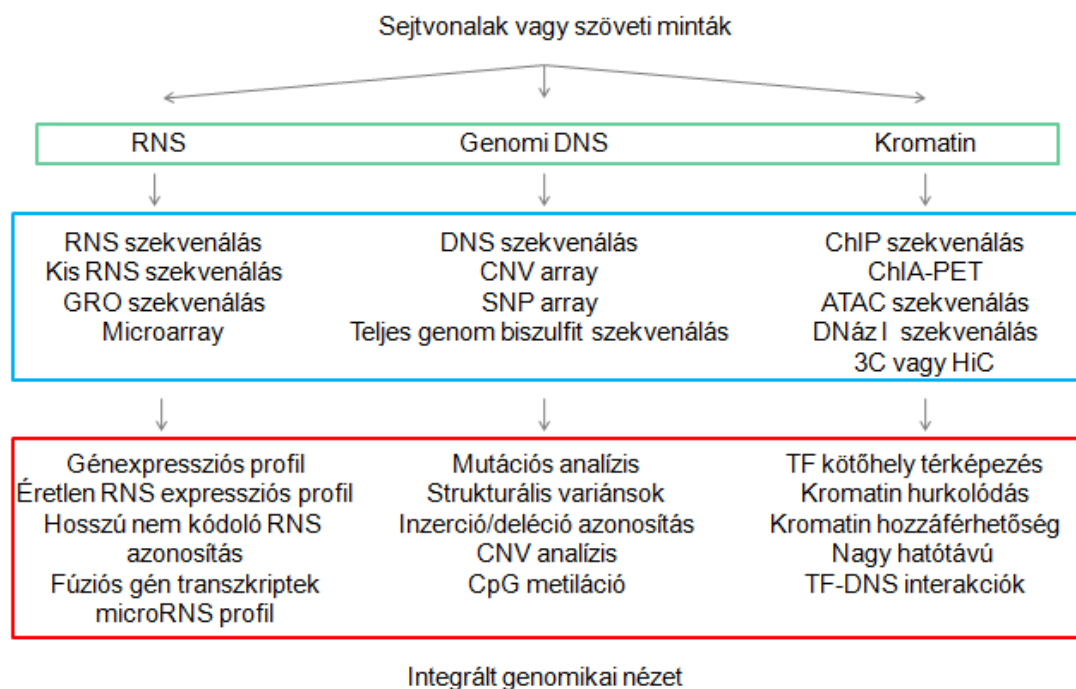
mutat tamoxifen-rezisztens humán emlődaganat sejtekben, azonban a COUP-TFII újraexpresszáltatása ezekben a sejtekben visszaállítja a tamoxifenre való érzékenységet. Egy másik tanulmányban pedig azt mutatják, hogy a COUP-TFII sejt és gyógyszer típusfüggő módon van hatással a kemorezisztenciára emlődaganat sejtekben (C. Zhang et al., 2014). Emlődaganatos betegekben a COUP-TFII expressziós szintjének jelentőségére nincs konkrét következtetés, mivel különböző tanulmányok eltérő eredményeket mutatnak (Nagasaki et al., 2009; C. Zhang et al., 2014). A COUP-TFII expressziójának szerepét egyéb daganatos megbetegedésekben is vizsgálták, például prosztatadaganatban (Qin et al., 2013), gyomordaganatban (Ding et al., 2018), kolorektális daganatban (Shin et al., 2009; Yun et al., 2017), hasnyálmirigy adenokarcinómában (Polvani et al., 2014) és petefészekdaganatban (Hawkins et al., 2013). Ezekből azt láthatjuk, hogy a COUP-TFII prognosztikai jelentősége tanulmányoktól és daganat típusától függően eltérő, pontos szerepe még nem ismert.

1.8. Funkcionális genomikai eszközök magreceptorok általi szabályozások feltérképezéséhez

Az elmúlt évtizedekben a genomi technológiák olyan fejlődésen mentek keresztül, mely megengedi a magreceptorok általi génszabályozások jobb megértését teljes genom szinten. A módszerek többsége a DNS microarray alapú módszerekből fejlődött ki, de ma már az új generációs szekvenálás (NGS) a legelterjedtebb. Funkcionális genomikai módszerekkel lehetővé vált a génexpresszióban, kötések célhelyében, DNS metilációban és kromatin hozzáférhetőségben történő változások nyomon követése. Génexpressziós adatokkal, DNS szekvenálási adatokkal és kromatin jellegzetességekből (poszttranszlációs módosítások jelenléte) származó adatokkal globális képet kaphatunk a magreceptorok általi szabályozó folyamatokról (**6. ábra**), ami befolyásolhatja a klinikusok döntését a megfelelő terápia kiválasztásához. A magreceptorok, koregulátorainak és egyéb DNS-kötő fehérjék kötőhelyeinek feltérképezése kromatin immunprecipitációt követő szekvenálással (ChIP-Seq)

lehetséges. Hiszton módosítások jelenlétének vizsgálatával megállapíthatjuk a kromatin állapotát, mely közvetlenül befolyásolja a transzkripciót azáltal, hogy a zárt kromatin kevésbé hozzáférhető transzkripciós faktorok számára, míg a nyitott kromatin segíti ezeknek a faktoroknak a kötődését a DNS-hez. A kromatin immunprecipitáció (ChIP) fehérje és DNS közötti interakción alapul (Johnson et al., 2007). A módszer során a sejteket formaldehiddel fixáljuk, majd a szonikálással vagy enzimes emésztéssel a kromatint fragmentáljuk. A vizsgálni kívánt fehérjére specifikus, mágneses gyöngyökhöz kapcsolt antitesttel immunprecipitáljuk a fragmenteket, majd különböző só koncentrációjú puffert alkalmazva ki tudjuk szelektálni a vizsgálni kívánt fehérjénk által kötött fragmenteket. Ezután jön a keresztkötések feloldása, fehérje és RNS emésztés, majd a DNS izolálás. A tisztított DNS-t a könyvtárkészítés után megszekvenáljuk. A szekvenálás után komplex bioinformatikai elemzések következnek, mely a szekvencia leolvasások minőség-ellenőrzését, a megfelelő genomhoz való illesztését és a csúcsok, azaz a kötőhelyek predikcióját jelenti. A csúcsok a szekvenálási leolvasások méretbeli eltolódásának empirikus modellezéséből származnak (Y. Zhang et al., 2008). 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 mélysége (Park, 2009). Kontrollként használhatunk input DNS-t, mely az immunprecipitáció előtt eltávolított kis mennyiségű DNS minta, vagy IgG-vel immunprecipitált DNS-t. 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.



6. ábra: Funkcionális genomikai eszközkészlet. (Dhiman et al., 2018)

2. CÉLKITŰZÉSEK

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. *In vitro* kísérletek

3.1.1. Sejtek tenyésztése és kezelése

Az MCF-7 sejteket a Hitelesített Sejt Kultúrák Európai Gyűjteményétől (ECACC) szereztük be, míg a T47D sejteket ajándékba kaptuk Uray Iván munkacsoportjától. MCF-7 és HEK293T sejtek DMEM médiumban voltak tenyésztve, melyet kiegészítettünk 10% FBS-sel, 1% L-glutaminnal és 1% penicillin-streptomycinnel. T47D sejteket RPMI-1640 médiumban tenyésztettük, melyet szintén kiegészítettünk 10% FBS-sel, 1% L-glutaminnal és 1% penicillin-streptomycinnel.

3.1.2. Genetikailag módosított sejtek létrehozása

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. A következő pontosítások fűzhetők a protokollhoz. $2,5 \times 10^4$ sejtet transzdukáltunk MOI=5-nek megfelelő térfogatú vírussal, és 5 µg/µl végkoncentrációjú polibrénnel kiegészítve. A fertőzés 16-24 óráig tartott, majd a vírus eltávolítása után 24 órával kezdődött meg a szelekció 2 µg/ml puromycinnel. Megfelelő sejtszám elérése után a sejteket további kísérleti folyamatokhoz használtuk fel.

3.1.3. Fág termelés poliklonális antitest epitópjának leképezéséhez

New England Biolabs (Ph.D.TM-7 Phage Display Peptide Library Kit) előre elkészített 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 könyvtárat 1 ml TBST/BSA (1% BSA tartalmú TBST) pufferrel előblokkoltunk 30-60 percen keresztül szobahőmérsékleten. A blokkolt fághoz 10 μ g antitestet adtunk és rotátoron inkubáltuk 10-60 percen keresztül szobahőn. 50 μ l Protein A és Protein G konjugált mágneses gyöngyöt kétszer mostuk TBST/BSA pufferrel, majd 50 μ l mágneses gyöngyöt adtunk az antitest-fág komplexhez. A reakció elegyet 20 percig inkubáltuk szobahőn enyhe keveréssel. A gyöngyöket tízszer mostuk TBST/BSA pufferrel, majd kétszer eluáltuk 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 log fázis korai szakaszában megfertőztük és 4,5-5 órán keresztül nem szelektív Luria broth (LB) médiumban 200 rpm-en 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 egy-két órán keresztül jégen. A centrifugált pelletet 200 μ l TBS pufferben vettük fel. A fág partikulák koncentrációjának méréséhez spektrofotométerrel mértük az abszorbanciát 260 nm-en. A fág mennyiségére 1 ml oldatban a következő számításból következtettünk: fágok száma/ml = hígítás $\times$ OD₂₆₀ $\times$ 2,214 $\times$ 10¹¹. Hosszabb idejű tároláshoz 50% végkoncentrációban glicerolt adtunk 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 10⁹-10¹³-szorosra hígítottuk LB médiumban, majd 200 μ l ER2738 baktérium törzset fertőztünk 10 μ l hígított faggal 1-15 percig a log fázis középső szakaszában, majd a fertőzött

sejteket előmelegített LB/IPTG/Xgal lemezekre szélesztettük. A lemezeket 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 AU között) növesztettük, majd a lemezről egy különálló kolóniát 2 ml baktérium kultúrába oltottunk. Ezután a „*Fág amplifikáció*” lépéseit követtük.

3.1.4. Kromatin immunprecipitáció fág kontrollal

A fág kromatin immunprecipitációs kísérlethez a kromatin környezet megteremtéséhez HEK293T sejtől származó kromatint használtunk. A kísérlethez olyan sejtől származó a kromatint kellett használnunk, mely nem expresszálja jelentős mennyiségben a vizsgálni kívánt transzkripció faktort, így nem zavarva az antitest kötőkapacitását. Így 10 millió HEK293T sejtet fixáltunk 1% formaldehiddel 10 percig szobahőmérsékleten, majd a reakciót 0,125 M glicin hozzáadásával állítottuk le 5 percig inkubálva. Ezt követően a sejteket kétszer mostuk jéghideg PBS pufferrel. A sejteket PBS pufferben kapartuk fel, majd a pelletet szonikáló pufferben (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, Proteáz Inhibitor) lizáltuk 10 millió sejt/ml koncentrációban. A minták szonikálása Bioruptor Plus Szonikátor készülékkel történt, melyet 10 ciklusra 30 másodperc be- és kikapcsolással és magas intenzitásra állítottunk be, hogy elérjük a 150-500 bp közötti kromatin fragment méretet. Szonikálást követően a mintát maximális sebességen (15 000 rpm) centrifugáltuk, majd a felülúszót, a kromatint szétosztottuk egyenlő részekre és -80°C-on tároltuk.

A HEK293T kromatinhoz kísérletnek megfelelő térfogatú és mennyiségű (1, 10 és 100 millió) fágot adtunk, majd a kromatin-fág mixet antitest (ER α : sc-543X) konjugált mágneses gyöngyökkel precipitáltuk 4°C-on 6 órán keresztül IP pufferrel hígítva (1,1% Triton-X, 0,01% SDS, 167 mM NaCl, 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris-HCl, Proteáz Inhibitor). Ezt követően a mágneses gyöngyökhöz kötődő komplexet egyszer alacsony sótartalmú ChIP mosó pufferrel (A' puffer: 1% Triton-X, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, Proteáz

Inhibitor), egyszer magas sótartalmú ChIP mosó pufferrel (B' puffer: 1% Triton-X, 0,1% SDS, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, Proteáz Inhibitor), egyszer LiCl tartalmú ChIP mosó pufferrel (C' puffer: 1% NP-40, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 1% NaDOC, Proteáz Inhibitor) és kétszer TE pufferrel (1 mM Tris és 1 mM EDTA) mostuk. Az antitest-kromatin komplexet 100 µl elúciós pufferrel (100 mM NaHCO₃, 1% SDS) eluáltuk 15 percig rázatva. A keresztkötések feloldása 400 mM NaCl hozzáadásával és 65°C-on történő inkubációval történt legalább 4 órán át. Ezután a mintákat 10 µg RNázal 37°C-on 30 percig és 10 µg Proteináz K-val 1-2 órát 45°C-on 1000 rpm-en rázva emésztettük. Az immunprecipitált DNS-t High Pure PCR Template Preparation Kitet használva tisztítottuk a gyártó utasításainak megfelelően.

3.1.5. Kromatin immunprecipitáció emlődaganat sejtekből

A kromatin immunprecipitációhoz 15-20 millió emlődaganat sejtvonalból (MCF-7 és T47D) indultunk ki. A sejteket 1% metanolmentes formaldehiddel fixáltuk 10 percig szobahőmérsékleten, majd a fixálást 0,125 M glicinnel 5 percig inkubálva állítottuk le. A sejteket ezután kétszer mostuk jéghideg 1xPBS pufferrel. A sejteket 1 ml ChIP lízis pufferben (1% Triton-X, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, Proteáz Inhibitor) 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, melyet 15 ciklusra 30 másodperc be- és kikapcsolással és magas intenzitásra állítottuk be. A szonikálás után maximális fordulaton (15 000 rpm) centrifugáltunk, majd a felülúszó térfogatának (kromatin) 90%-át vittük tovább immunprecipitációra. Szekvenáláshoz 15-20 millió sejtnek, míg kvantitatív PCR-hez 5 millió sejtnek megfelelő kromatin mennyiséget használtunk. Az immunprecipitáció egy éjszakán át 4°C-on történt a következő antitesteket használva: ER (sc-543X), COUP-TFII (sc-271265X) és IgG (sc-2027X). Szekvenálásra szánt minták esetén az antitestek mennyisége 8 µg, míg

kvantitatív PCR-re szánt minták esetén 4 µg. Az inkubációt követően 3000 g fordulatszámon 20 percig centrifugáltuk a mintákat, majd a felülúszó térfogatának (kromatin) 90%-hoz előblokkolt Protein A és Protein G konjugált mágneses gyöngyöket adtunk. A mintákat ismét inkubáltuk minimum 6 órán keresztül 4°C-on. Ezt követően a mágneses gyöngyökhöz kötődő komplexet mágneses tartóval egyszer alacsony sótartalmú ChIP mosó pufferrel (1% Triton-X, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 0,1% NaDOC, Proteáz Inhibitor), kétszer magas sótartalmú ChIP mosó pufferrel (1% Triton-X, 0,1% SDS, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 0,1% NaDOC, Proteáz Inhibitor), egyszer LiCl tartalmú ChIP mosó pufferrel (0,5% NP-40, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 0,1% NaDOC, Proteáz Inhibitor) és kétszer TE pufferrel mostuk. Az antitest-kromatin komplexet 200 µl eluciós pufferrel eluáltuk 15 percig rázatva. A keresztkötések feloldása 400 mM NaCl hozzáadásával és 65°C-on történő inkubációval történt egy éjszakán át. Ezután a mintákat 10 µg RNázal 37°C-on 30 percig és 10 µg Proteináz K-val 1-2 órát 45°C-on 1000 rpm-en rázatva emésztettük. Az immunprecipitált genomi DNS-t Qiagen MinElute PCR Purification Kitet használva tisztítottuk a gyártó utasításainak megfelelően.

3.1.6. RNS izolálás és RT-PCR

A sejteket RNS izoláláshoz 6 lyukú lemezen növesztettük, majd PBS-sel történő mosás után 0,5 ml Trizolate reagensben vettük fel és 5 percig ráztuk szobahőmérsékleten. A fázis szeparáció 100 µl kloroform hozzáadásával és maximális gyorsaságú centrifugálással történt. Az RNS kicsapását a felső vizes fázisból 375 µl izopropanollal végeztük. Maximális gyorsaságú centrifugálás után (15 000 rpm) az RNS pelletet kétszer mostuk 75%-os jéghideg etanollal. A pelletet ezt követően vákuum-koncentrátorral szárítottuk, majd nukleázmentes vízben oldottuk fel 65°C-on 10 percig. RNS koncentrációmérést NanoDrop segítségével végeztük.

cDNS szintézishez minden esetben 1 µg 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 µl SSII puffer (5x), 2 µl DTT (100 mM), 4 µl dNTP (2.5 mM), 0,08 µl random hexamer (3 µg/µl) és 0,08 µl SSII MnIv enzim (200 U/µl), és 10 µl 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.

3.1.7. Kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR)

Kvantitatív polimeráz láncreakcióhoz 2x SYBR Green Master Mix-et használtunk, melyhez 2.5 µM végkoncentrációban primereket, ROX passzív referencia festéket és nukleázmentes vizet adtunk. A mix végtérfogata 7,5 µl, és ehhez 2,5 µl 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. A felhasznált primerek szekvenciái az **2. táblázat**ban találhatóak meg.

2. táblázat: A felhasznált primerek szekvenciái

Célgén	Egyenes irányú primer	Fordított irányú primer	Kísérlet
M13 univerzális fág specifikus primer	attcactggccgtcgttta	ggcgattaagttgggtaacg	ChIP-qPCR
BAMBI	ggctgcacgatgttctctc	cccgaaccacaactcttt	RT-qPCR
VEGFA	tgtgtgtgtgtgagtggtga	tctctgtgcctcgggaag	RT-qPCR
KRT15	ggtggttcttccacaaga	tgatgagagtggggagtgg	RT-qPCR
HEY2	atgagcataggattccgagagt	ggcaggaggcacttctgaag	RT-qPCR
ACTB	ccctggcaccagcac	gccgatccacaggagtag	RT-qPCR

3.1.8. 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 µg 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.

3.2. Bioinformatikai elemzések

3.2.1. Adatok

MCF-7 és T47D sejtekből származó ER α és COUP-TFII ChIP-Seq és RNS-Seq adatokat mi generáltuk, mely NCBI BioProject ID-ja PRJNA602619. A többi ChIP-Seq és RNS-Seq adat publikusan elérhető adatbázisokból származnak. Más labor által generált adatok jellemzőit és származását a **3. táblázat** foglalja össze.

3. táblázat: Más labor által generált NGS adatok forrásgyűjteménye

Sejtvonal	Módszer	Célfehérje	Adatbázis	Azonosító szám
MCF-7	ChIP-Seq	COUP-TFII	ENCODE	ENCSR000BUY
MCF-7	ChIP-Seq	CTCF	ENCODE	ENCSR000AHD
MCF-7	ChIP-Seq	GATA3	ENCODE	ENCSR000EWS
MCF-7	ChIP-Seq	FOXA1	GEO	GSM2137769
MCF-7	ChIP-Seq	ESR1	GEO	GSM614611
MCF-7	ChIP-Seq	H3K27ac	ENCODE	ENCSR752UOD
MCF-7	ChIP-Seq	H3K4me1	ENCODE	ENCSR493NBY
MCF-7	ChIP-Seq	H3K4me3	ENCODE	ENCSR985MIB
MCF-7	ChIA-PET	CTCF	ENCODE	ENCSR000CAD
K562	ChIP-Seq	COUP-TFII	ENCODE	ENCSR000BRS
K562	ChIP-Seq	CTCF	ENCODE	ENCSR000BPJ
K562	ChIP-Seq	GATA2	ENCODE	ENCSR000BKM
K562	ChIP-Seq	H3K27ac	ENCODE	ENCSR000AKP
K562	ChIP-Seq	H3K4me1	ENCODE	ENCSR000EWC
K562	ChIP-Seq	H3K4me3	ENCODE	ENCSR668LDD
K562	ChIA-PET	CTCF	ENCODE	ENCSR000CAC
K562	ChIA-PET	H3K4me3	ENCODE	ENCSR000FDF
HepG2	ChIP-Seq	COUP-TFII	ENCODE	ENCSR000BVM
HepG2	ChIP-Seq	CTCF	ENCODE	ENCSR000BIE
HepG2	ChIP-Seq	FOXA1	ENCODE	ENCSR000BMO
HepG2	ChIP-Seq	HNF4A	ENCODE	ENCSR000BLF
HepG2	ChIP-Seq	H3K27ac	ENCODE	ENCSR000AMO
HepG2	ChIP-Seq	H3K4me1	ENCODE	ENCSR000APV
HepG2	ChIP-Seq	H3K4me3	ENCODE	ENCSR000AMP

3.2.2. Új generációs szekvenálási adatok elemzése

ChIP-Seq adatok. A ChIP-seq adatok analízise házon belül létrehozott számítógépes elemzési lépések (Barta, 2011) követésével valósult meg. Ezek a lépések nagyvonalakban a következők. A szekvenálási leolvasások Burrows-Wheeler Alignment v0.7.17 (BWA, (H. Li & Durbin, 2009)) programmal voltak a hg19 (GRCh37) genomhoz illesztve. Majd a csúcsok predikciója Model-based Analysis for ChIP-Seq (MACS2, (Y. Zhang et al., 2008)) v2.1.1 programmal történt. Az általunk generált ER α és COUP-TFII ChIP-Seq adatok csúcs predikciója HMCAN programmal (transzkripció faktor módban) történt a DNS amplifikációk miatti torzítások kiküszöbölése végett (Ashoor et al., 2013). A műtermékek az ENCODE által elérhető lista alapján lettek kiszedve Bedtools v2.27.1 (intersectBed) programmal (Quinlan & Hall, 2010). ENCODE által elérhető ChIP-Seq adatok esetén lefedettség (RPKM) alapján sorbarendeztük a csúcsokat és a top 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 a transzkripció start helyétől (TSS) számított ± 50 kb-on belül. Génontológiai elemzést pedig a Genomic Regions Enrichment Annotations Tools (GREAT) v3.0.0 segítségével végeztük (McLean et al., 2010).

RNA-seq adatok. A nyers adatok humán hg19 referencia genomhoz illesztése TopHat v2.1.1 programmal történt (Trapnell et al., 2009). Az egyes génekhez tartozó leolvasások számát a featureCounts v1.6.2 program segítségével határoztuk meg (Liao et al., 2014). A minták között különbözően expresszálnak gének azonosítása R v3.5.1 alatt futó edgeR v3.22.3

programmal történt FDR 0.01 határérték beállításával (Robinson et al., 2009). A különbözően kifejeződő géneket génszett feldúsulási analízishez (GSEA) használtuk annak megállapítására, hogy milyen biológiai folyamatokkal mutatnak hasonlóságot. A génjeinket az FC, vagyis a változás mértéke alapján előre sorba rendeztük. GSEA elemzés során a „Molecular Signatures Database (MSigDB)” adatbázis ellenőrzött génszettjeihez (C2: curated gene sets) kerestünk hasonlóságot FDR<0.25 határértékkel GSEA szoftver 3-as verziójának használatával.

3.2.3. Betegekből származó adatok elemzése

Emlődaganatos betegek adatai a „The Cancer Genome Atlas” adatbázisból származnak, melyet a cBioPortal segítségével töltöttünk le (Ciriello, Gatza, Beck, Wilkerson, Perou, et al., 2015). 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 (Györffy et al., 2010).

3.2.4. Statisztikai számítások

A statisztikai számításokat GraphPad Prism 6-os verziójú szoftverrel végeztük. Shapiro-Wilk tesztet használtunk az adatok normalitásának eldöntéséhez (Gaussi eloszlásának ellenőrzéséhez). Két csoport közötti különbség vizsgálatához normál eloszlás esetén t-tesztet hajtottunk végre, míg nem normál eloszlás esetén Mann-Whitney tesztet. Párosított parametrikus adatok esetén párosított t-tesztet, míg nem parametrikus eloszlás esetén Wilcoxon tesztet használtunk. Több csoport közötti különbség teszteléséhez ANOVA próbát használtunk. Kaplan-Meier túlélés teszteléshez Mantel-Cox teszt volt használva. A p értékeket csillaggal jelöltük, ahol * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001 és **** P <0,0001 értékek voltak szignifikánsan jelölve.

3.2.5. Vizualizáció

Az ábrák többsége GraphPad Prism 6-os verziójával vagy R v3.5.1 alatt futó ggplot2 v3.0.0 csomagjával készültek. A heatmapek elkészítéséhez Java TreeView v1.1.6 szoftvert használtunk (Saldanha, 2004). Proporcionális Venn diagramok a BioVenn program segítségével készültek (Hulsen et al., 2008).

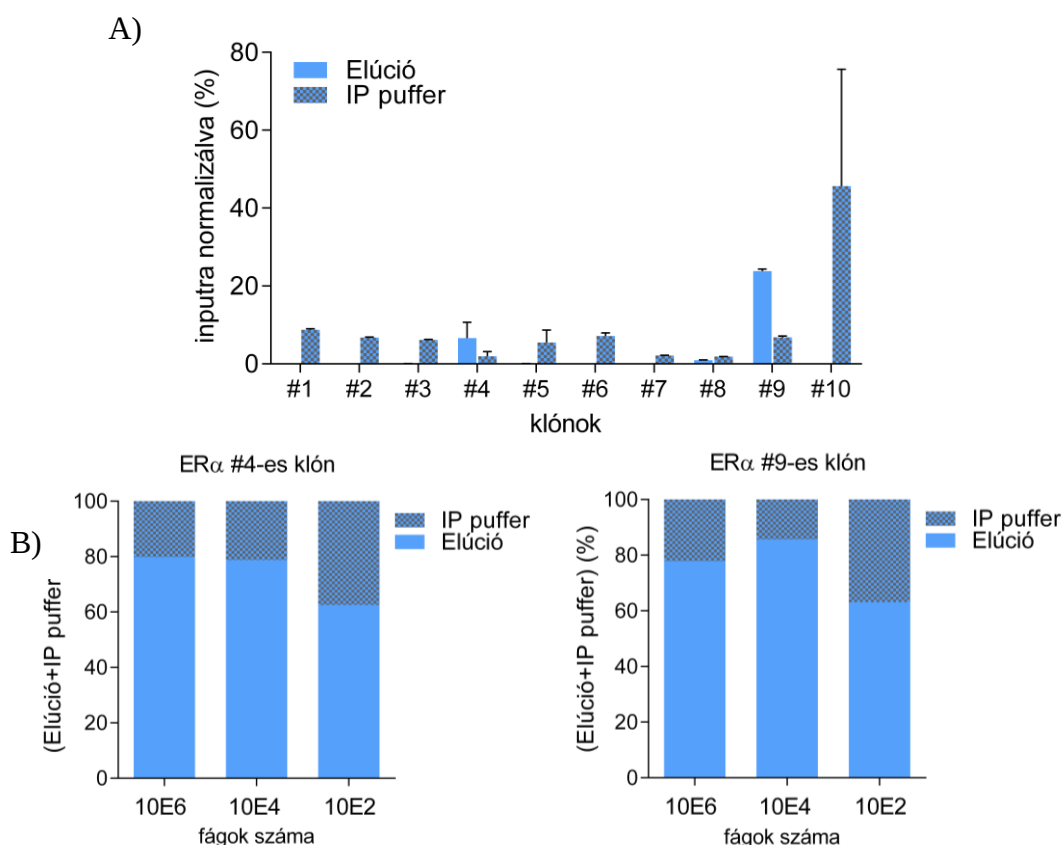
4. EREDMÉNYEK

4.1. Kromatin immunprecipitáció karakterizálása ER α epitópot kifejező fág kontrollal

Magreceptorok által kötött DNS szabályozó elemek vizsgálatához egyik legelterjedtebb módszer a kromatin immunprecipitáció (ChIP). 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. Kísérleteink során a Santa Cruz Biotechnology által forgalmazott ER α antitestet (sc-543X) használtunk, melyet több száz publikációban használtak a forgalmazó adatai alapján. Célunk volt, hogy ezzel a jól ismert antitesttel 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. A klónokat külön-külön teszteltük kromatin immunprecipitációban, ahol HEK293T sejtekből származó kromatint használtunk pufferként a kromatin környezet biztosítása érdekében. HEK293T sejtek alig expresszálnak ER α -t, ezért „spike-in” kontroll reakcióhoz tudtuk használni. A ChIP kísérletek során HEK293T kromatint tartalmazó oldathoz adtunk különböző mennyiségű ER α fágokat.

Először tíz monoklonális fág esetében azt teszteltük, hogy melyik klónok használhatóak ChIP reakcióhoz. Ennek során megvizsgáltuk, hogy mennyi fágot tudunk visszanyerni a teljes ChIP elúcióból, illetve mennyi marad vesztésként az IP pufferben, azaz mennyi az, ami nem tudott kötődni az ER α antitestünkhöz (7. **ábra A**). Két olyan klónt (#4 és #9 klón)

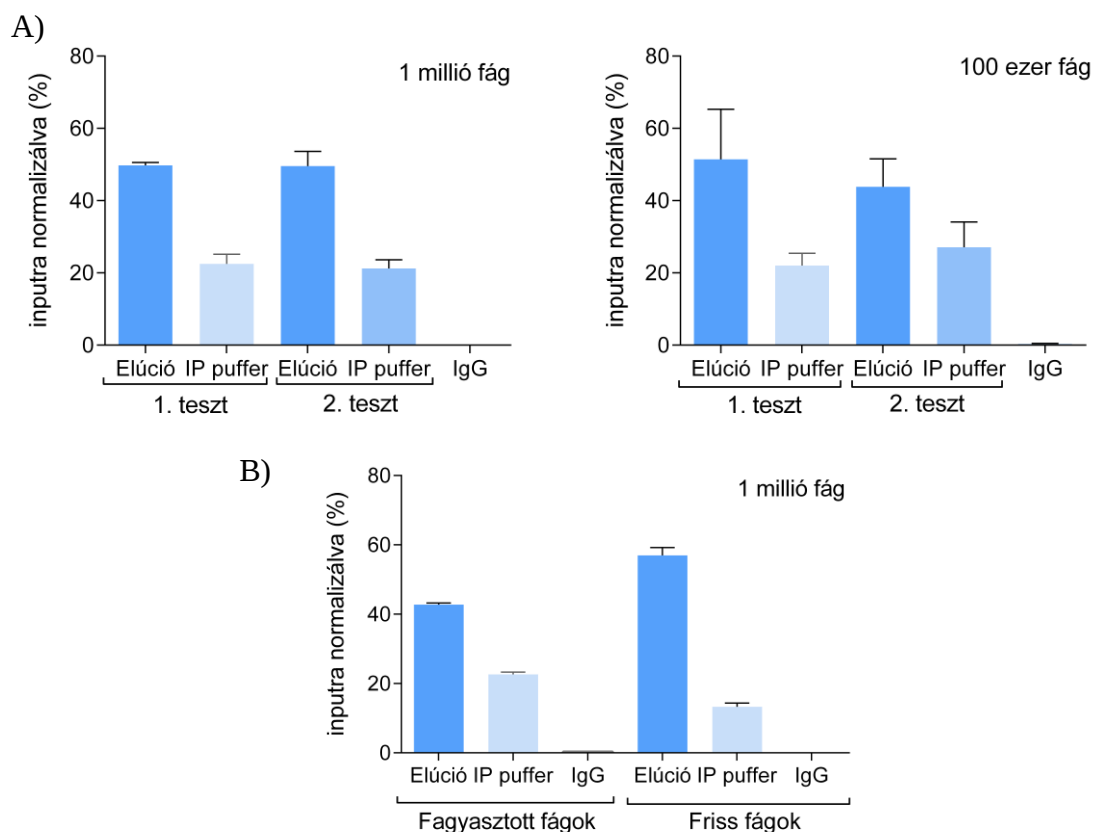
találtunk, amelyet a vissza tudtunk nyerni a teljes folyamat után. Tovább vizsgálva ezeket a klónokat azt vizsgáltuk meg, hogy 100, 10 000 és 1 000 000 fágklónt hozzáadva a ChIP-hez, mennyit tudunk visszanyerni az antitestünkkel. Az eredményeink azt mutatják, hogy 100 fágot használva ~60%-ot, míg ha ennél több fágot használtunk, akkor ~80%-ot tudtunk visszamérni az elúcióban (**7. ábra B**). További kísérleteinkhez a #9-es ER α epitópot kifejező fág klónt használtuk, ennek megvizsgáltuk még a reprodukálhatóságát és stabilitását.



7. ábra: Egyedi fág klónok tesztelése. A) Egyedi klónok tesztelése egy ChIP kísérlet folyamán. B) ER α #4-es és #9-es klón különböző mennyiségben való tesztelése ChIP-ben.

Megismételhetőség tesztelése során 1 000 000 és 100 000 fágot használtunk két külön ChIP kísérletben, melynek eredményeként azt láthatjuk, hogy két kísérletben a különböző mennyiségű fágok ellenére is ugyanazt az eredményt kaptuk (**8. ábra A**). Következőkben összehasonlítottuk a fagyasztott és frissen termelt monoklonális fágokat. Hosszabb idejű tárolás során a fágokat -20°C-on glicerolban tartjuk, és kíváncsiak voltunk hogyan befolyásolja ez a fágok használatát ChIP reakcióban. Azt találtuk, hogy a fagyasztott fágok

használata során ~10%-kal csökkent az IP hatékonyság, míg a frissen termelt fágok esetében az korábbi eredményekhez hasonló IP hatékonyságot figyelhetünk meg (**8. ábra B**). A fág alapú rendszer előnye, hogy könnyen újranoveszthetőek baktérium törzsekben, így bármikor elérhetőek rövid időn belül.

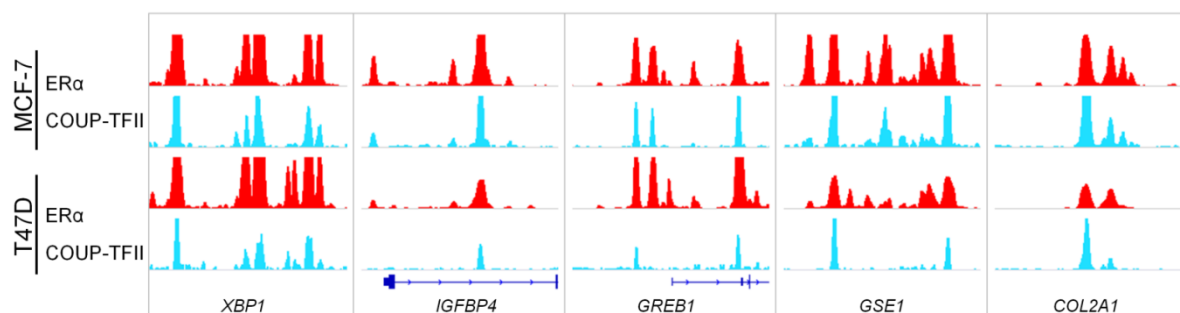


8. ábra: Fág rendszer reprodukálhatósága és stabilitása. A) Egy millió és százezer fágot használva láthatjuk reprodukálhatóságot két külön kísérletből. B) Egy millió fagyasztott és frissen termelt fág közötti különbség tesztelése. Izotípus kontrollként IgG volt használva.

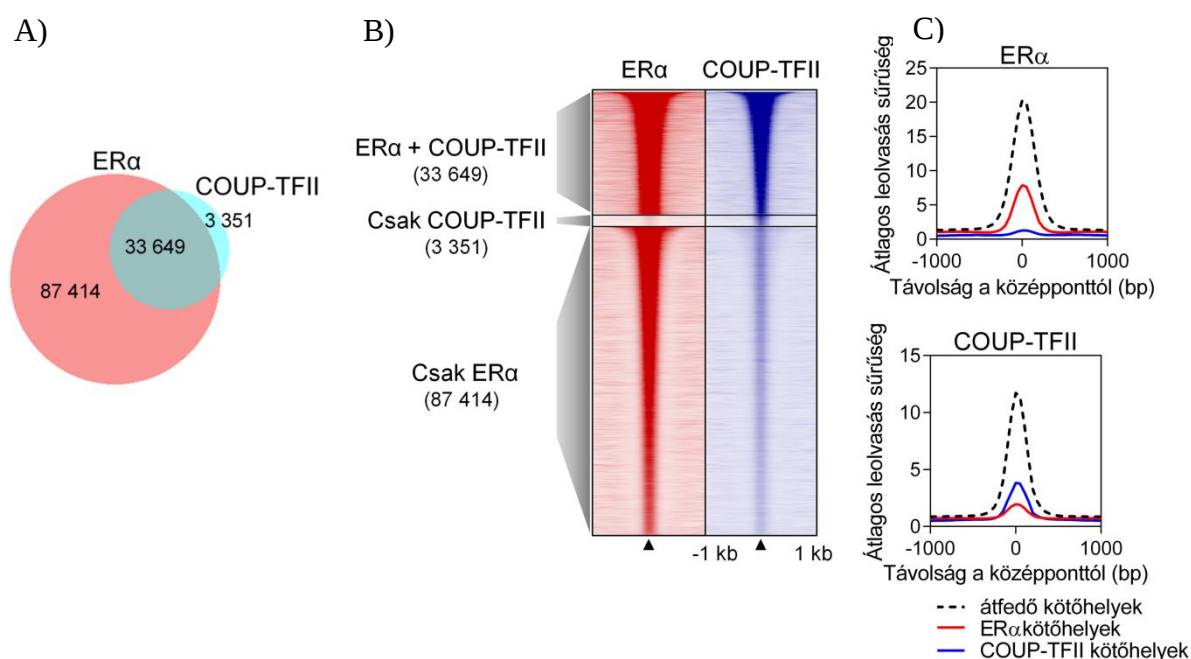
A fág rendszer lehetővé teszi, hogy megvizsgáljuk a ChIP reakció során létrejövő építő veszteségeket. Eddigiek alapján azt láttuk, hogy az elúcióban lévő fágvisszanyerés ~50-60% volt, míg az IP pufferben a fágveszteség 20% körüli. A maradék veszteség a mágneses gyöngyökhöz és műanyagokhoz (csövek, pipettahegyek) való kötődés miatt vesztetett el. A továbbiakban ennek figyelembevételével végeztük el a ChIP kísérleteinket. 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

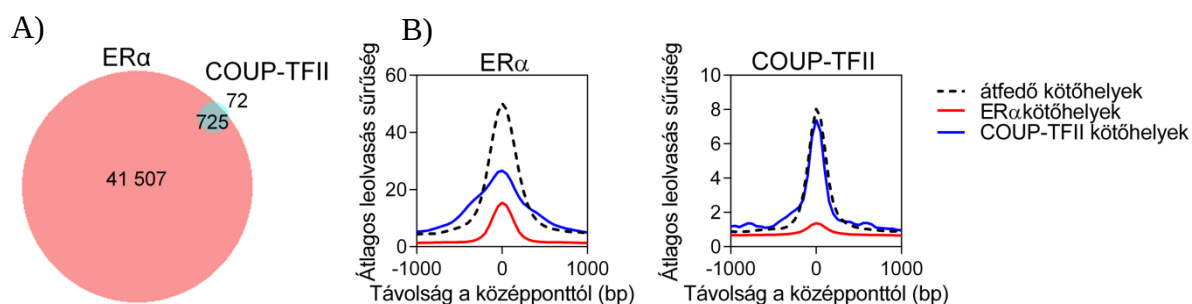
A COUP-TF árva magreceptorral kapcsolatban már számos kutató beszámolt arról, hogy kölcsönhatásban van ER α magreceptorral (C M Klinge et al., 1997; Métivier et al., 2002), azonban genomszintű tanulmányok nem állnak rendelkezésre. Kutatásunk során a COUP-TFII szerepét vizsgáltuk meg ER α mediált szabályozásokban teljes genom szinten emlődaganat sejtekben, ehhez ER α és COUP-TFII ChIP-et követő szekvenálást alkalmaztunk ER α -pozitív MCF-7 és T47D sejtekből. A **9. ábrán** láthatóak az ER és COUP-TFII kötőhelyek néhány specifikus ER α célgénél MCF-7 és T47D sejtekben. Az ábra alapján már látható, hogy a COUP-TFII kötőhelyek nagyrésze átfed ER α kötőhelyekkel, ezért *diffBind* programmal is számszerűsítettük az ER α és COUP-TFII között átfedő régiókat. Azt találtuk, hogy a COUP-TFII kötőhelyek ~90%-a fed át ER α kötőhelyekkel (10. ábra) MCF-7 sejtekben, ami azt jelzi, hogy a COUP-TFII jelentős része van jelen az ER α általi szabályozási programban. A következőkben összehasonlítottuk, hogy a COUP-TFII-vel átfedő ER α , csak ER α vagy csak COUP-TFII kötőhelyeknél található magasabb ChIP-Seq jelintenzitás. Az eredmény azt mutatja, hogy az átfedő kötőhelyeknél magasabb az ER α és COUP-TFII ChIP-seq jelintenzitás van, mint a magreceptoroknál önmagukban (**10. ábra**). Ugyanezeket az eredményeket meg tudtuk erősíteni T47D sejtekben is, attól függetlenül, hogy a COUP-TFII kötőhelyek száma sokkal alacsonyabb (**11. ábra**). Ennek az alacsony kötőhely számnak az az oka, hogy a COUP-TFII kifejeződése is alacsonyabb T47D sejtben, mint MCF-7 sejtekben. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a COUP-TFII szerepet játszhat az ER α általi szabályozási programban.



9. ábra: ChIP-Seq IGV képernyőkép az ER α és COUP-TFII kötőhelyekről MCF-7 és T47D emlődagazat sejtekben.

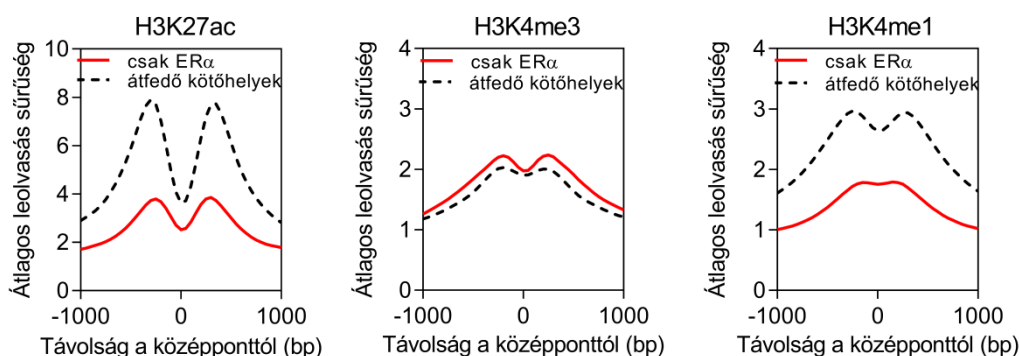


10. ábra: ER α és COUP-TFII átfedő kötőhelyek azonosítása MCF-7 sejtekben. A) Venn diagram és B) hőterkép mutatja az ER α és COUP-TFII kötőhelyek közötti átfedő régiókat. C) Hisztogramok mutatják az ER α és COUP-TFII ChIP-seq jelintenzitást az átfedő ER α és COUP-TFII és egyedi kötőhelyek körül MCF-7 sejtekben.



11. ábra: ER α és COUP-TFII átfedő kötőhelyek azonosítása T47D sejtekben. A) Venn diagram mutatja az ER és COUP-TFII kötőhelyek átfedésének számát T47D sejtekben. B) Hisztogramok mutatják az ER α és COUP-TFII ChIP-seq jelintenzitást az átfedő ER α és COUP-TFII és egyedi kötőhelyek körül T47D sejtekben.

Azért, hogy megvizsgáljuk a COUP-TFII és ER α kolokalizált régiók körül lévő aktív kromatin állapotot, különböző hiszton módosításokból származó ChIP-Seq adatot használtunk az ENCODE adatbázisból, melyeket újraelemeztünk. Bizonyos hiszton módosítások jelenléte meghatározza az adott szabályozó régió jellegét. H3K27ac és/vagy H3K4me1 jelenléte főként aktív enhanszerrel, míg H3K4me3 aktív promóterrel korrelál. Megvizsgálva ezt a három hiszton módosítást 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 függnek össze, mint az ER α önmagában (12. ábra). A promóter specifikus H3K4me3 intenzitásában nem látunk különbséget COUP-TFII együtt kötött vagy önmagában ER α által kötött régiók között. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a COUP-TFII főként az aktív enhanszer elemeken található ER α általi szabályozási programban van jelen.



12. ábra: Hiszton módosítások az ER α és COUP-TFII átfedő és egyedi ER α kötőhelyek körül. Hisztogramok mutatják a H3K27ac, H4K4me3 és H3K4me1 ChIP-Seq jelintenzitásának eloszlását az ER α és COUP-TFII átfedő és egyedi ER α kötőhelyek körül.

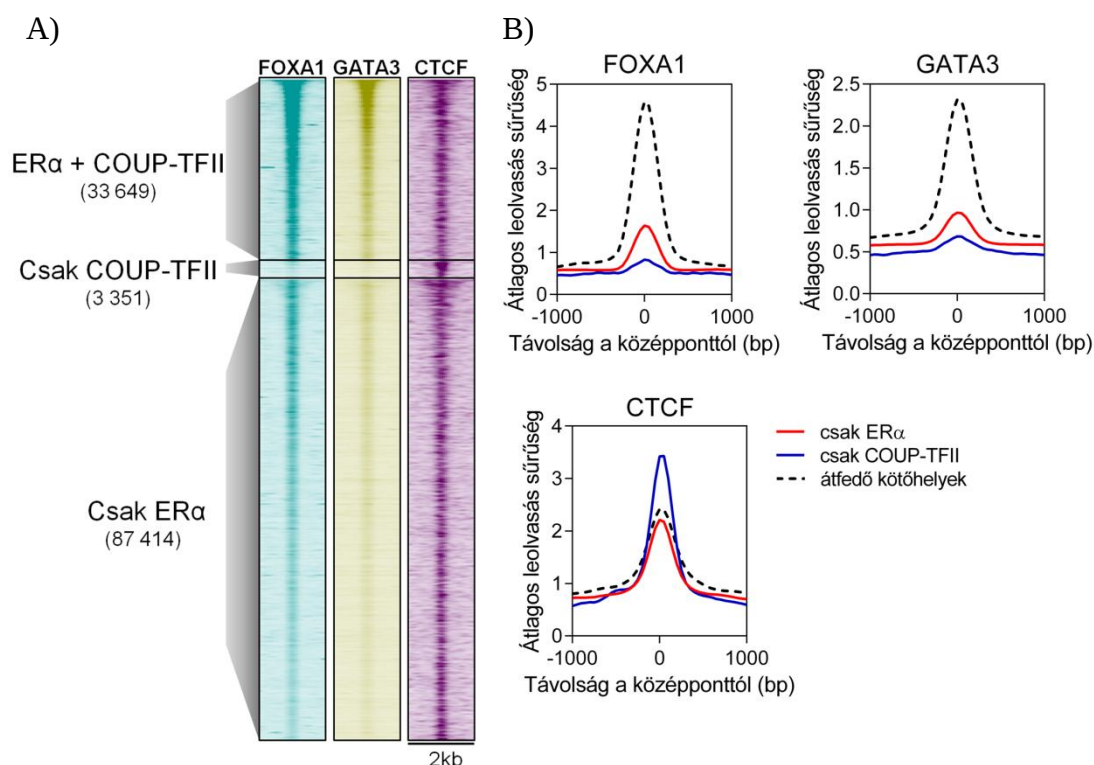
Az ER α általi szabályozásokban számos kiemelkedő jelentőségű kofaktorokat azonosítottak már, többek között a FOXA1 és GATA3 faktorokat. Annak vizsgálatára, hogy a COUP-TFII és ER α átfedő kötőhelyeknél, csak ER α és csak COUP-TFII kötőhelyeknél milyen egyéb transzkripciós faktorok lehetnek jelen, motívumelemzést hajtottunk végre HOMER programmal. Eredményeink azt mutatják, hogy az ER α és COUP-TFII átfedő

kötőhelyeknél a magreceptorokra jellemző NR félhely, FOXA1 és GATA3 motívum mutat jelentős feldúsulást, ugyanezen faktorok megjelennek a csak ER α kötőhelyeknél, azonban itt az ER α -ra specifikus ösztrogén válaszadó elemet (ERE) láthatjuk feldúsulni (13. ábra). A COUP-TFII kötőhelyeknél a korábban már leírt COUP-TFII-re specifikus DR1 elem és CTCF látható. Mindebből arra következtethetünk, hogy a COUP-TFII mellett ugyanúgy jelen vannak a FOXA1 és GATA3 kofaktorok, mint önmagában az ER α mellett.

A következő lépésben azt vizsgáltuk meg, hogy a FOXA1, GATA3 és CTCF milyen intenzitással kötődik az átfedő és egyedi régiókhoz. Ehhez MCF-7 sejtekből származó FOXA1, GATA3 és CTCF ChIP-seq adatokat töltöttünk le az ENCODE adatbázisból és újraelemeztük az adatokat. ChIP-seq jelintenzitás vizsgálatánál azt találtuk, hogy a COUP-TFII és ER α átfedő kötőhelyeken jelentősen nagyobb intenzitásokat figyelhetünk meg FOXA1 és GATA3 tekintetében, mint önmagukban a magreceptoroknál (14. ábra). CTCF tekintetében pedig azt figyelhetjük meg, mint a motívumelemzés eredményénél, hogy önmagában a COUP-TFII kötőhelyeknél látható nagyobb CTCF feldúsulás. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a COUP-TFII mellett a FOXA1 és GATA3 is jelen van az ER α mediált transzkripció programban.



13. ábra: Motívumelemzés az ER α és COUP-TFII átfedő és egyedi magreceptorok által kötött régiókon MCF-7 sejtekben.



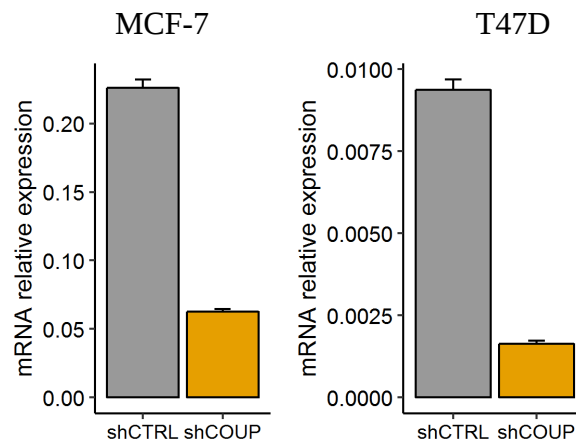
14. ábra: Kofaktorok azonosítása ERα és COUP-TFII által kötött és egyedi magreceptor által kötött régiókon. A) Hő térkép mutatja a FOXA1, GATA3 és CTCF ChIP-Seq jelintenzitását a magreceptorok által kötött régiók centrumához képest ± 1 kb-ra. B) Hisztogramok mutatják a kofaktorok jelintenzitását az átfedő és egyedi kötött régiók között.

4.3. COUP-TFII szerepe emlődaganat sejtek génexpressziójában

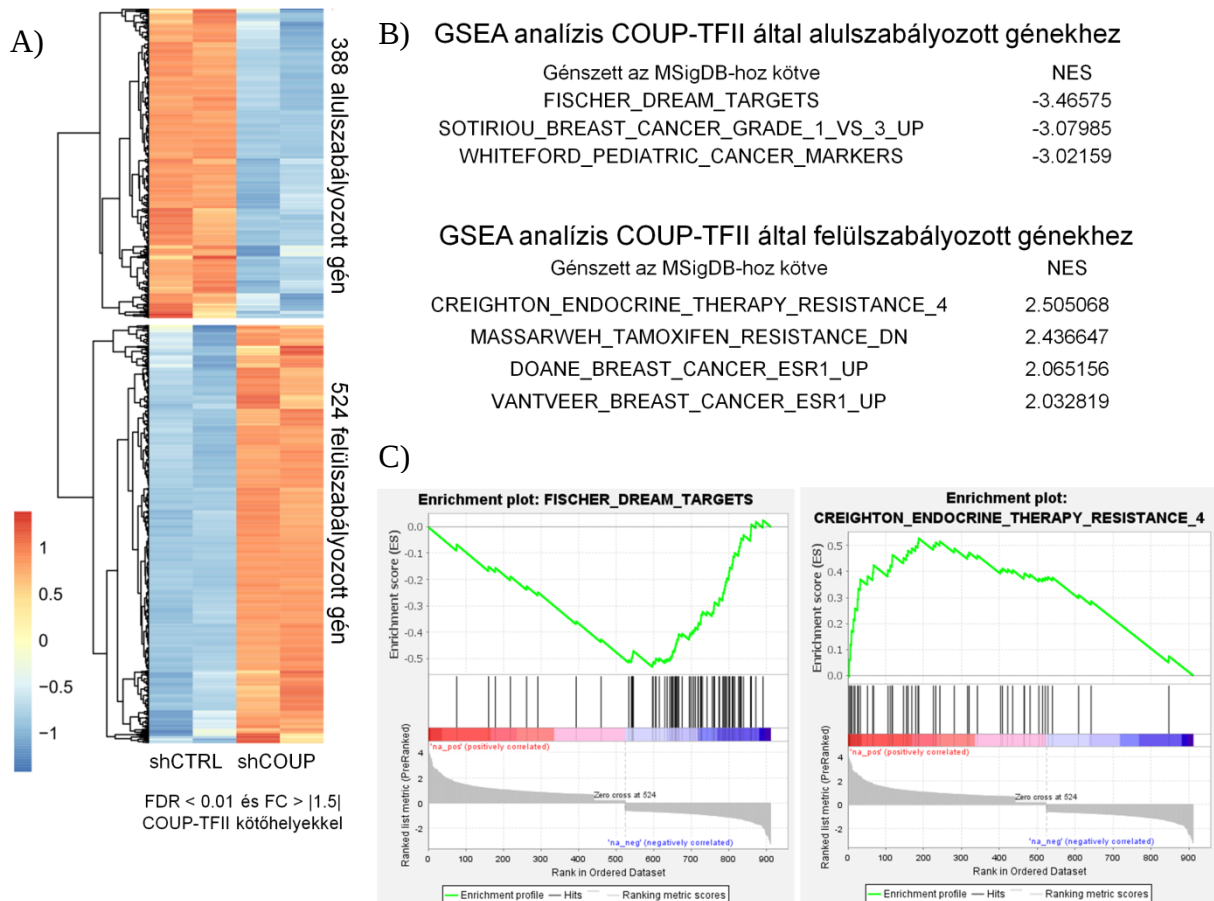
Emlődaganat sejtekben a COUP-TFII általi génexpressziós szabályozások vizsgálatához, COUP-TFII csendesített ER-pozitív emlődaganatból származó sejtvonalakat hoztunk létre lentivirális alapú shRNS géncsökkentést alkalmazva. A géncsökkentés során COUP-TFII génjére specifikus (shCOUP) és kontrollként (shCTRL) egy nem-specifikus shRNS-t tartalmazó lentivírusokkal transzdukáltunk MCF-7 és T47D sejteket. Legalább kéthetes puromycin szelekciót követően további kísérletekre készítettük elő a sejteket. A COUP-TFII géncsökkentés mértékét mRNA szinten RT-qPCR-al ellenőriztük (**15. ábra**). MCF-7 sejtekben a COUP-TFII mRNA szintje $\sim 70\%$ -kal, míg T47D sejtekben $\sim 90\%$ -kal csökkent. A további kísérletekhez ezeket az RNS mintákat használtuk.

Azért, hogy teljes genom szinten megvizsgáljuk a különbözően expresszáldó géneket a

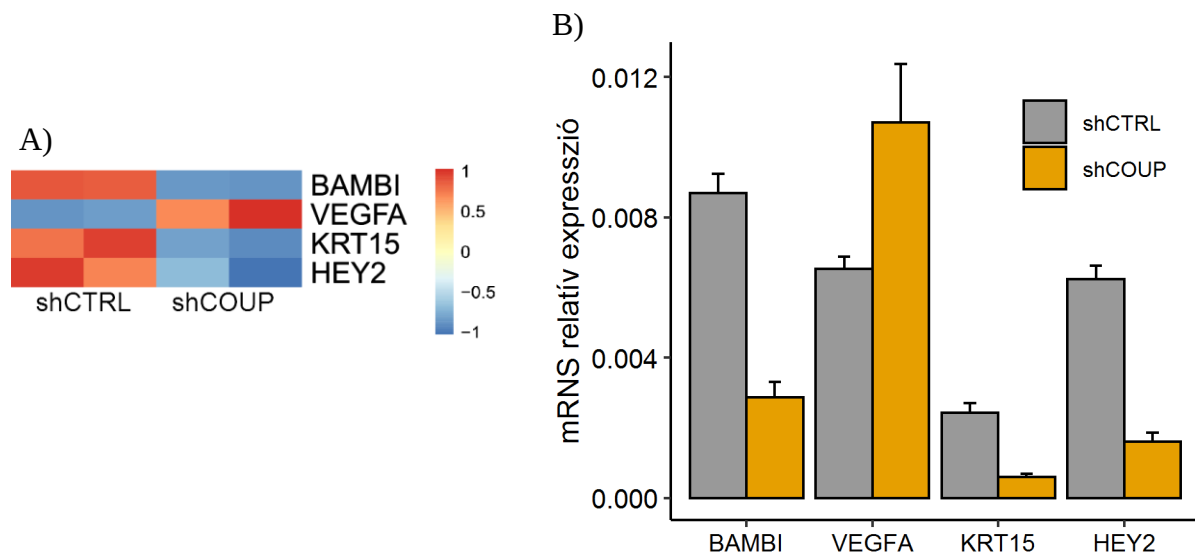
kontroll és COUP-TFII csendesített emlődaganatból származó sejtvonalakban, RNS szekvenálást hajtottunk végre. Géncsendesítést követően MCF-7 sejtekben 524 magasabban kifejeződő és 388 alacsonyabban kifejeződő gént, míg T47D sejtekben 378 magasabban kifejeződő és 624 alacsonyabban kifejeződő gént azonosítottunk $FC > |1,5|$ és $FDR < 0,01$ határértékkel *edgeR* program használatával. MCF-7 sejtekben a kapott génlistát leszűkítettük annak függvényében, hogy a változott gén promóterén, enhanszerén vagy szuper-enhanszerén található-e COUP-TFII kötőhely. T47D sejtekben az alacsony COUP-TFII kötőhelyek száma miatt ezt nem tudtuk megtenni. Így kapott MCF-7 és T47D sejtekben különbözően expresszálódó gének között 145 átfedést találtunk, melyek között olyan géneket találhatunk, mint a *TFF1*, *HEY2*, *CDH1*, *AR*, *RXRA* és *BAMBI* gének. Következőekben az MCF-7 sejtekben változó génlistánkat GSEA elemzéssel összehasonlítottuk egy adatbázisban meglévő génszettel annak vizsgálatára, hogy a mi génlistánk milyen biológiai folyamatokhoz köthetőek (**16. ábra**). Azt találtuk, hogy a 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. Néhány különbözően expresszálódó gént (*BAMBI*, *KRT15* és *HEY2*) RT-qPCR-rel is validáltunk, melyek megerősítik az RNS szekvenálásban kapott eredményt (**17. ábra**). Összességében ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a COUP-TFII-nek fontos szerepe van az ER α mediált transzkripció szabályozásokban.



15. ábra: COUP-TFII mRNS szintje a COUP-TFII géncsökkentés után MCF-7 és T47D sejtekben RT-qPCR-rel mérve.



16. ábra: COUP-TFII által szabályozott gének MCF-7 sejtekben. A) Hőterkép mutatja a különbözően expresszáldott géneket a kontroll és COUP-TFII géncsökkentett minták között. B) GSEA elemzés mutatja azokat a génszetteket, melyek az általunk azonosított különbözően expresszáldott génekhez legjobban hasonlítanak. NES: normalizált feldúsulási pontszám. C) GSEA ábrák mutatják két specifikusan kiválasztott génszettben az egyező gének eloszlását.



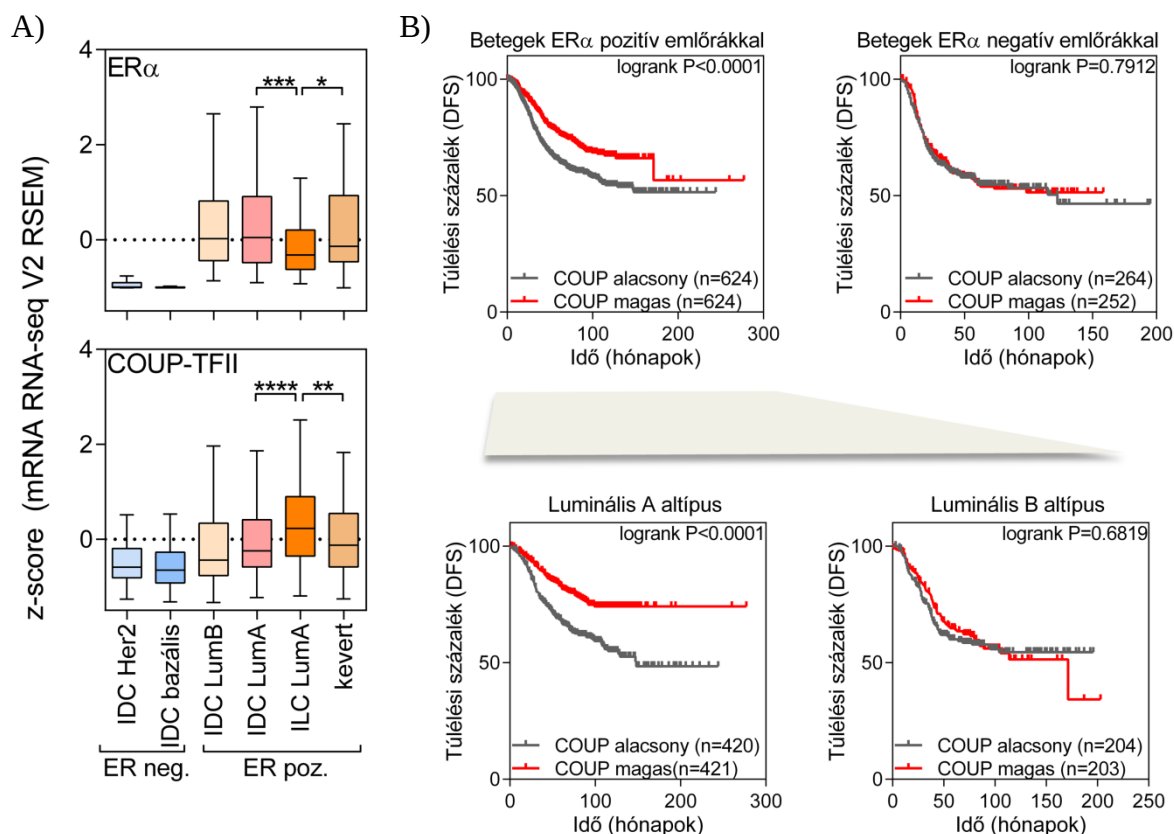
17. ábra: COUP-TFII csendesítést követően MCF-7 sejtekben különbözően expresszálódó gének mRNS szintjének validálása. A) Heatmap mutatja RNS szekvenálás alapján néhány különbözően expresszálódó gént (z-score). B) Ugyanezen gének validálása RT-qPCR módszerrel.

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. Ehhez a vizsgálatához TCGA adatbázisba feltöltött 817 emlődaganatos beteg adatait tartalmazó RNS szekvenálási adatokat használtuk (Ciriello G Cell 2015). A betegeket hisztológiailag invazív ductális karcinóma (IDC), invazív lobuláris karcinóma (ILC) és kevert IDC/ILC csoportra osztottuk. Ezen felül az IDC csoportban PAM50 (génexpressziós jellegzetesség alapján létrehozott alcsoportok) szerinti alcsoportokat (luminális A, luminális B, HER2 pozitív és bazális) hoztuk létre, míg az ILC és kevert csoportban nem végeztük el ezt a csoportosítást, mivel a betegek nagy része (~90%-a) luminális A alcsoportba tartozik. Az így kialakított hat csoportban összehasonlítottuk az ER α és COUP-TFII kifejeződésének mértékét (**18. ábra A**). A HER2 pozitív és bazális alcsoport ER negatív emlődaganat, így a vártan 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 ILC luminális A csoportban szignifikánsan ($p < 0,0001$) magasabb, mint 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 (**18. ábra B**). Azt találtuk, hogy 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. Az ER-negatív csoportban nem láthatunk különbséget a túlélésben a két COUP-TFII expressziós szint között. Az ER-pozitív csoportot további luminális A és B alcsoportra osztva vizsgáltuk meg a túlélést. A két csoport között HER2 pozitivitásban van különbség, tehát a luminális A ER+/HER2-, míg a luminális B ER+/HER2+. 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. Mindez arra enged következtetni, hogy a COUP-TFII-nek kulcsfontosságú szerepe van olyan ER-pozitív emlődaganatos betegek túlélésében, akik luminális A alcsoportba (ER-pozitív, de HER2 negatív) tartoznak.

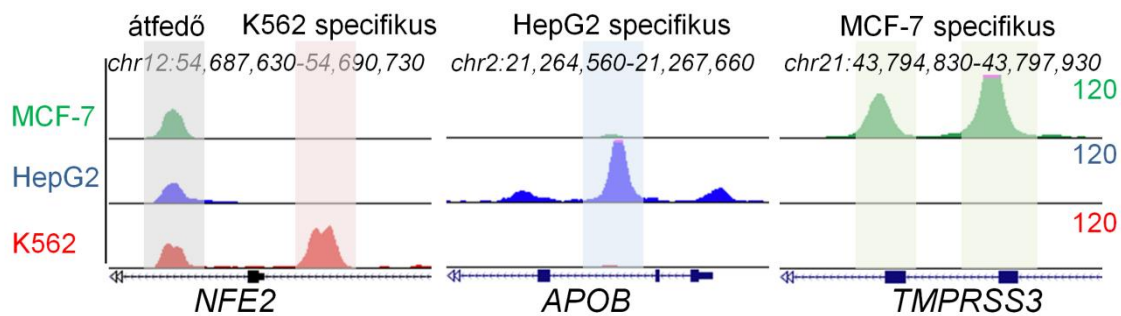


18. ábra: COUP-TFII expressziója emlődaganatos betegeknél. A) Dobozdiagram mutatja az ERα és COUP-TFII génjének expresszióját különböző altípusú emlődaganatos betegeknél. Mann-Whitney teszt, * jelzi a szignifikanciát $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ értéknél. B) Kaplan-Meier-féle túlélési görbék mutatják a betegségmentes túlélési százalékot (DFS) a COUP-TFII expressziójának mértéke alapján emlődaganatos betegek különböző alcsoportjaiban. Statisztika Mantel-Cox teszttel lett számítva.

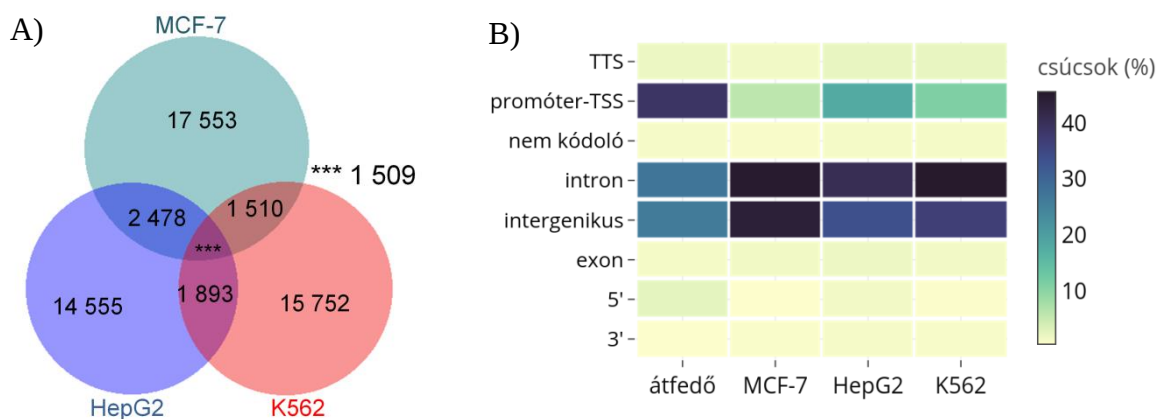
4.5. COUP-TFII kötőhelyek feltérképezése különböző eredetű daganatsejtekben

A COUP-TFII kötőhelyek genom eloszlásáról különböző daganatsejtekben keveset tudunk, ezért az emlődaganat sejtek mellett máj és leukémia eredetű daganatsejtekben vizsgáltuk meg a COUP-TFII kötődését genom szinten. A vizsgálathoz az ENCODE Projekt által generált nyers ChIP-Seq adatokat használtuk, minimalizálva ezzel a különböző kísérleti és szekvenálási módszerekből eredő különbségeket. Az adatok letöltése után a biológiai replikákat összevontuk, majd a saját bioinformatikai eszközkészletünkkel újra elemeztük őket.

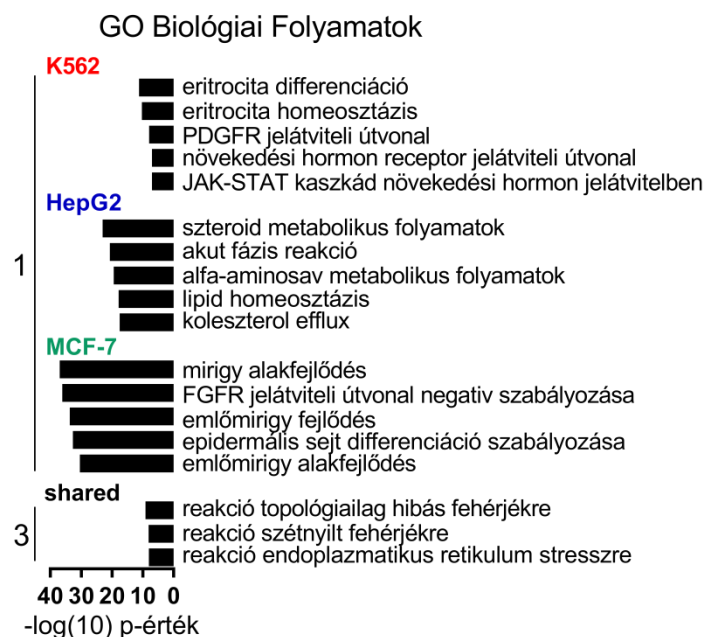
Ahhoz, hogy biztosabb képet kapjunk a valódi COUP-TFII kötőhelyeket illetően, úgy a csúcsok predikciója után a kötőhelyeket RPKM alapján sorbarendeztük és kötőhelyek top 25%-át használtuk a további elemzésekhez. Összesen 64149 COUP-TFII kötőhelyet prediktáltunk a három sejtvonalban, melynek 2,35%-a (1509/ 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) (**20. ábra A**). A **19. ábra** szemlélteti a három sejt-típusban átfedő COUP-TFII kötőhelyet az *NFE2* génnél és sejt-típus specifikus COUP-TFII kötőhelyeket az *NFE2*, *APOB* és *TMPRSS3* géneknél. 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 (**20. ábra B**). 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 (**21. ábra**). Mindezekből arra következtethetünk, hogy a COUP-TFII kötőhelyek sejt-típus specifikus kötőmintázatot mutatnak, és olyan régiókhoz köthetőek, ahol a sejt azonosságért felelős gének találhatóak.



19. ábra: Sejt-típus specifikus és három sejt-típusban átfedő COUP-TFII kötőhelyek



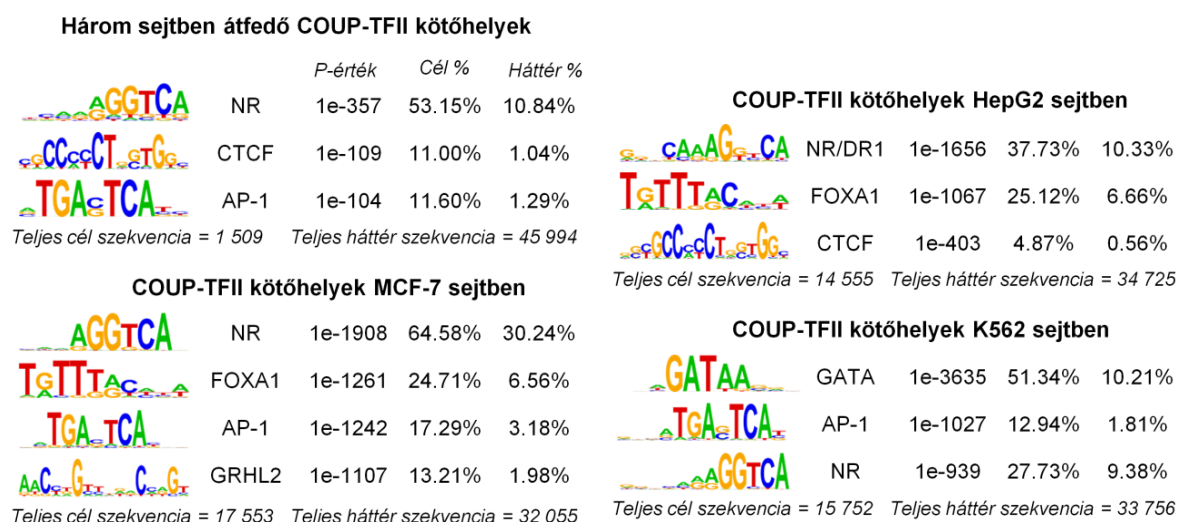
20. ábra: A három különböző sejt-típusban átfedő COUP-TFII kötőhelyek. A) Venn diagram mutatja három különböző sejtben átfedő COUP-TFII kötőhelyek számát. B) Hő térkép mutatja a három sejt-típusban átfedő és sejt-típus specifikus COUP-TFII kötőhelyek genomai eloszlását. A színek a kötőhelyek százalékos arányával megegyezők.



21. ábra: COUP-TFII kötőhelyekhez köthető biológiai folyamatok. Egyedi és három sejt-típusban átfedő COUP-TFII kötőhelyekhez köthető folyamatok a GO adatbázis alapján.

4.6. COUP-TFII kötőhelyekhez kötődő kofaktorok azonosítása

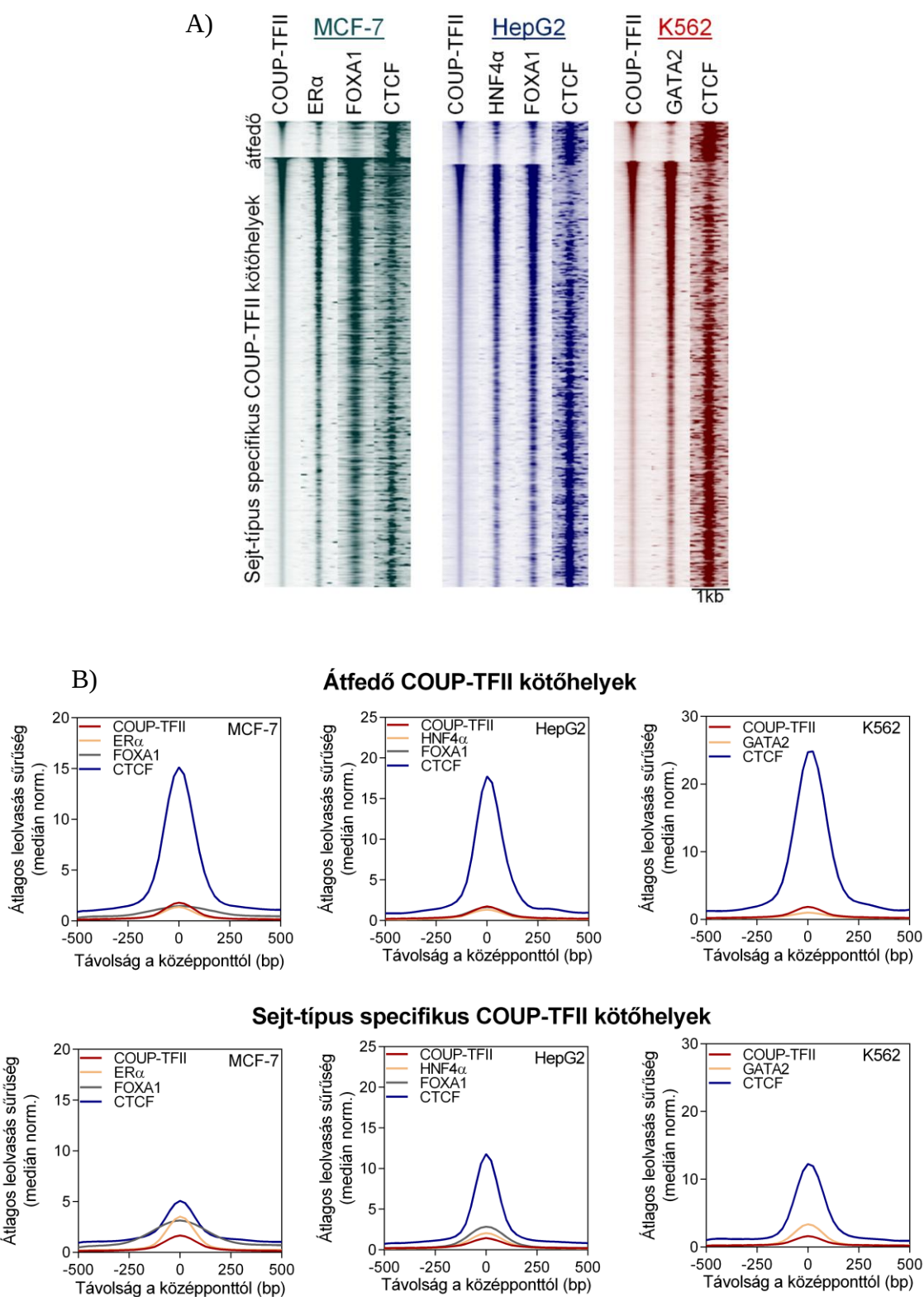
A COUP-TFII mellett jelenlévő kofaktorokról kevés ismeretünk van, ezért motívumelemzést hajtottunk végre a három sejt-típusban átfedő és sejt-típus specifikus COUP-TFII kötőhelyeknél (22. ábra). Az elemzésképpen a többi magreceptorhoz hasonlóan a magreceptorokra jellemző AGGTCA motívum (NR) feldúsulását figyelhetjük meg mind az átfedő és mind az egyedi sejt-vonalakban. 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.



22. ábra: Transzkripciós faktorok motívumának feldúsulása három sejt-típusban átfedő és egyedi COUP-TFII kötőhelyeknél

A motívum elemzés eredményére alapozva, arra voltunk kíváncsiak, hogy a kofaktorok milyen ChIP-Seq jelintenzitással vannak jelen a három sejt-típusban átfedő és egyedi sejtekben jelenlévő COUP-TFII kötőhelyeknél. Mindemellett tekintetbe véve azt, hogy a mester transzkripciós faktorok szintén magreceptorok, MCF-7 sejtekben az ER α , míg HepG2 sejtekben a HNF4 α , amelyek képesek NR motívumhoz kötődni, így ezen faktorok intenzitását

is megvizsgáltuk. K562 sejtekben a mester transzkripciós faktor a GATA2. Mester transzkripciós faktor alatt itt olyan fehérjéket értünk, amelyek magas expressziós szintet mutatnak az adott sejtben, és olyan géneket szabályoznak, melyek sejt-típus specifikus szabályozásért felelősek, fenntartva így a sejtre jellemző fenotípust (Sunny Sun-Kin Chan 2013). Az eltérő ChIP-Seq kísérletekből származó különbségek kiküszöböléséhez a kapott jelet az adott kísérlet mediánjára normalizáltuk. Azt találtuk, hogy a COUP-TFII kötőhelyek többségénél megfigyelhetőek a mester transzkripciós faktorok, FOXA1 és CTCF is. Továbbá azt láthatjuk, hogy a három sejt-típusban közös COUP-TFII kötőhelyeknél a CTCF szignál nagyobb, mint a sejt-típus specifikus COUP-TFII kötőhelyeknél, míg a sejt-típus specifikus COUP-TFII kötőhelyeknél inkább a mester transzkripciós faktorok jelintenzitása a jelentősebb (**23. ábra**). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a sejt-típus specifikus COUP-TFII kötőhelyeket a mester transzkripciós faktorok, míg a három sejt-típusban átfedő COUP-TFII kötőhelyeket a CTCF jelenléte határozza meg.



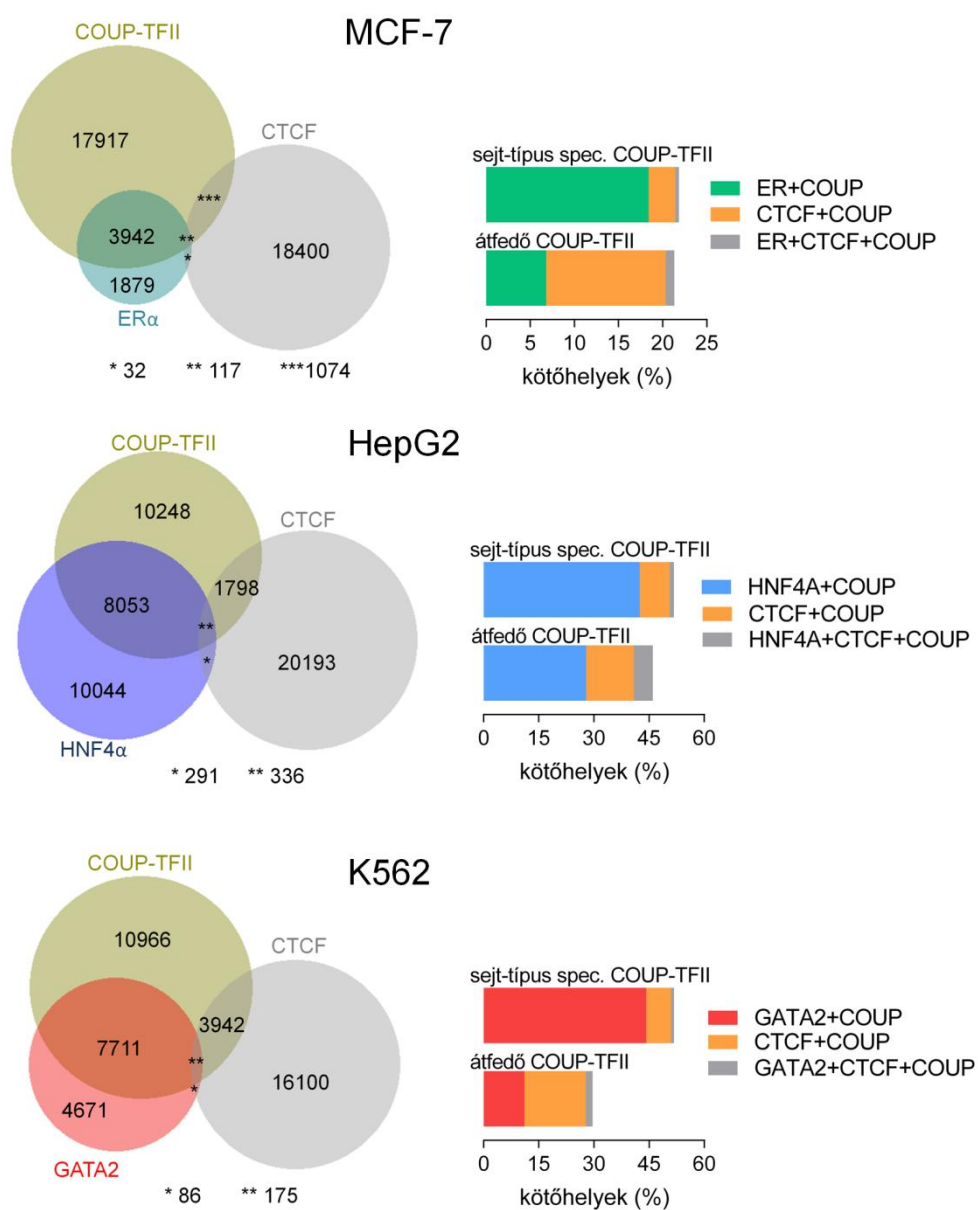
23. ábra: Kofaktorok jelenléte a COUP-TFII kötőhelyeknél. A) COUP-TFII és egyéb koregulátorok ChIP-Seq jelintenzitásának eloszlása COUP-TFII kötőhelyek centrumához képest a három különböző sejtben. B) Hisztogramok reprezentálják a COUP-TFII és kofaktorainak a ChIP-Seq jel denzitását a három sejt-típusban átfedő és egyedi COUP-TFII kötőhelyek körül.

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

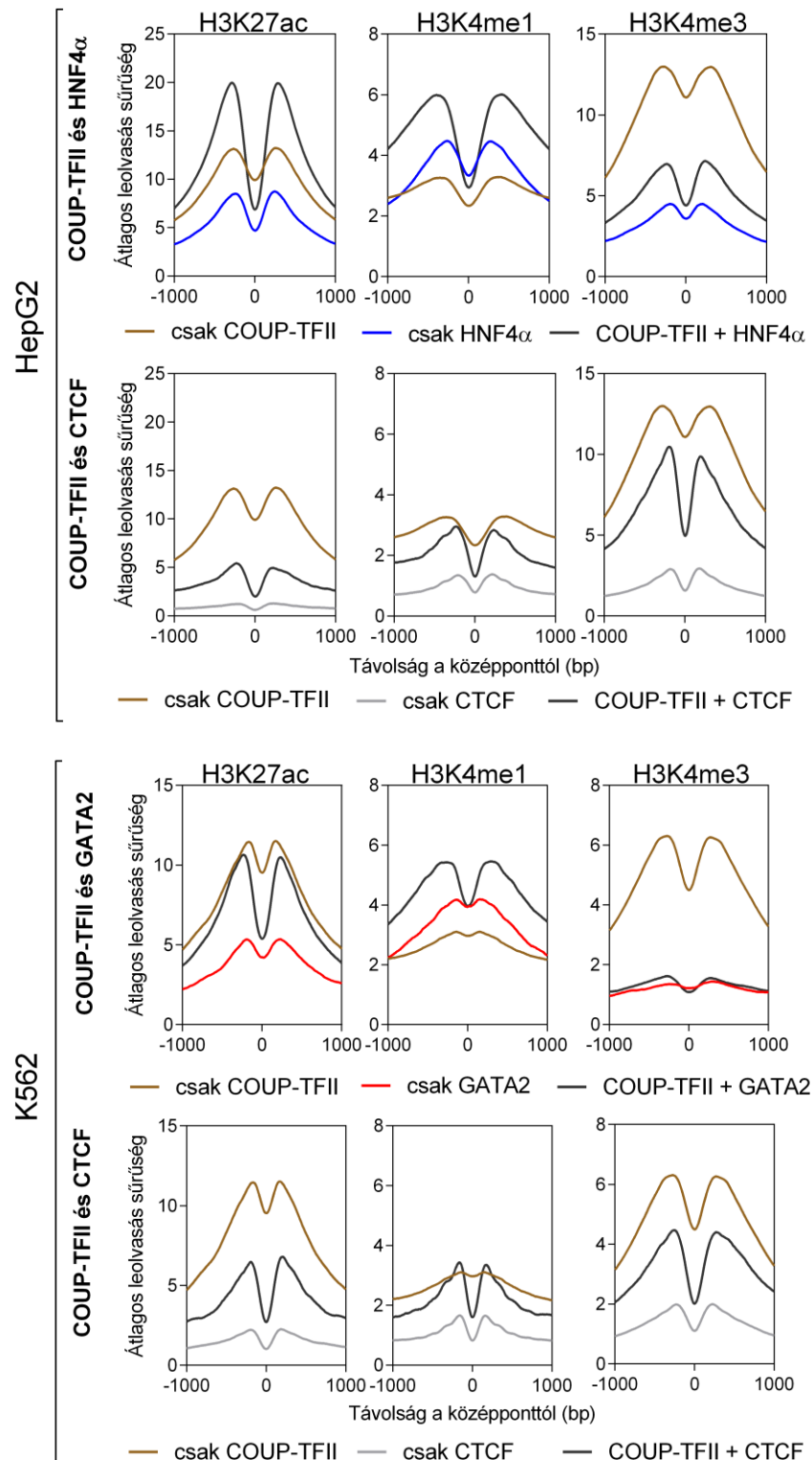
A COUP-TFII kromatin környezetének vizsgálatához először megnéztük, hogy a COUP-TFII milyen arányban van jelen az adott sejtre jellemző mester transzkripció faktor és CTCF mellett a különböző sejtekben. Ehhez a vizsgálathoz *diffBind* analízist használtunk, melynek eredményeképpen azt kaptuk, hogy a 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 (**24. ábra**). Mindez azt sugallja, hogy a COUP-TFII részt vesz két különböző funkciójú transzkripció faktor szabályozásában. Továbbiakban azt is megvizsgáltuk, hogy a három sejt-típusban átfedő és sejt-típus specifikus COUP-TFII kötőhelyek milyen arányú átfedést mutatnak CTCF-el és mester transzkripció faktoral. Azt találtuk, hogy 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. Az aktív enhanszerek H3K4me1 és H3K27ac, illetve az aktív promóterek pedig H3K4me3 és H3K27ac hiszton módosítások magas jelenlétével korrelálnak. Erre alapozva megvizsgáltuk, hogy a COUP-TFII kötőhelyeknél önmagukban, mester transzkripció faktoral, illetve CTCF-el milyen hiszton módosításokkal korrelál. Azt találtuk, hogy a COUP-TFII mester transzkripció faktoral inkább aktív enhanszer elemeknél, míg önmagában vagy CTCF-el aktív promóter régióban találhatóak (**25. ábra**). Összességében ezek az adatok további megerősítéssel szolgálnak arra, hogy a COUP-TFII mester transzkripció faktoral együtt

aktív enhanszer elemeken keresztül jelen van sejt-típus specifikus szabályozásban.



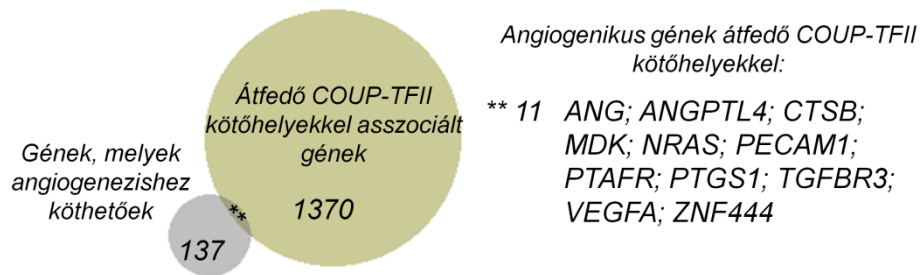
24. ábra: COUP-TFII kötőhelyek átfedése mester transzkripció faktorral és CTCF-el. Venn diagramok mutatják az átfedéseket COUP-TFII, CTCF és mester transzkripció faktor között különböző sejtekben, míg az oszlop diagramok mutatják az átfedések százalékos arányát az alapján, hogy a COUP-TFII egyedi vagy három sejt-típusban átfedő.



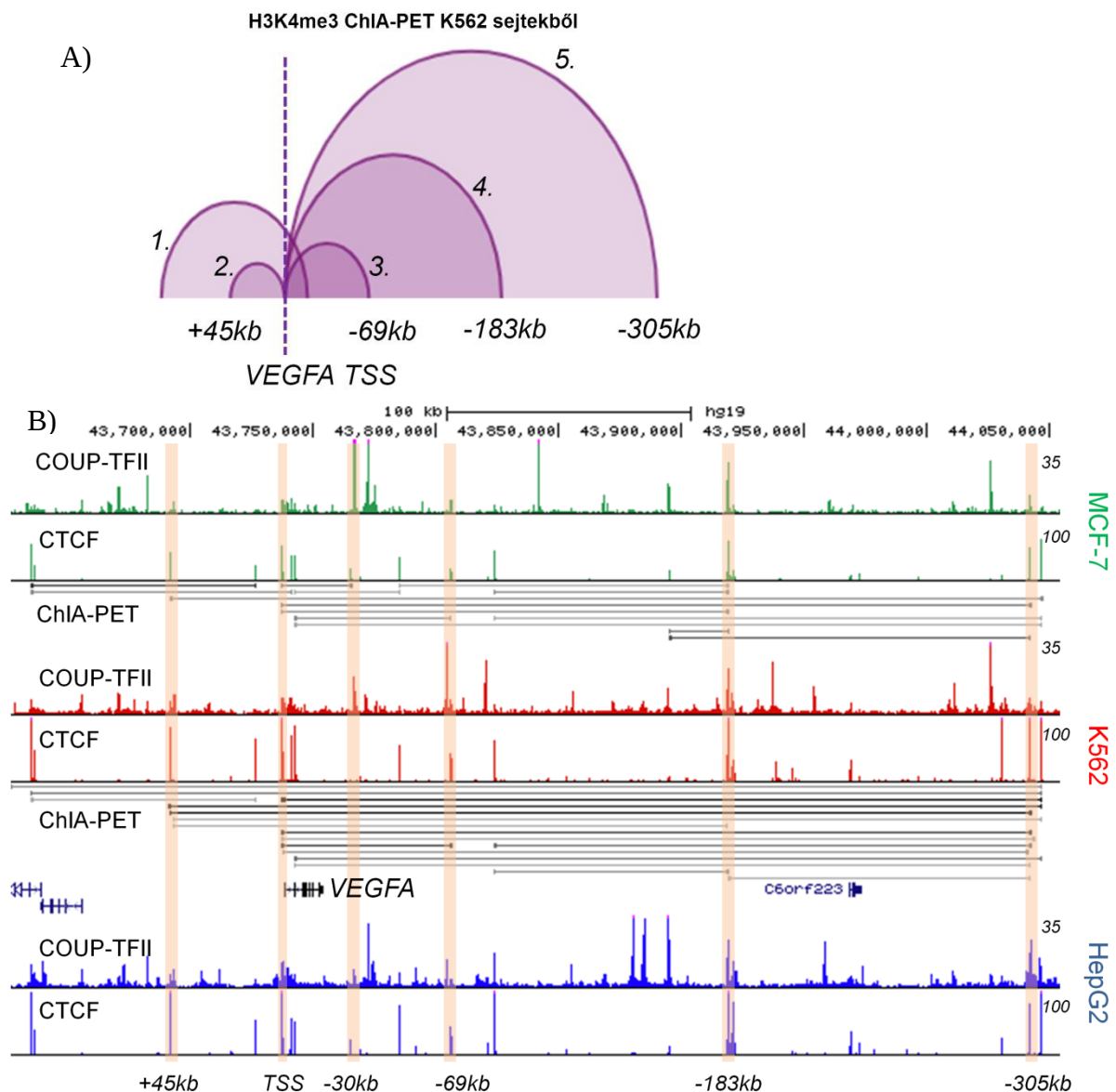
25. ábra: Aktív hiszton módosítások jelenléte COUP-TFII és kofaktoraival kötött régiókon HepG2 és K562 sejtekben. Hisztogramok mutatják az aktív hiszton módosítások ChIP-Seq jelintenzitásának eloszlását egyedi COUP-TFII, egyedi kofaktor és közösen kötött régiókon HepG2 és K562 sejtekben.

4.8. A VEGFA gén szabályozása COUP-TFII által

Korábbi tanulmányok arról számoltak be, hogy a COUP-TFII fontos szerepet játszik az angiogenezisben (Fu et al., 2018; Fred A. Pereira et al., 1999; Qin, Chen, Xie, et al., 2010; Qin, Chen, Yu-Lee, et al., 2010). 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*, *PECAM1*, *PTAFR*, *PTGS1*, *TGFBR3*, *VEGFA* és *ZNF444*), amely angiogenezissel és három sejt-típusban átfedő COUP-TFII kötőhellyel asszociál (**26. ábra**). Ezek közül az angiogenezis egyik fő szabályozóját (Sender DR, 1993), a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A (VEGFA) génjének COUP-TFII általi szabályozására voltunk kíváncsiak. 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 (**27. ábra**). A három sejt-típusban a COUP-TFII kötés mintázata eltérő, de számos olyan régiót is megfigyelhetünk ahol ezek a kötések átfednek egymással, illetve CTCF-el is. ChIA-PET adatok alapján következtetünk kromatin interakciók jelenlétére. A ChIA-PET kombinációja a ChIP és 3C kísérleteknek. A ChIP módszerével meghatározzuk a transzkripciós faktor kötőhelyeit vagy a hiszton módosítások jelenlétét, míg a 3C a kromatin interakciókat képes azonosítani. CTCF ChIA-PET adatokból a CTCF által kialakított kromatin interakciókat láthatjuk. CTCF ChIA-PET adatok (ENCODE adatbázisban elérhető MCF-7 és K562 sejtekből) azt mutatják, 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. Mindez megerősíti, hogy a több sejt-típusban átfedő COUP-TFII CTCF-el ko-lokalizál, és interakcióban vesz részt a promóter és enhanszer régiók között. K562 sejtekből származó H3K4me3 ChIA-PET adatból pedig azt láthatjuk, hogy a COUP-TFII és CTCF által kötött régiók H3K4me3 által jelölt interakcióval is átfednek.



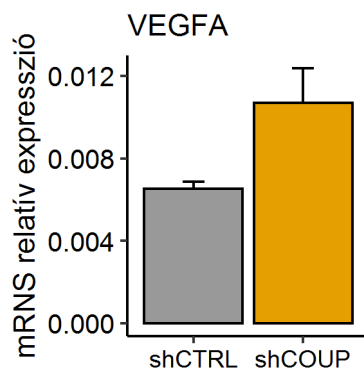
26. ábra: Angiogenikus gének három sejt-típusban átfedő COUP-TFII kötőhelyekkel. Venn diagram mutatja a három sejt-típusban átfedő COUP-TFII kötőhelyekhez asszociált gének és az angiogenesisben szerepet játszó gének közötti átfedést.



27. ábra: COUP-TFII és CTCF kötőhelyek, illetve kromatin hurkok a VEGFA gén körül. A) H3K4me3 által alkotott kromatin hurkok ChIA-PET alapján K562 sejtekben. B) COUP-TFII és CTCF kötőhelyek MCF-7, HepG2 és K562 sejtekben illetve CTCF ChIA-PET által meghatározott kromatin hurkok MCF-7 és K562 sejtekben.

Ez megerősíti a korábbi eredményünket, miszerint a COUP-TFII és CTCF kolokalizált régiók főként a promóter specifikus H3K4me3 jelenlétével korrelálnak. H3K4me3 jelölt interakciók jelenléte ezeken az enhanszer régiókon feltételezi a VEGFA gén promóterével történő fizikai interakciót. Így COUP-TFII és CTCF ko-lokalizált távoli enhanszerek közvetlenül befolyásolhatják a VEGFA gén kifejeződését.

MCF-7 sejtekben a COUP-TFII csendesítése után megvizsgáltuk a VEGFA gén expresszióját. A géncsökkentés hatására közel kétszeresére emelkedett a VEGFA gén expressziója (**28. ábra**). Mindez arra enged következtetni, hogy a COUP-TFII gátló hatással van a VEGFA gén kifejeződésére. A VEGFA megnövekedett expressziója angiogenezissel, limfangiogenezissel és nyirokcsomó metasztázissal korrelál, azaz összességében agresszívabb fenotípusú tumor létrejöttére hajlamosít (Sa-Nguanraksa & O-Charoenrat, 2012). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a COUP-TFII védi a sejteket a rosszabb prognózisú daganatos fenotípus ellen.

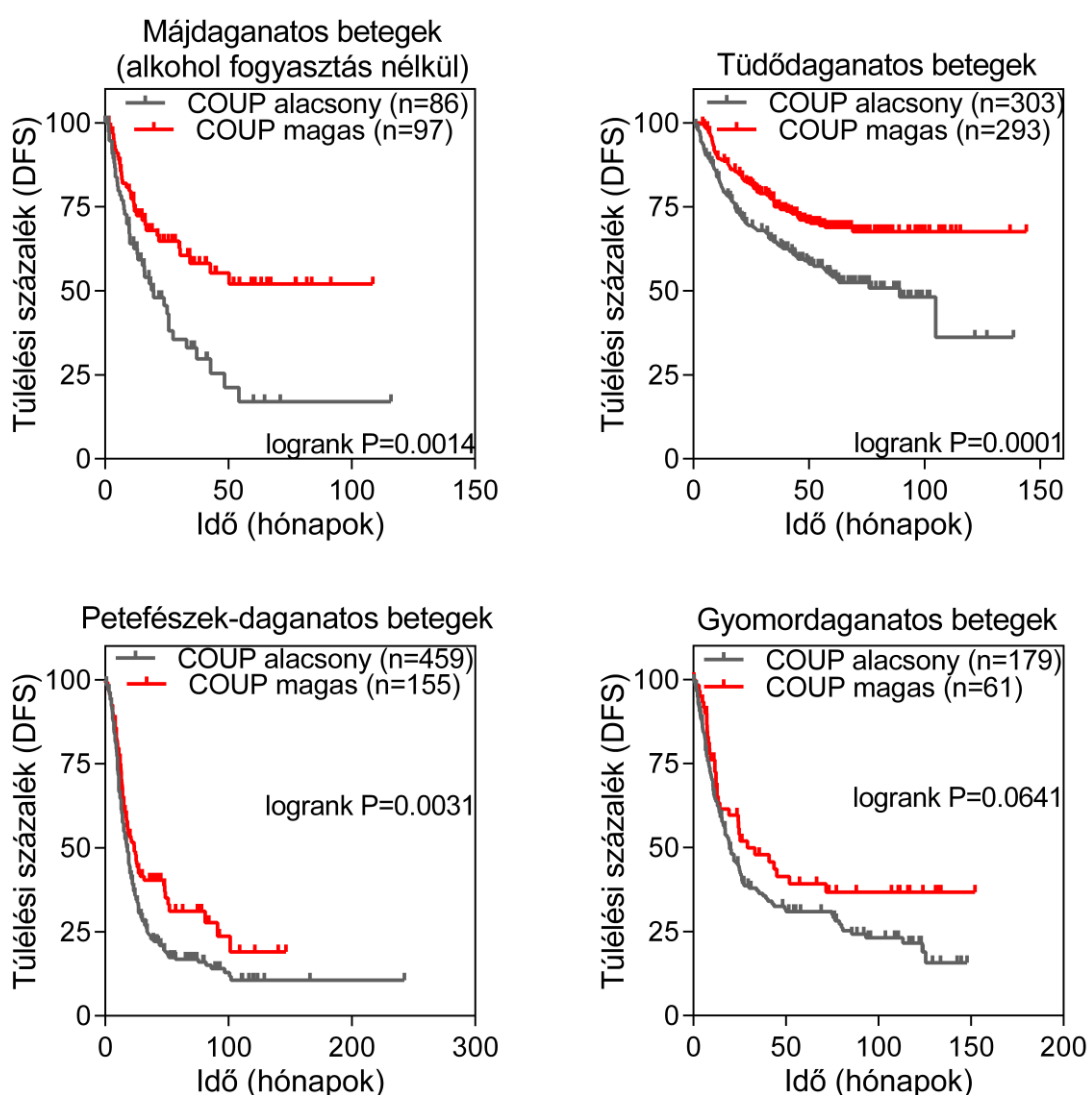


28. ábra: VEGFA gén kifejeződése COUP-TFII csendesítés után. VEGFA mRNS szintje RT-qPCR módszerrel mérve COUP-TFII csendesített MCF-7 sejtekben.

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 jobb betegségmentes túléléssel függ össze (29. ábra). Mindez arra enged következtetni, hogy a COUP-TFII magas expressziója jobb túlélést és prognózist mutat különböző daganatos megbetegedésekben, és mint magreceptor lehetséges terápiás célpontként szolgálhat egy megfelelő liganddal.



29. ábra: Kaplan-Meier elemzés különböző daganattípusban a COUP-TFII expressziós szintjére alapozva. Májdaganatra vonatkozó információk RNS szekvenálási adatokból származnak (Menyhárt et al., 2018), míg a többi esetén microarray adatokból (Gyorffy et al., 2012, 2013; Szász et al., 2016).

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 transzkripció szabályozásról teljes genom szinten keveset tudunk daganatsejtekben (Boudot et al., 2011; Qin et al., 2014; M. Xu et al., 2015). Technológiák fejlődésének köszönhetően teljes genom szinten vizsgálhatjuk meg a kötőhelyeket és a génexpressziót, ami hozzájárul a magreceptorok molekuláris mechanizmusának jobb megértéséhez. Ilyen technológiai fejlesztések egyike a kromatin immunprecipitációt követő szekvenálás (ChIP-Seq), amely manapság a széles körben elterjedt módszerek egyike transzkripció faktorok és kromatin módosítások tanulmányozásában. Az ENCODE Projekt konzorciuma által különböző laboratóriumokban eddig 9018 ChIP-Seq adat lett generálva ChIP-Seq kísérleti irányelvek alapján (Landt et al., 2012). Mindezek ellenére a ChIP komplexitása és standardizáció hiánya miatt klinikai alkalmazása limitált, és a sejtvonalakon végzett kísérletek sem teljes mértékben tükrözik az *in vivo* folyamatokat (O'Neill et al., 2006). Ezek a limitációk számos technikai aspektusból származnak. Ezek közé tartozik a sejtípus, a magas kezdeti sejtszám (10^5 - 10^8 tartományban), vizsgálni kívánt fehérje, fixáció és kromatin fragment optimalizáció, továbbá replikák és kontrollok használata (Kidder et al., 2011; Meyer & Liu, 2014; Park, 2009). Megfelelő affinitású és specifikus antitest használata elengedhetetlen részét képezi a megfelelő immunprecipitációnak (Goens et al., 2009; Peach et al., 2012). Munkánk során olyan fág alapú rendszert hoztunk létre, mely kontrollként használható ChIP folyamata során az ER α antitest specifikusságának nyomonkövetéséhez. Ez az ER α antitest széles körben, és több száz publikációban használt antitest, azonban sajnálatos módon már nincs forgalomban. A fág külső burka az ER α fehérje epitópját utánozza (mimitóp), míg a belsejében lévő egyszálú DNS lehetővé teszi a PCR reakcióban való detektálhatóságát. Ehhez fág bemutatással poliklonális ER α fágot termeltünk,

majd egy több körös szelekció után monoklonális egyedeket hoztunk létre. A monoklonális ER α fágokat ezután ChIP folyamata során teszteltük. Megvizsgáltuk az epitóp veszteségeket ChIP különböző lépéseiben, az ER α fág stabilitását és reprodukálhatóságát. Eredményeink egy könnyen kezelhető, reprodukálható kontrollrendszert kínálnak az antitest karakterizációjához a ChIP folyamata során. Rendszerünk limitációja abban rejlik, hogy ennek a fágnek egyszálú cirkuláris DNS-e van, így nem alkalmas könyvtárkészítéshez és újgenerációs szekvenáláshoz. Hasonló úgynevezett „spike-in” kontrollokról már beszámoltak a ChIP kísérletek különbözőségeinek kiküszöbölésére, azonban kevésbé elterjedtek (Bonhoure et al., 2014; Egan et al., 2016; Grzybowski et al., 2015; Orlando et al., 2014). Ezek többségének lényege, hogy az adott fajból származó kromatinhoz (ember) eltérő fajból származó kromatint (ecetmuslica vagy egér) adnak, majd így végzik el a teljes ChIP-Seq kísérletet hiszton módosítás vagy RNS polimeráz ellenes antitesttel. Adrian T. Grzybowski és munkatársai pedig olyan félszintetikus H3K4me3 hiszton módosítást tartalmazó nukleoszómát hoztak létre, melyeknek meghatározott koncentrációját egyedi DNS kóddal jelölték, így kapott kalibrációs görbe alapján hiszton módosítási sűrűséget számoltak a minták közötti különbség kiküszöbölésére. Mindezek mellett elmondható, hogy a fág bemutatás széles körben használt, azonban mi először írjuk le kontrollként való használatát a ChIP minőség ellenőrzéséhez. Reméljük, hogy ez a fajta minőségellenőrzés a tudományos közösség széles körében válik ismertté.

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 (Manavathi et al., 2014). 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 jelintenzitás is nagyobb a közös kötőhelyeknél, mint önmagukban ezeknél a faktoroknál. Továbbá a közös kötőhelyek aktív enhanszerre specifikus hiszton módosításokkal (H3K27ac és H3K4me1) korrelálnak. Mindez arra enged következtetni, hogy a COUP-TFII az ER α -val transzkripcionálisan aktív helyekhez kötődik. Megvizsgálva a közös kötőhelyek szekvenciáit, olyan motívumok feldúsulását sikerült azonosítanunk, mint a magreceptorokra specifikus NR félhely, FOXA1 és GATA3. Ugyanezek voltak láthatóak olyan ER α kötőhelyeknél, ahol COUP-TFII nem kötődött. Csak COUP-TFII kötőhelyeknél pedig a COUP-TFII-re specifikus DR1 és CTCF motívum figyelhető meg. Egyedi és közös ER α és COUP-TFII kötőhelyeknél megvizsgálva a FOXA1, GATA3 és CTCF ChIP-Seq jelintenzitását azt kaptuk, hogy a közös kötőhelyeknél a FOXA1 és GATA3 jelintenzitása jóval magasabb, mint az egyedi kötőhelyeknél. CTCF ChIP-Seq jelintenzitása pedig az egyedi COUP-TFII kötőhelyekre jellemző. Mindez azt feltételezi, hogy a COUP-TFII része egy olyan transzkripcionálisan aktív komplexnek, ahol az ER α mellett FOXA1 és GATA3 is jelen van. Ezt egy nemrégiben megjelent tanulmány is megerősíti (Jiang et al., 2019). Korábban már több tanulmány is beszámolt arról, hogy az ER α mediált komplexben egyéb magreceptorok is jelen lehetnek. Micheal G. Rosenfeld és munkatársai azonosították, hogy az ER α MegaTransz komplexekben ligand-függő módon egyéb magreceptorok is kötődnek az ER α -hoz fehérje-fehérje (transz) kölcsönhatás révén. Például ösztrogén kezelés hatására az ER α -hoz transz módon a RAR α vagy RAR γ kötődik (Z. Liu et al., 2014), míg ha ösztrogén mellé dexametazont, egy glükokortikoid receptor (GR) agonistát is adunk, akkor a RAR szumoilált GR-ra cserélődik (Yang et al., 2017). Szumoilált GR

korepresszor komplexet fog kötni, így gátolva az ER α függő génkifejeződést és enhanszer aktivitást. Egyéb tanulmányok is leírták az ER α -RAR α (Ross-Innes et al., 2010) és ER α -GR (Karmakar et al., 2013; Miranda et al., 2013; Tonsing-Carter et al., 2019; West et al., 2016) interakciókat emlődaganatban, továbbá olyan egyéb magreceptorok is, mint a PR, AR és LRH-1, képesek interakcióba lépni az ER α -val (Severson et al., 2018; Siersbæk et al., 2018; Truong & Lange, 2018). Itt mi teljes genom szinten számoltunk be COUP-TFII és ER α közötti kapcsolatról. Korábbi tanulmány kimutatta, hogy a COUP-TF képes az ERE-hez kötődni, gátolva ezzel az E2 indukált gén kifejeződést (Carolyn M. Klinge, 1999). Egy másik tanulmányban pedig arról számoltak be, hogy a COUP-TFI mind a DBD és LBD doménjével interakcióban képes lépni az ER α -val, így befolyásolja az ER α N-terminális végének (118-as szerin) foszforilációját, amely az ER α transzkripcionális aktivitását erősíti (Métivier et al., 2002). A COUP-TFI-ER α komplex által az ERK2/p42^{MAPK} kötődése is megnő a komplexben. Mivel nagyfokú homológia figyelhető meg a COUP-TFI és COUP-TFII között, így elképzelhető egy hasonló mechanizmus a COUP-TFII és ER α között is. Többek között azért is, mert a MAPK növeli a COUP-TFII expresszióját emlődaganat sejtekben (Moré et al., 2003). A COUP-TFII esetében egy másik magreceptorral, a GR-rel való interakciójáról számoltak be, ahol azt mutatják, hogy a COUP-TFII a DBD doménjén keresztül képes kötődni a GR híd régiójához (De Martino et al., 2004). A COUP-TFII és ER α egy komplexben való kapcsolatát Mohammed tanulmánya erősíti meg, ahol a 108 ER α asszociált fehérje között a COUP-TFII is megtalálható (Mohammed et al., 2013). Összességében azt mondhatjuk, hogy mindezek a magreceptor-magreceptor kölcsönhatás jelenlétét erősítik a COUP-TFII és ER α között emlődaganat sejtekben. Egy másik lehetséges mechanizmus pedig, hogy a COUP-TFII kötődik az ERE-ekhez, kizorítva, így az ER α -t és befolyásolva a célgének kifejeződését. ChIP-Seq módszer esetén a nagy sejt szám miatt nehéz elkülöníteni, hogy éppen milyen magreceptor kötődhet az adott NR motívumhoz.

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 fejeztek ki magasabban, amelyeknek endokrin rezisztenciában van szerepük, és ugyanakkor ezeknek a géneknek az expressziója emelkedett E2 kezelés hatására is (Creighton et al., 2008; Massarweh et al., 2008). A COUP-TFII csendesítés hatására alacsonyabban kifejeződő gének pedig olyan génszettekhez köthetők, melyek a DREAM (DP, RB-like, E2F4 and MuvB) komplexnek is célgénjei, azaz fontos szerepet töltenek be a sejtciklus szabályozásban (Fischer et al., 2016). Guojuan Jiang és kollégái is azt találták, hogy a COUP-TFII csendesítés hatására sejtciklusban szerepet játszó gének expressziója változik meg (Jiang et al., 2019). Továbbá Harikrishna Nakshatri és kollégái arról számoltak be, hogy a COUP-TFII fontos szerepet tölt be a sejtciklus szabályozásában bizonyos emlődaganat sejtekben azáltal, hogy késlelteti a késői S és G2/M fázis közötti átmenetet cdk2 és ciklin D1 szabályozásán keresztül (Nakshatri et al., 2000). Mindezen eredmények azt mutatják, hogy a COUP-TFII-nek fontos szerepe van olyan gének szabályozásában, melyek meghatározzák a sejt életét.

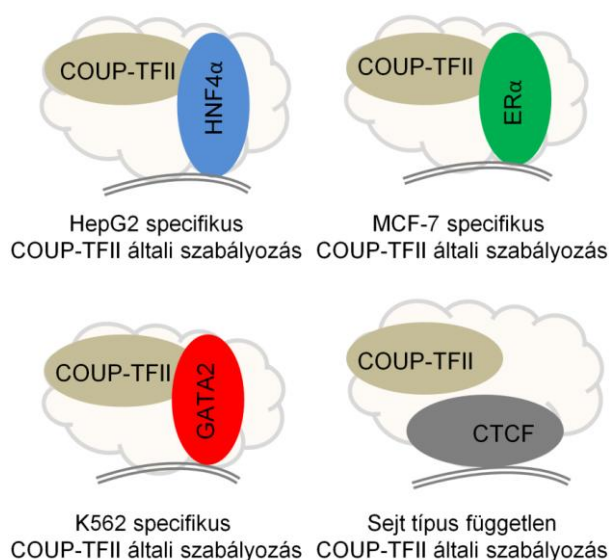
Következőekben azt vizsgáltuk meg, hogy a COUP-TFII expressziója hogyan változik emlődaganatos betegekben. Ehhez 817 betegből származó TCGA által feldolgozott RNS szekvenálási adatot használtuk (Ciriello, Gatza, Beck, Wilkerson, Zmuda, et al., 2015). Azt találtuk, hogy a COUP-TFII expressziója ER-pozitív emlődaganatos betegekben magasabb, mint az ER-negatív betegekben. Néhány korábbi tanulmány is hasonló eredményre jutott azaz, hogy a COUP-TFII expressziója ER-pozitív státusszal korrelál (Litchfield et al., 2012; Nagasaki et al., 2009; C. Zhang et al., 2014). A COUP-TFII expressziójának a túlélésre gyakorolt hatásával kapcsolatban ezek a tanulmányok eltérő eredményeket írtak le. Shuji Nagasaki és kollégái rosszabb túlélést és klinikai kimenetet írtak le, Lacey Litchfield és

kollégái nem találtak különbséget, míg Cheng Zhang és munkacsoportja azt találták, hogy magas COUP-TFII expresszió jobb túlélést mutat. Ennek tisztázására, mi is megvizsgáltuk a túlélési adatokat a KMPlotter adatbázis segítségével, mely 1809 emlődaganatos betegből származó microarray adatot gyűjt össze (Györfy et al., 2010). Először az ER-pozitív és negatív betegekben hasonlítottuk össze a betegségektől mentes túlélést (DFS) a COUP-TFII expressziós szintje alapján. Az ER-negatív betegekben nem találtunk különbséget, csak az ER-pozitív betegekben, ez utóbbi csoportot tovább bontva 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. Luminális B csoportban, mely HER2 pozitivitással is rendelkezik, nem volt különbség a két expressziós szint között a túlélésre vonatkozólag. A legmagasabb COUP-TFII expressziót invazív lobuláris karcinóma (ILC) luminális A típussal rendelkező csoportban találtuk. Az ILC luminális A csoport nagyrésze ER α pozitív, így az IDC betegekhez hasonlóan endokrin terápiát alkalmaznak, ennek ellenére az ILC betegek rosszabb prognózist mutatnak (Du et al., 2018). ILC betegek egy része emelkedett ERK szignálútvonali aktivitást mutat. (Ciriello, Gatza, Beck, Wilkerson, Zmuda, et al., 2015). Emelkedett ERK1/2 pedig emelkedett COUP-TFII fehérje jelenlétével korrelál (Moré et al., 2003). Összességében azt mondhatjuk, hogy jelen tanulmányunkban, először mi számolunk be arról, hogy milyen jelentősége van a COUP-TFII-nek a különböző emlődaganatos betegekre vonatkozólag, kiemelve a luminális A alcsoportot.

A következőkben további daganatsejtekben vizsgáltuk meg a COUP-TFII cisztrómfát, melyhez ENCODE által generált COUP-TFII ChIP-Seq adatokat elemeztünk újra MCF-7 (emlődaganat eredetű), HepG2 (májdaganat eredetű) és K562 (leukémia eredetű) sejtekből. A három kísérlet ugyanabban a laborban lett végezve az ENCODE irányelvei alapján, így akartuk csökkenteni az eltérő kísérleti körülményekből származó eltéréseket. További

emberből származó COUP-TFII ChIP-Seq adatok ganglionléc (neural crest) sejtekből (Rada-Iglesias et al., 2012), endometrium stroma sejtekből (X. Li et al., 2013) és indukált pluripotens őssejt eredetű kardiomiocita sejtekből érhetőek el (Churko et al., 2018). Megvizsgálva az általunk választott három különböző eredetű sejtben a COUP-TFII cisztrómját, 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 (Fournier et al., 2016; Ku et al., 2009). A sejt-típus specifikus COUP-TFII pedig az adott sejtre jellemző mester transzkripció faktor közel felével mutat átfedést, és ezek a helyek aktív enhanszerrel specifikus hiszton módosításokkal (H3K27ac és H3K4me1) korrelálnak (**30. ábra**). A mester transzkripció faktorok felelősek olyan gének szabályozásáért, melyek meghatározzák az adott sejt-típusra jellemző folyamatokat (D. X. Zhang & Glass, 2013). MCF-7 sejtekben az ER α -val mutat átfedést a COUP-TFII, melyek a fentebb leírt eredményeinket erősíti meg különböző adatok használatával. HepG2 sejtekben HNF4 α magreceptor a mester transzkripció faktor (Odom et al., 2004), melynek fele átfed COUP-TFII kötőhelyekkel is. Eleni Ktistaki és Iannis Talianidis tanulmányukban egy olyan fehérje-fehérje interakciót mutatnak be a HNF4 α és COUP-TFII között, amely bizonyos gének aktivációját fokozza (Ktistaki & Talianidis, 1997). A kötődést *in vitro* és *in vivo* körülmények között is megerősítették. A COUP-TFII kapcsolata HNF4 α 227-271 aminosav közötti részével jön létre, és szükséges az AF2 régió (337-368 aminosav közötti régió) sértetlensége is. Egyéb tanulmányok azt mutatják, hogy a HNF4 α és COUP-TFII is DR1-szerű elemeket képes felismerni, így versengve egymás kötőhelyéért (Fang et al., 2012; Ladias & Karathanasis, 1991; Mietus-Snyder et al., 1992). Eredményeink azt mutatják, hogy nemcsak olyan mester

transzkripciós faktorra fed át a COUP-TFII, amelyek magreceptorok is, hanem K562 sejtekben a GATA2 faktorra is. GATA2 mester regulátora az eritroid eredetű sejteknek (Harigae et al., 2006; Weiss & Orkin, 1995). Egy korábbi tanulmányban leírtak egy fizikai interakciót a COUP-TFII és GATA faktorok között preadipocita sejtekben (Z. Xu et al., 2008). Ehhez az interakcióhoz szükség van a GATA két cinkujj doménjére és az azt követő 39 aminosavra. Ugyanakkor nemcsak a mi tanulmányunkban figyelhető meg, hogy a COUP-TFII a mester transzkripciós faktorra képes együttkötődni. Alvaro Rada-Iglesias és munkatársai azt találták, hogy ganglionléc sejtek fő regulátora, az AP2 α (TFAP2A) mellett aktív enhanszereken a COUP-TFII is jelen van (Rada-Iglesias et al., 2012), egy másik tanulmányban pedig a szív fejlődésében kulcs szerepet játszó TBX5 fehérje mellett a COUP-TFII is fontos szerepet játszik kardio-specifikus gének szabályozásában (Churko et al., 2018). Eredményeink azt is mutatják, hogy a COUP-TFII a mester transzkripciós faktorokkal aktív enhanszer régiókkal fednek, ezek a régiók pedig sej-típus specifikus szabályozás meghatározó elemei (Hon et al., 2009). Összességében azt mondhatjuk, hogy ezekkel az eredményekkel egy új szerepét mutatjuk be a COUP-TFII magreceptornak, ami a sej-típus specifikus szabályozásban való részvételét jelenti.



30. ábra: COUP-TFII általi sej-típus és sej-típus független szabályozások sematikus ábrázolása

Mivel számos tanulmány beszámolt arról, hogy a COUP-TFII magreceptornak szerepe van az angiogenezisben (Fu et al., 2018; F A Pereira et al., 2000; Qin, Chen, Xie, et al., 2010), 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. Ezek között megtalálható az angiogenezis fő mediátora a *VEGFA* génje. Közelebbről megvizsgálva ezt a gént azt találtuk, hogy a három különböző eredetű sejt mindegyikében COUP-TFII és CTCF kötött promóter és távoli enhanszer régiók láthatók. CTCF ChIA-PET adatok azt mutatják, hogy ezek a távoli enhanszer régiók és a promóter között CTCF-mediált kromatin interakciók vannak. Mindez azt feltételezi, hogy az enhanszer régiók fizikai kapcsolatban vannak a *VEGFA* gén promóterével, befolyásolva így a gén kifejeződését. Korábbi tanulmányok azt mutatják, hogy a *VEGFA* különböző szabályozó elemek például ösztrogén válaszadó elem, SMAD kötő elem, hipoxia válaszadó elem és Wnt/ β -katenin válaszadó elem által szabályozódhat. Itt mi *VEGFA* génjéhez köthető COUP-TFII kötőhelyekkel rendelkező szabályozó elemekről számolunk be három különböző eredetű sejtben. 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. Korábbi tanulmányok azt mutatják, hogy magas *VEGFA* jelenléte rossz prognózissal, metasztázissal és rossz túléléssel asszociál emlődaganatos betegekben (Ghosh et al., 2008; Sa-Nguanraksa & O-Charoenrat, 2012). 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. Weiji Ding és kollégái tanulmányában megerősíti a kapott eredményünket gyomordaganatban (Ding et al., 2018). Az általunk vizsgált daganattípusokban nincsenek egyéb túlélésre vonatkozó összehasonlítható eredmények. Összességében ezek az eredmények tovább erősítik a COUP-TFII jelenlétének jótékony hatását tumoros sejtekben, betegeken.

Az eredményeink összességében betekintést engednek a COUP-TFII általi szabályozási mechanizmusokba különböző daganatsejtekben. COUP-TFII, mint a mester transzkripciós faktorok koregulátora fontos szerepet tölt be a sejt-típus specifikus szabályozásban. A COUP-TFII képes bizonyos mester transzkripciós faktorokkal fehérje-fehérje kölcsönhatásban részt venni, ezzel befolyásolva az adott mester transzkripciós faktor működését vagy képes elfoglalni a mester transzkripciós faktorok DNS felismerő szekvenciáját hatást gyakorolva ezzel az adott gén kifejeződésére. ER-pozitív emlődaganatban részt vesz az endokrin terápiára rezisztens gének és sejtciklust meghatározó gének szabályozásban. Különböző daganatos megbetegedésekben (emlő-, tüdő-, máj, petefészek és gyomordaganat) magas expressziós szintje hozzájárul jobb túléléshez és kimenethez. A COUP-TFII mint magreceptor akár fontos terápiás célpontként vagy biomarkerként is szolgálhat a daganatos megbetegedések.

Az értekezés új megállapításai:

- Létrehoztunk egy fágbemutatáson alapuló kontroll rendszert ER α vizsgálatához használt kromatin immunprecipitációs (ChIP) kísérletekhez. Az alkalmazott módszer alapján számos antitest alkalmazhatóságát meg tudjuk vizsgálni ChIP-qPCR kísérletekben.
- Az ER α egy kulcsfontosságú magreceptor az emlődaganatban, így az ER α -mediált szabályozások megértése nagy jelentőséggel bír a betegség kimenetelét illetően. Munkánk során a COUP-TFII árva magreceptor jelentőségét vizsgáltuk meg ER-pozitív emlődaganatban. Genomszintű vizsgálataink ER-pozitív emlődaganat sejtekből azt mutatják, hogy a COUP-TFII kötőhelyek 90%-a fed át ER α általi kötőeseményekkel. Továbbá a COUP-TFII olyan transzkripcionálisan aktív ER α kötőhelyeken található meg, ahol ismert ER α koregulátorok, a FOXA1 és a GATA3 faktorok is megtalálhatóak.
- COUP-TFII csendesített ER-pozitív emlődaganat sejtek transzkriptóm profilozásával kimutattuk, hogy COUP-TFII olyan géneket szabályoz, amely ER α által is szabályozottak. Mindez megerősíti, hogy a COUP-TFII, mint ER α koregulátor fontos szerepet játszik az ER α -mediált szabályozásokban.
- Emlődaganatos betegekben a COUP-TFII expressziójának vizsgálata során, azt találtuk, hogy a COUP-TFII magas expressziós szintet mutat luminális A fenotípussal (ER+/HER2-) rendelkező betegekben. Továbbá azt mutattuk ki, hogy COUP-TFII magas expressziós szintje jobb túléléssel korrelál, mint az alacsony COUP-TFII expressziós szint, de csak luminális A alcsoportba tartozó betegekben. Egyéb alcsoportba tartozó betegekben nem lehetett kimutatni különbséget a túlélésre vonatkozólag. Mindez azt jelenti, hogy a COUP-TFII jótékony hatása csak az ER α jelenléte mellett kimutatható.

- Különböző eredetű daganatsejtekben (emlő-, májdaganat és leukémia) a COUP-TFII cisztrómjának feltérképezése során kimutattuk, hogy a COUP-TFII az egyedi sejt-típusra jellemző mester transzkripciós faktorra olyan aktív enhanszer elemeken található, amely hozzájárul a sejt-típus specifikus gének szabályozásához.
- Különböző eredetű sejtekben átfedő COUP-TFII kötőhelyek meghatározó faktorra a kromatin interakciókban szerepet játszó CTCF. Ezen kötőhelyek egyik potenciális célpontjaként az angiogenezis fő mediátorát, a *VEGFA* gént azonosítottuk.
- Különböző eredetű (máj, tüdő, gyomor és petefészek) daganatos betegek túlélésének vizsgálata során azt találtuk, hogy a COUP-TFII magas szintje jobb túléléssel korrelál, mint az alacsony COUP-TFII expressziós szint.

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 α) antitest példáján keresztül, mellyel ChIP antitestek karakterizációja válik lehetővé ChIP-qPCR kísérletekben. Az ER α kulcsfontosságú magreceptor az emlőrák kezelésében és kimenetelében. Munkánk során a COUP-TFII árva magreceptor szerepét vizsgáltuk meg ER-pozitív emlődaganat sejtekben és betegekben funkcionális genomikai módszerek alkalmazásával. Eredményeink azt mutatják, hogy a COUP-TFII, mint koregulátor jelen van az ER α -mediált transzkripciós komplexben, és hatással van ER α 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 faktorról lokalizálódik együtt. Különböző eredetű sejtekben közös COUP-TFII kötőhelyeket azonosítottunk a *VEGFA* gén szabályozó régióiban. Emlődaganat sejtekben a COUP-TFII gátló hatással van ennek az angiogénikus 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 tumorszuppresszor hatása van mester transzkripciós faktorok mellett különböző daganatos betegségekben.

7. SUMMARY

Nuclear receptors, as ligand-activated transcription factors, can influence directly the gene expression. Changes in gene expression are a hallmark of cancer. Genome-wide studies make it possible to study the transcriptional program by nuclear receptors, which brings us closer to understanding the disease. The most widely used method for the regulation of nuclear receptor is chromatin immunoprecipitation (ChIP). In our study, we have established a phage display control system through the example of estrogen receptor alpha (ER α) antibody that enables the characterization of ChIP antibodies in ChIP-qPCR experiments. ER α is a key nuclear receptor in the treatment and outcome of breast cancer. We investigated the role of COUP-TFII orphan nuclear receptor in ER-positive breast cancer cells and patients using functional genomics approaches. Our results indicate that COUP-TFII, as a co-regulator, is present in the ER α -mediated transcriptional complex and affects the expression of ER α target genes. Furthermore, high expression levels of COUP-TFII correlate with improved survival in patients with ER-positive luminal A phenotype. Examining the cistrome of COUP-TFII in other tumor cells, we found that COUP-TFII co-localizes with the cell-type-specific master transcription factor. Common COUP-TFII binding sites in cells of different origins were identified in the regulatory regions of the *VEGFA* gene. In breast cancer cells, COUP-TFII inhibits the expression of this angiogenic gene. Investigation of survivals in various cancer patients has found that high expression levels of COUP-TFII correlate with improved survival rate. In summary, the presence of the COUP-TFII nuclear receptor has a tumor suppressor effect with master transcription factors in various cancers.

Felhasznált irodalom

- Arao, Y., & Korach, K. S. (2018). The F domain of estrogen receptor is involved in species-specific, tamoxifen-mediated transactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 293(22), 8495–8507. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001212>
- Ashoor, H., Héroult, A., Kamoun, A., Radványi, F., Bajic, V. B., Barillot, E., & Boeva, V. (2013). HMCan: A method for detecting chromatin modifications in cancer samples using ChIP-seq data. *Bioinformatics*, 29(23), 2979–2986. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt524>
- Auwerx, J., Baulieu, E., Beato, M., Becker-Andre, M., Burbach, P. H., Camerino, G., Chambon, P., Cooney, A., Dejean, A., Dreyer, C., Evans, R. M., Gannon, F., Giguere, V., Gronemeyer, H., Gustafsson, J. A., Laudet, V., Lazar, M. A., Mangelsdorf, D. J., Millbrandt, J., ... Yamamoto, K. (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. In *Cell* (Vol. 97, Issue 2, pp. 161–163). Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80726-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80726-6)
- Barnett, D. H., Sheng, S., Charn, T. H., Waheed, A., Sly, W. S., Lin, C. Y., Liu, E. T., & Katzenellenbogen, B. S. (2008). Estrogen receptor regulation of carbonic anhydrase XII through a distal enhancer in breast cancer. *Cancer Research*, 68(9), 3505–3515. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6151>
- Barta, E. (2011). Command line analysis of ChIP-seq results. In *EMBnet.journal* (Vol. 17, Issue 1). EMBnet, Administration Office. <http://journal.embnet.org/index.php/embnetjournal/article/view/209/480>
- Bennesch, M. A., & Picard, D. (2015). Minireview: Tipping the balance: ligand-independent activation of steroid receptors. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 29(3), 349–363. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1315>
- Bojcsuk, D., Nagy, G., & Balint, B. L. (2017). Inducible super-enhancers are organized based on canonical signal-specific transcription factor binding elements. *Nucleic Acids Research*, 45(7), 3693–3706. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1283>
- Bonéy-Montoya, J., Ziegler, Y. S., Curtis, C. D., Montoya, J. A., & Nardulli, A. M. (2010). Long-Range Transcriptional Control of Progesterone Receptor Gene Expression. *Molecular Endocrinology*, 24(2), 346–358. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0429>
- Bonhoure, N., Bounova, G., Bernasconi, D., Praz, V., Lammers, F., Canella, D., Willis, I. M., Herr, W., Hernandez, N., Delorenzi, M., Deplancke, B., Desvergne, B., Guex, N., Naef, F., Rougemont, J., Schibler, U., Andersin, T., Cousin, P., Gilardi, F., ... Symul, L. (2014). Quantifying ChIP-seq data: A spiking method providing an internal reference for sample-to-sample normalization. *Genome Research*, 24(7), 1157–1168. <https://doi.org/10.1101/gr.168260.113>
- Bookout, A. L., Jeong, Y., Downes, M., Yu, R. T., Evans, R. M., & Mangelsdorf, D. J. (2006). Anatomical Profiling of Nuclear Receptor Expression Reveals a Hierarchical Transcriptional Network. *Cell*, 126(4), 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.049>
- Boudot, A., le Dily, F., & Pakdel, F. (2011). Involvement of COUP-TFs in cancer progression. In *Cancers* (Vol. 3, Issue 1, pp. 700–715). <https://doi.org/10.3390/cancers3010700>
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., & Moras, D. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nature*, 375(6530), 377–382. <https://doi.org/10.1038/375377a0>
- Brzozowski, A. M., Pike, A. C. W., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engström, O., Öhman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. Å., & Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and

- antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389(6652), 753–758. <https://doi.org/10.1038/39645>
- Bulyanko, Y. A., & O'Malley, B. W. (2011). Nuclear receptor coactivators: structural and functional biochemistry. *Biochemistry*, 50(3), 313–328. <https://doi.org/10.1021/bi101762x>
- Burns, K. A., & Korach, K. S. (2012). Estrogen receptors and human disease: An update. In *Archives of Toxicology* (Vol. 86, Issue 10, pp. 1491–1504). <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0868-5>
- Butler, A. J., & Parker, M. G. (1995). COUP-TF II homodimers are formed in preference to heterodimers with RXR α or TR β in intact cells. *Nucleic Acids Research*, 23(20), 4143–4150. <https://doi.org/10.1093/nar/23.20.4143>
- Carroll, J. S., Liu, X. S., Brodsky, A. S., Li, W., Meyer, C. A., Szary, A. J., Eeckhoutte, J., Shao, W., Hestermann, E. V., Geistlinger, T. R., Fox, E. A., Silver, P. A., & Brown, M. (2005). Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell*, 122(1), 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.008>
- Carroll, J. S., Meyer, C. A., Song, J., Li, W., Geistlinger, T. R., Eeckhoutte, J., Brodsky, A. S., Keeton, E. K., Fertuck, K. C., Hall, G. F., Wang, Q., Bekiranov, S., Sementchenko, V., Fox, E. A., Silver, P. A., Gingeras, T. R., Liu, X. S., & Brown, M. (2006). Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nature Genetics*, 38(11), 1289–1297. <https://doi.org/10.1038/ng1901>
- Chen, X., Qin, J., Cheng, C.-M., Tsai, M.-J., & Tsai, S. Y. (2012). COUP-TFII is a major regulator of cell cycle and Notch signaling pathways. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 26(8), 1268–1277. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1305>
- Churko, J. M., Garg, P., Treutlein, B., Venkatasubramanian, M., Wu, H., Lee, J., Wessells, Q. N., Chen, S. Y., Chen, W. Y., Chetal, K., Mantalas, G., Neff, N., Jabart, E., Sharma, A., Nolan, G. P., Salomonis, N., & Wu, J. C. (2018). Defining human cardiac transcription factor hierarchies using integrated single-cell heterogeneity analysis. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07333-4>
- Ciriello, G., Gatza, M. L., Beck, A. H., Wilkerson, M. D., Rhie, S. K., Pastore, A., Zhang, H., McLellan, M., Yau, C., Kandoth, C., Bowlby, R., Shen, H., Hayat, S., Fieldhouse, R., Lester, S. C., Tse, G. M. K., Factor, R. E., Collins, L. C., Allison, K. H., ... Perou, C. M. (2015). Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell*, 163(2), 506–519. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.033>
- Ciriello, G., Gatza, M. L., Beck, A. H., Wilkerson, M. D., Rhie, S. K., Pastore, A., Zhang, H., McLellan, M., Yau, C., Kandoth, C., Bowlby, R., Shen, H., Hayat, S., Fieldhouse, R., Lester, S. C., Tse, G. M. K., Factor, R. E., Collins, L. C., Allison, K. H., ... Zmuda, E. (2015). Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell*, 163(2), 506–519. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.033>
- Claessens, F., & Gewirth, D. T. (2004). DNA recognition by nuclear receptors. In *Essays in Biochemistry* (Vol. 40, pp. 59–72). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/bse0400059>
- Clarke, R., Liu, M. C., Bouker, K. B., Gu, Z., Lee, R. Y., Zhu, Y., Skaar, T. C., Gomez, B., O'Brien, K., Wang, Y., & Hilakivi-Clarke, L. A. (2003). Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. In *Oncogene* (Vol. 22, Issue 47 REV. ISS. 6, pp. 7316–7339). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206937>
- Cole, M. P., Jones, C. T. A., & Todd, I. D. H. (1971). A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer an early clinical appraisal of ICI46474. *British Journal of Cancer*, 25(2), 270–275. <https://doi.org/10.1038/bjc.1971.33>
- Cooney, A. J., Leng, X., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W., & Tsai, M. J. (1993). Multiple mechanisms of

- chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-dependent repression of transactivation by the vitamin D, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(6), 4152–4160. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8382695>
- Cooney, A. J., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W., & Tsai, M. J. (1992). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) dimers bind to different GGTCA response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D3, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *Molecular and Cellular Biology*, 12(9), 4153–4163. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.9.4153>
- Creighton, C. J., Massarweh, S., Huang, S., Tsimelzon, A., Hilsenbeck, S. G., Osborne, C. K., Shou, J., Malorni, L., & Schiff, R. (2008). Development of resistance to targeted therapies transforms the clinically associated molecular profile subtype of breast tumor xenografts. *Cancer Research*, 68(18), 7493–7501. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1404>
- De Martino, M. U., Bhattacharyya, N., Alesci, S., Ichijo, T., Chrousos, G. P., & Kino, T. (2004). The glucocorticoid receptor and the orphan nuclear receptor chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II interact with and mutually affect each other's transcriptional activities: Implications for intermediary metabolism. *Molecular Endocrinology*, 18(4), 820–833. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0341>
- Déjardin, J., & Kingston, R. E. (2009). Purification of Proteins Associated with Specific Genomic Loci. *Cell*, 136(1), 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.045>
- Deroo, B. J., & Korach, K. S. (2006). Estrogen receptors and human disease. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 116, Issue 3, pp. 561–570). <https://doi.org/10.1172/JCI27987>
- Deschênes, J., Bourdeau, V., White, J. H., & Mader, S. (2007). Regulation of GREB1 transcription by estrogen receptor alpha through a multipartite enhancer spread over 20 kb of upstream flanking sequences. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(24), 17335–17339. <https://doi.org/10.1074/jbc.C700030200>
- Dhiman, V. K., Bolt, M. J., & White, K. P. (2018). Nuclear receptors in cancer - Uncovering new and evolving roles through genomic analysis. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 19, Issue 3, pp. 160–174). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.102>
- Ding, W., Zhang, Y., Cai, H., Liu, G., Ye, Y., Xu, G., Wang, H., Xiong, D., Zhang, C., Huang, Z., & Luo, Q. (2018). Overexpression of COUP-TFII suppresses proliferation and metastasis of human gastric cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 17(2), 2393–2401. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8164>
- Du, T., Zhu, L., Levine, K. M., Tasdemir, N., Lee, A. V., Vignali, D. A. A., Houten, B. Van, Tseng, G. C., & Oesterreich, S. (2018). Invasive lobular and ductal breast carcinoma differ in immune response, protein translation efficiency and metabolism. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25357-0>
- Egan, B., Yuan, C. C., Craske, M. L., Labhart, P., Guler, G. D., Arnott, D., Maile, T. M., Busby, J., Henry, C., Kelly, T. K., Tindell, C. A., Jhunjunwala, S., Zhao, F., Hatton, C., Bryant, B. M., Classon, M., & Trojer, P. (2016). An alternative approach to ChIP-Seq normalization enables detection of genome-wide changes in histone H3 lysine 27 trimethylation upon EZH2 inhibition. *PLoS ONE*, 11(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166438>
- Fang, B., Mane-Padros, D., Bolotin, E., Jiang, T., & Sladek, F. M. (2012). Identification of a binding motif specific to HNF4 by comparative analysis of multiple nuclear receptors. *Nucleic Acids Research*, 40(12), 5343–5356. <https://doi.org/10.1093/nar/gks190>
- Farooq, A. (2015). Structural and Functional Diversity of Estrogen Receptor Ligands. *Current Topics*

- Fischer, M., Grossmann, P., Padi, M., & DeCaprio, J. A. (2016). Integration of TP53, DREAM, MMB-FOXO1 and RB-E2F target gene analyses identifies cell cycle gene regulatory networks. *Nucleic Acids Research*, 44(13), 6070–6086. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw523>
- Fournier, M., Bourriquen, G., Lamaze, F. C., Côté, M. C., Fournier, É., Joly-Beauparlant, C., Caron, V., Gobeil, S., Droit, A., & Bilodeau, S. (2016). FOXA and master transcription factors recruit Mediator and Cohesin to the core transcriptional regulatory circuitry of cancer cells. *Scientific Reports*, 6, 34962. <https://doi.org/10.1038/srep34962>
- Fu, J.-L., Hsiao, K.-Y., Lee, H.-C., Li, W.-N., Chang, N., Wu, M.-H., & Tsai, S.-J. (2018). Suppression of COUP-TFII upregulates angiogenin and promotes angiogenesis in endometriosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey220>
- Fullwood, M. J., Liu, M. H., Pan, Y. F., Liu, J., Xu, H., Mohamed, Y. Bin, Orlov, Y. L., Velkov, S., Ho, A., Mei, P. H., Chew, E. G. Y., Huang, P. Y. H., Welboren, W. J., Han, Y., Ooi, H. S., Ariyaratne, P. N., Vega, V. B., Luo, Y., Tan, P. Y., ... Ruan, Y. (2009). An oestrogen-receptor- α -bound human chromatin interactome. *Nature*, 462(7269), 58–64. <https://doi.org/10.1038/nature08497>
- Ghosh, S., Sullivan, C. A. W., Zerkowski, M. P., Molinaro, A. M., Rimm, D. L., Camp, R. L., & Chung, G. G. (2008). High levels of vascular endothelial growth factor and its receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilin-1) are associated with worse outcome in breast cancer. *Human Pathology*, 39(12), 1835–1843. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2008.06.004>
- Giguère, V. (1999). Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function*. *Endocrine Reviews*, 20(5), 689–725. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.5.0378>
- Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. In *Genes and Development* (Vol. 14, Issue 2, pp. 121–141). <https://doi.org/10.1101/gad.14.2.121>
- Goens, G., Rusu, D., Bultot, L., Goval, J.-J., & Magdalena, J. (2009). Characterization and quality control of antibodies used in ChIP assays. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 567, 27–43. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-414-2_2
- Gomperts, B. D., Tatham, P. E. R. (Life scientist), & Kramer, I. M. (2009). *Signal transduction*. Elsevier/Academic Press.
- Gottardis, M. M., Robinson, S. P., & Jordan, V. C. (1988). Estradiol-stimulated growth of MCF-7 tumors implanted in athymic mice: A model to study the tumorigenic action of tamoxifen. *Journal of Steroid Biochemistry*, 30(1–6), 311–314. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(88\)90113-6](https://doi.org/10.1016/0022-4731(88)90113-6)
- Green, S., & Chambon, P. (1988). Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. In *Trends in Genetics* (Vol. 4, Issue 11, pp. 309–314). [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(88\)90108-4](https://doi.org/10.1016/0168-9525(88)90108-4)
- Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., & Huber, J. C. (2002). Production and Actions of Estrogens. *New England Journal of Medicine*, 346(5), 340–352. <https://doi.org/10.1056/NEJMra000471>
- Grzybowski, A. T., Chen, Z., & Ruthenburg, A. J. (2015). Calibrating ChIP-Seq with Nucleosomal Internal Standards to Measure Histone Modification Density Genome Wide. *Molecular Cell*, 58(5), 886–899. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.022>

- Györfy, B., Lanczky, A., Eklund, A. C., Denkert, C., Budczies, J., Li, Q., & Szallasi, Z. (2010). An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. In *Breast Cancer Research and Treatment* (Vol. 123, Issue 3, pp. 725–731). <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0674-9>
- Györfy, B., Lanczky, A., & Szállási, Z. (2012). Implementing an online tool for genomewide validation of survival-associated biomarkers in ovarian-cancer using microarray data from 1287 patients. *Endocrine-Related Cancer*, 19(2), 197–208. <https://doi.org/10.1530/ERC-11-0329>
- Györfy, B., Surowiak, P., Budczies, J., & Lanczky, A. (2013). Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082241>
- Haelens, A., Tanner, T., Denayer, S., Callewaert, L., & Claessens, F. (2007). The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor. *Cancer Research*, 67(9), 4514–4523. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1701>
- Hah, N., & Kraus, W. L. (2014). Hormone-regulated transcriptomes: Lessons learned from estrogen signaling pathways in breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 652–664. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.06.021>
- Hah, N., Murakami, S., Nagari, A., Danko, C. G., & Lee Kraus, W. (2013). Enhancer transcripts mark active estrogen receptor binding sites. *Genome Research*, 23(8), 1210–1223. <https://doi.org/10.1101/gr.152306.112>
- Hamilton, K. J., Hewitt, S. C., Arao, Y., & Korach, K. S. (2017). Estrogen Hormone Biology. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 125, pp. 109–146). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.12.005>
- Harigae, H., Okitsu, Y., Yokoyama, H., Fujiwara, T., Inomata, M., Takahashi, S., Minegishi, N., Kaku, M., & Sasaki, T. (2006). Induction of erythroid-specific genes by overexpression of GATA-2 in K562 cells. *International Journal of Hematology*, 84(1), 38–42. <https://doi.org/10.1532/IJH97.06020>
- Hawkins, S. M., Loomans, H. A., Wan, Y.-W., Ghosh-Choudhury, T., Coffey, D., Xiao, W., Liu, Z., Sangi-Haghpeykar, H., & Anderson, M. L. (2013). Expression and functional pathway analysis of nuclear receptor NR2F2 in ovarian cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(7), E1152–62. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1081>
- Holmes, K. A., Hurtado, A., Brown, G. D., Launchbury, R., Ross-Innes, C. S., Hadfield, J., Odom, D. T., & Carroll, J. S. (2012). Transducin-like enhancer protein 1 mediates estrogen receptor binding and transcriptional activity in breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), 2748–2753. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018863108>
- Hon, G. C., Hawkins, R. D., & Ren, B. (2009). Predictive chromatin signatures in the mammalian genome. *Human Molecular Genetics*, 18(R2). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp409>
- Hong, W., Baniahmad, A., Liu, Y., & Li, H. (2008). Bag-1M Is a Component of the In Vivo DNA-Glucocorticoid Receptor Complex at Hormone-Regulated Promoter. *Journal of Molecular Biology*, 384(1), 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.010>
- Hu, X., & Lazar, M. A. (2000). Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 11, Issue 1, pp. 6–10). [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(99\)00215-5](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(99)00215-5)
- Huang, P., Chandra, V., & Rastinejad, F. (2010). Structural Overview of the Nuclear Receptor Superfamily: Insights into Physiology and Therapeutics. *Annual Review of Physiology*, 72(1),

- Hudson, W. H., Kossmann, B. R., De Vera, I. M. S., Chuo, S. W., Weikum, E. R., Eick, G. N., Thornton, J. W., Ivanov, I. N., Kojetin, D. J., & Ortlund, E. A. (2016). Distal substitutions drive divergent DNA specificity among paralogous transcription factors through subdivision of conformational space. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(2), 326–331. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518960113>
- Hulsen, T., de Vlieg, J., & Alkema, W. (2008). BioVenn – a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics*, 9(1), 488. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-488>
- Isakova, A., Berset, Y., Hatzimanikatis, V., & Deplancke, B. (2016). Quantification of cooperativity in heterodimer-DNA binding improves the accuracy of binding specificity models. *Journal of Biological Chemistry*, 291(19), 10293–10306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.691154>
- Jeong, B. C., Hong, C. Y., Chattopadhyay, S., Park, J. H., Gong, E. Y., Kim, H. J., Chun, S. Y., & Lee, K. (2004). Androgen Receptor Corepressor-19 kDa (ARR19), a Leucine-Rich Protein that Represses the Transcriptional Activity of Androgen Receptor through Recruitment of Histone Deacetylase. *Molecular Endocrinology*, 18(1), 13–25. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0065>
- Jiang, G., Wang, X., Sheng, D., Zhou, L., Liu, Y., Xu, C., Liu, S., & Zhang, J. (2019). Cooperativity of co-factor NR2F2 with Pioneer Factors GATA3, FOXA1 in promoting ER α function. *Theranostics*, 9(22), 6501–6516. <https://doi.org/10.7150/thno.34874>
- Johnson, D. S., Mortazavi, A., Myers, R. M., & Wold, B. (2007). Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. *Science*, 316(5830), 1497–1502. <https://doi.org/10.1126/science.1141319>
- Kang, J., Yoo, J., Lee, S., Tang, W., Aguilar, B., Ramu, S., Choi, I., Otu, H. H., Shin, J. W., Dotto, G. P., Koh, C. J., Detmar, M., & Hong, Y.-K. (2010). An exquisite cross-control mechanism among endothelial cell fate regulators directs the plasticity and heterogeneity of lymphatic endothelial cells. *Blood*, 116(1), 140–150. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-252270>
- Karmakar, S., Jin, Y., & Nagaich, A. K. (2013). Interaction of glucocorticoid receptor (GR) with estrogen receptor (ER) α and activator protein 1 (AP1) in dexamethasone-mediated interference of ER α activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(33), 24020–24034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.473819>
- Khorasanizadeh, S., & Rastinejad, F. (2001). Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 26, Issue 6, pp. 384–390). [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01800-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01800-X)
- Kidder, B. L., Hu, G., & Zhao, K. (2011). ChIP-Seq: Technical considerations for obtaining high-quality data. In *Nature Immunology* (Vol. 12, Issue 10, pp. 918–922). <https://doi.org/10.1038/ni.2117>
- Kliwer, S. A., Umesono, K., Heymant, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., & Evans, R. M. (1992). Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signaling (heterodimer/hormone response element/orphan receptor). 89(February), 1448–1452. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.4.1448>
- Klinge, C. M. (1999). Role of estrogen receptor ligand and estrogen response element sequence on interaction with chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF). *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 71(1–2), 1–19. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(99\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(99)00124-7)
- Klinge, C. M., Silver, B. F., Driscoll, M. D., Sathya, G., Bambara, R. A., & Hilf, R. (1997). Chicken

- ovalbumin upstream promoter-transcription factor interacts with estrogen receptor, binds to estrogen response elements and half-sites, and inhibits estrogen-induced gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(50), 31465–31474. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31465>
- Kruse, S. W., Suino-Powell, K., Zhou, X. E., Kretschman, J. E., Reynolds, R., Vonnrhein, C., Xu, Y., Wang, L., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., & Xu, H. E. (2008). Identification of COUP-TFII orphan nuclear receptor as a retinoic acid-activated receptor. *PLoS Biology*, 6(9), 2002–2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060227>
- Ktistaki, E., & Talianidis, I. (1997). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors act as auxiliary cofactors for hepatocyte nuclear factor 4 and enhance hepatic gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 17(5), 2790–2797. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.5.2790>
- Ku, W.-C., Chiu, S.-K., Chen, Y.-J., Huang, H.-H., Wu, W.-G., & Chen, Y.-J. (2009). Complementary quantitative proteomics reveals that transcription factor AP-4 mediates E-box-dependent complex formation for transcriptional repression of HDM2. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 8(9), 2034–2050. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900013-MCP200>
- Kumar, R., & McEwan, I. J. (2012). Allosteric modulators of steroid hormone receptors: Structural dynamics and gene regulation. In *Endocrine Reviews* (Vol. 33, Issue 2, pp. 271–299). <https://doi.org/10.1210/er.2011-1033>
- Kushner, P. J., Agard, D. A., Greene, G. L., Scanlan, T. S., Shiau, A. K., Uht, R. M., & Webb, P. (2000). Estrogen receptor pathways to AP-1. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 74(5), 311–317. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(00\)00108-4](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(00)00108-4)
- Ladias, J. A. A., & Karathanasis, S. K. (1991). Regulation of the apolipoprotein AI gene by ARP-1, a novel member of the steroid receptor superfamily. *Science*, 251(4993), 561–565. <https://doi.org/10.1126/science.1899293>
- Landt, S. G., Marinov, G. K., Kundaje, A., Kheradpour, P., Pauli, F., Batzoglou, S., Bernstein, B. E., Bickel, P., Brown, J. B., Cayting, P., Chen, Y., DeSalvo, G., Epstein, C., Fisher-Aylor, K. I., Euskirchen, G., Gerstein, M., Gertz, J., Hartemink, A. J., Hoffman, M. M., ... Snyder, M. (2012). ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. In *Genome Research* (Vol. 22, Issue 9, pp. 1813–1831). <https://doi.org/10.1101/gr.136184.111>
- Laudet, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: Early diversification from an ancestral orphan receptor. In *Journal of Molecular Endocrinology* (Vol. 19, Issue 3, pp. 207–226). <https://doi.org/10.1677/jme.0.0190207>
- Le Romancer, M., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S. P., Renoir, J. M., & Corbo, L. (2011). Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. In *Endocrine Reviews* (Vol. 32, Issue 5, pp. 597–622). <https://doi.org/10.1210/er.2010-0016>
- Levin, E. R. (2015). Extranuclear Steroid Receptors Are Essential for Steroid Hormone Actions. *Annual Review of Medicine*, 66(1), 271–280. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050913-021703>
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Li, L., Xie, X., Qin, J., Jeha, G. S., Saha, P. K., Yan, J., Haueter, C. M., Chan, L., Tsai, S. Y., & Tsai, M.-J. (2009). The nuclear orphan receptor COUP-TFII plays an essential role in adipogenesis, glucose homeostasis, and energy metabolism. *Cell Metabolism*, 9(1), 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.12.002>
- Li, W., Hu, Y., Oh, S., Ma, Q., Merkurjev, D., Song, X., Zhou, X., Liu, Z., Tanasa, B., He, X., Chen,

- A. Y., Ohgi, K., Zhang, J., Liu, W., & Rosenfeld, M. G. (2015). Condensin I and II Complexes License Full Estrogen Receptor α -Dependent Enhancer Activation. *Molecular Cell*, 59(2), 188–202. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.002>
- Li, X., Large, M. J., Creighton, C. J., Lanz, R. B., Jeong, J.-W., Young, S. L., Lessey, B. A., Palomino, W. A., Tsai, S. Y., & Demayo, F. J. (2013). COUP-TFII regulates human endometrial stromal genes involved in inflammation. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 27(12), 2041–2054. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1191>
- Li, Y., Lambert, M. H., & Xu, H. E. (2003). Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics. *Structure (London, England: 1993)*, 11(7), 741–746. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(03\)00133-3](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(03)00133-3)
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>
- Lin, C. Y., Vega, V. B., Thomsen, J. S., Zhang, T., Say, L. K., Xie, M., Kuo, P. C., Lipovich, L., Barnett, D. H., Stossi, F., Yeo, A., George, J., Kuznetsov, V. A., Yew, K. L., Tze, H. C., Palanisamy, N., Miller, L. D., Cheung, E., Katzenellenbogen, B. S., ... Liu, E. T. (2007). Whole-genome cartography of estrogen receptor α binding sites. *PLoS Genetics*, 3(6), 0867–0885. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030087>
- Lin, F.-J., Chen, X., Qin, J., Hong, Y.-K., Tsai, M.-J., & Tsai, S. Y. (2010). Direct transcriptional regulation of neuropilin-2 by COUP-TFII modulates multiple steps in murine lymphatic vessel development. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(5), 1694–1707. <https://doi.org/10.1172/JCI40101>
- Lin, F.-J., Qin, J., Tang, K., Tsai, S. Y., & Tsai, M.-J. (2011). Coup d'Etat: an orphan takes control. *Endocrine Reviews*, 32(3), 404–421. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0021>
- Litchfield, L. M., Riggs, K. A., Hockenberry, A. M., Oliver, L. D., Barnhart, K. G., Cai, J., Pierce, W. M., Ivanova, M. M., Bates, P. J., Appana, S. N., Datta, S., Kulesza, P., McBryan, J., Young, L. S., & Klinge, C. M. (2012). Identification and characterization of nucleolin as a COUP-TFII coactivator of retinoic acid receptor β transcription in breast cancer cells. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038278>
- Little, T. H., Zhang, Y., Matulis, C. K., Weck, J., Zhang, Z., Ramachandran, A., Mayo, K. E., & Radhakrishnan, I. (2006). Sequence-specific deoxyribonucleic acid (DNA) recognition by steroidogenic factor 1: a helix at the carboxy terminus of the DNA binding domain is necessary for complex stability. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 20(4), 831–843. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0384>
- Liu, M. H., Li, J., Shen, P., Husna, B., Tai, E. S., & Yong, E. L. (2008). A Natural Polymorphism in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Hinge Region Attenuates Transcription due to Defective Release of Nuclear Receptor Corepressor from Chromatin. *Molecular Endocrinology*, 22(5), 1078–1092. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0547>
- Liu, T., Ortiz, J. A., Taing, L., Meyer, C. A., Lee, B., Zhang, Y., Shin, H., Wong, S. S., Ma, J., Lei, Y., Pape, U. J., Poidinger, M., Chen, Y., Yeung, K., Brown, M., Turpaz, Y., & Liu, X. S. (2011). Cistrome: An integrative platform for transcriptional regulation studies. *Genome Biology*, 12(8). <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-8-r83>
- Liu, Z., Merkurjev, D., Yang, F., Li, W., Oh, S., Friedman, M. J., Song, X., Zhang, F., Ma, Q., Ohgi, K. A., Krones, A., & Rosenfeld, M. G. (2014). Enhancer activation requires trans-recruitment of a mega transcription factor complex. *Cell*, 159(2), 358–373. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.027>

- Lonard, D. M., Lanz, R. B., & O'Malley, B. W. (2007). Nuclear receptor coregulators and human disease. In *Endocrine Reviews* (Vol. 28, Issue 5, pp. 575–587). <https://doi.org/10.1210/er.2007-0012>
- Lonard, D. M., & O'Malley, B. W. (2005). Expanding functional diversity of the coactivators. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 30, Issue 3, pp. 126–132). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.01.001>
- Lorenz, O. R., Freiburger, L., Rutz, D. A., Krause, M., Zierer, B. K., Alvira, S., Cuéllar, J., Valpuesta, J., Madl, T., Sattler, M., & Buchner, J. (2014). Modulation of the Hsp90 chaperone cycle by a stringent client protein. *Molecular Cell*, 53(6), 941–953. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.003>
- Manavathi, B., Samanthapudi, V. S. K., & Gajulapalli, V. N. R. (2014). Estrogen receptor coregulators and pioneer factors: The orchestrators of mammary gland cell fate and development. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 2, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00034>
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., & Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*, 83(6), 835–839. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90199-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90199-X)
- Marzec, P., Armenise, C., Pérot, G., Roumelioti, F.-M., Basyuk, E., Gagos, S., Chibon, F., & Déjardin, J. (2015). Nuclear-receptor-mediated telomere insertion leads to genome instability in ALT cancers. *Cell*, 160(5), 913–927. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.044>
- Massarweh, S., Osborne, C. K., Creighton, C. J., Qin, L., Tsimelzon, A., Huang, S., Weiss, H., Rimawi, M., & Schiff, R. (2008). Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. *Cancer Research*, 68(3), 826–833. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2707>
- McDonnell, D. P., & Wardell, S. E. (2010). The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of ER modulators: Implications for new drug discovery in breast cancer. In *Current Opinion in Pharmacology* (Vol. 10, Issue 6, pp. 620–628). <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.09.007>
- McKenna, N. J., Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., & O'Malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coactivators: Multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 69(1–6), 3–12. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(98\)00144-7](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(98)00144-7)
- McLean, C. Y., Bristor, D., Hiller, M., Clarke, S. L., Schaar, B. T., Lowe, C. B., Wenger, A. M., & Bejerano, G. (2010). GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nature Biotechnology*, 28(5), 495–501. <https://doi.org/10.1038/nbt.1630>
- Meijsing, S. H., Pufall, M. A., So, A. Y., Bates, D. L., Chen, L., & Yamamoto, K. R. (2009). DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science*, 324(5925), 407–410. <https://doi.org/10.1126/science.1164265>
- Meinke, G., & Sigler, P. B. (1999). DNA-binding mechanism of the monomeric orphan nuclear receptor NGFI-B. *Nature Structural Biology*, 6(5), 471–477. <https://doi.org/10.1038/8276>
- Menyhárt, O., Nagy, Á., & Gyórfy, B. (2018). Determining consistent prognostic biomarkers of overall survival and vascular invasion in hepatocellular carcinoma. *Royal Society Open Science*, 5(12). <https://doi.org/10.1098/rsos.181006>
- Métivier, R., Gay, F. A., Hübner, M. R., Flouriot, G., Salbert, G., Gannon, F., Kah, O., & Pakdel, F. (2002). Formation of an hER α -COUP-TFI complex enhances hER α AF-1 through Ser118

- phosphorylation by MAPK. *EMBO Journal*, 21(13), 3443–3453. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf344>
- Meyer, C. A., & Liu, X. S. (2014). Identifying and mitigating bias in next-generation sequencing methods for chromatin biology. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 15, Issue 11, pp. 709–721). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg3788>
- Mietus-Snyder, M., Sladek, F. M., Ginsburg, G. S., Kuo, C. F., Ladas, J. A., Darnell, J. E., & Karathanasis, S. K. (1992). Antagonism between apolipoprotein AI regulatory protein 1, Ear3/COUP-TF, and hepatocyte nuclear factor 4 modulates apolipoprotein CIII gene expression in liver and intestinal cells. *Molecular and Cellular Biology*, 12(4), 1708–1718. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.4.1708>
- Millard, C. J., Watson, P. J., Fairall, L., & Schwabe, J. W. R. (2013). An evolving understanding of nuclear receptor coregulator proteins. In *Journal of Molecular Endocrinology* (Vol. 51, Issue 3). <https://doi.org/10.1530/JME-13-0227>
- Miranda, T. B., Voss, T. C., Sung, M. H., Baek, S., John, S., Hawkins, M., Grøntved, L., Schiltz, R. L., & Hager, G. L. (2013). Reprogramming the chromatin landscape: Interplay of the estrogen and glucocorticoid receptors at the genomic level. *Cancer Research*, 73(16), 5130–5139. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0742>
- Mlodzik, M., Hiromi, Y., Weber, U., Goodman, C. S., & Rubin, G. M. (1990). The *Drosophila* seven-up gene, a member of the steroid receptor gene superfamily, controls photoreceptor cell fates. *Cell*, 60(2), 211–224. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90737-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90737-y)
- Mohammed, H., D'Santos, C., Serandour, A. A., Ali, H. R., Brown, G. D., Atkins, A., Rueda, O. M., Holmes, K. A., Theodorou, V., Robinson, J. L. L., Zwart, W., Saadi, A., Ross-Innes, C. S., Chin, S.-F., Menon, S., Stingl, J., Palmieri, C., Caldas, C., & Carroll, J. S. (2013). Endogenous purification reveals GREB1 as a key estrogen receptor regulatory factor. *Cell Reports*, 3(2), 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.01.010>
- Moré, E., Fellner, T., Doppelmayr, H., Hauser-Kronberger, C., Dandachi, N., Obrist, P., Sandhofer, F., & Paulweber, B. (2003). Activation of the MAP kinase pathway induces chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II (COUP-TFII) expression in human breast cancer cell lines. In *Journal of Endocrinology* (Vol. 176, Issue 1, pp. 83–94). <https://doi.org/10.1677/joe.0.1760083>
- Nagasaki, S., Suzuki, T., Miki, Y., Akahira, J., Shibata, H., Ishida, T., Ohuchi, N., & Sasano, H. (2009). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II in human breast carcinoma: possible regulator of lymphangiogenesis via vascular endothelial growth factor-C expression. *Cancer Science*, 100(4), 639–645. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.01078.x>
- Nagy, L., & Schwabe, J. W. R. (2004). Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 29, Issue 6, pp. 317–324). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.04.006>
- Nakshatri, H., Mendonca, M. S., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N. M., Goulet, R. J., & Cornetta, K. (2000). The orphan receptor COUP-TFII regulates G2/M progression of breast cancer cells by modulating the expression/activity of p21(WAF1/CIP1), cyclin D1, and cdk2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 270(3), 1144–1153. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2562>
- Nishizawa, H., Yamagata, K., Shimomura, I., Takahashi, M., Kuriyama, H., Kishida, K., Hotta, K., Nagaretani, H., Maeda, N., Matsuda, M., Kihara, S., Nakamura, T., Nishigori, H., Tomura, H., Moore, D. D., Takeda, J., Funahashi, T., & Matsuzawa, Y. (2002). Small heterodimer partner, an orphan nuclear receptor, augments peroxisome proliferator-activated receptor γ transactivation.

- O'Neill, L. P., VerMilyea, M. D., & Turner, B. M. (2006). Epigenetic characterization of the early embryo with a chromatin immunoprecipitation protocol applicable to small cell populations. *Nature Genetics*, 38(7), 835–841. <https://doi.org/10.1038/ng1820>
- Odom, D. T., Zizlsperger, H., Gordon, D. B., Bell, G. W., Rinaldi, N. J., Murray, H. L., Volkert, T. L., Schreiber, J., Rolfe, P. A., Gifford, D. K., Fraenkel, E., Bell, G. I., & Young, R. A. (2004). Control of Pancreas and Liver Gene Expression by HNF Transcription Factors. *Science*, 303(5662), 1378–1381. <https://doi.org/10.1126/science.1089769>
- Orlando, D. A., Chen, M. W., Brown, V. E., Solanki, S., Choi, Y. J., Olson, E. R., Fritz, C. C., Bradner, J. E., & Guenther, M. G. (2014). Quantitative ChIP-Seq normalization reveals global modulation of the epigenome. *Cell Reports*, 9(3), 1163–1170. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.018>
- Osz, J., McEwen, A. G., Poussin-Courmontagne, P., Moutier, E., Birck, C., Davidson, I., Moras, D., & Rochel, N. (2015). Structural basis of natural promoter recognition by the retinoid X nuclear receptor. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep08216>
- Osz, J., McEwen, A. G., Wolf, J., Poussin-Courmontagne, P., Peluso-Iltis, C., Chebaro, Y., Kieffer, B., & Rochel, N. (2019). Modulation of RXR-DNA complex assembly by DNA context. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 481, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.11.008>
- Otte, K., Kranz, H., Kober, I., Thompson, P., Hoefer, M., Haubold, B., Rimmel, B., Voss, H., Kaiser, C., Albers, M., Cheruvallath, Z., Jackson, D., Casari, G., Koegl, M., Paabo, S., Mous, J., Kremoser, C., & Deuschle, U. (2003). Identification of Farnesoid X Receptor as a Novel Mammalian Nuclear Receptor Sensing Lanosterol. *Molecular and Cellular Biology*, 23(3), 864–872. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.3.864-872.2003>
- Park, P. J. (2009). ChIP-seq: Advantages and challenges of a maturing technology. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 10, Issue 10, pp. 669–680). <https://doi.org/10.1038/nrg2641>
- Peach, S. E., Rudomin, E. L., Udeshi, N. D., Carr, S. A., & Jaffe, J. D. (2012). Quantitative assessment of chromatin immunoprecipitation grade antibodies directed against histone modifications reveals patterns of co-occurring marks on histone protein molecules. *Molecular and Cellular Proteomics*, 11(5), 128–137. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.015941>
- Pereira, F. A., Tsai, M. J., & Tsai, S. Y. (2000). COUP-TF orphan nuclear receptors in development and differentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 57(10), 1388–1398. <https://doi.org/10.1007/PL00000624>
- Pereira, F. A., Yuhong, Q., Zhou, G., Tsai, M. J., & Tsai, S. Y. (1999). The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. *Genes and Development*, 13(8), 1037–1049. <https://doi.org/10.1101/gad.13.8.1037>
- Picard, D., Kumar, V., Chambon, P., & Yamamoto, K. R. (1990). Signal transduction by steroid hormones: Nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. *Molecular Biology of the Cell*, 1(3), 291–299. <https://doi.org/10.1091/mbc.1.3.291>
- Polvani, S., Tarocchi, M., Tempesti, S., Mello, T., Ceni, E., Buccoliero, F., D'Amico, M., Boddi, V., Farsi, M., Nesi, S., Nesi, G., Milani, S., & Galli, A. (2014). COUP-TFII in pancreatic adenocarcinoma: Clinical implication for patient survival and tumor progression. *International Journal of Cancer*, 134(7), 1648–1658. <https://doi.org/10.1002/ijc.28502>
- Pourcet, B., Pineda-Torra, I., Derudas, B., Staels, B., & Glineur, C. (2010). SUMOylation of human peroxisome proliferator-activated receptor alpha inhibits its trans-activity through the recruitment of the nuclear corepressor NCoR. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(9), 5983–5992.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.078311>

- Prossnitz, E. R., & Hathaway, H. J. (2015). What have we learned about GPER function in physiology and disease from knockout mice? In *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 153, pp. 114–126). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.06.014>
- Qin, J., Chen, X., Xie, X., Tsai, M. J., & Tsai, S. Y. (2010). COUP-TFII regulates tumor growth and metastasis by modulating tumor angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3687–3692. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914619107>
- Qin, J., Chen, X., Yu-Lee, L. Y., Tsai, M. J., & Tsai, S. Y. (2010). Nuclear receptor COUP-TFII controls pancreatic islet tumor angiogenesis by regulating vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor-2 signaling. *Cancer Research*, 70(21), 8812–8821. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0551>
- Qin, J., Tsai, S. Y., & Tsai, M. J. (2014). The critical roles of COUP-TFII in tumor progression and metastasis. In *Cell and Bioscience* (Vol. 4, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-58>
- Qin, J., Wu, S. P., Creighton, C. J., Dai, F., Xie, X., Cheng, C. M., Frolov, A., Ayala, G., Lin, X., Feng, X. H., Ittmann, M. M., Tsai, S. J., Tsai, M. J., & Tsai, S. Y. (2013). COUP-TFII inhibits TGF- β -induced growth barrier to promote prostate tumorigenesis. *Nature*, 493(7431), 236–240. <https://doi.org/10.1038/nature11674>
- Qiu, Y., Cooney, A. J., Kuratani, S., DeMayo, F. J., Tsai, S. Y., & Tsai, M. J. (1994). Spatiotemporal expression patterns of chicken ovalbumin upstream promoter- transcription factors in the developing mouse central nervous system: Evidence for a role in segmental patterning of the diencephalon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10), 4451–4455. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4451>
- Qiu, Y., Tsai, S. Y., & Tsai, M. J. (1994). COUP-TF an orphan member of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 5, Issue 6, pp. 234–239). [https://doi.org/10.1016/1043-2760\(94\)P3081-H](https://doi.org/10.1016/1043-2760(94)P3081-H)
- Quinlan, A. R., & Hall, I. M. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26(6), 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- Rada-Iglesias, A., Bajpai, R., Prescott, S., Brugmann, S. A., Swigut, T., & Wysocka, J. (2012). Epigenomic annotation of enhancers predicts transcriptional regulators of human neural crest. *Cell Stem Cell*, 11(5), 633–648. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.07.006>
- Renaud, J. P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., & Moras, D. (1995). Crystal structure of the RAR- γ ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature*, 378(6558), 681–689. <https://doi.org/10.1038/378681a0>
- Riggs, K. A., Wickramasinghe, N. S., Cochrum, R. K., Watts, M. B., & Klinge, C. M. (2006). Decreased chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II expression in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Research*, 66(20), 10188–10198. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3937>
- Robinson-Rechavi, M., Garcia, H. E., & Laudet, V. (2003). The nuclear receptor superfamily. In *Journal of Cell Science* (Vol. 116, Issue 4, pp. 585–586). <https://doi.org/10.1242/jcs.00247>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Ross-Innes, C. S., Stark, R., Holmes, K. A., Schmidt, D., Spyrou, C., Russell, R., Massie, C. E.,

- Vowler, S. L., Eldridge, M., & Carroll, J. S. (2010). Cooperative interaction between retinoic acid receptor- α and estrogen receptor in breast cancer. *Genes and Development*, 24(2), 171–182. <https://doi.org/10.1101/gad.552910>
- Ross-Innes, C. S., Stark, R., Teschendorff, A. E., Holmes, K. A., Ali, H. R., Dunning, M. J., Brown, G. D., Gojis, O., Ellis, I. O., Green, A. R., Ali, S., Chin, S. F., Palmieri, C., Caldas, C., & Carroll, J. S. (2012). Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. *Nature*, 481(7381), 389–393. <https://doi.org/10.1038/nature10730>
- Sa-Nguanraksa, D., & O-Charoenrat, P. (2012). The role of vascular endothelial growth factor a polymorphisms in breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14845–14864. <https://doi.org/10.3390/ijms131114845>
- Sagami, I., Tsai, S. Y., Wang, H., Tsai, M. J., & O'Malley, B. W. (1986). Identification of two factors required for transcription of the ovalbumin gene. *Molecular and Cellular Biology*, 6(12), 4259–4267. <https://doi.org/10.1128/mcb.6.12.4259>
- Saha, T., Makar, S., Swetha, R., Gutti, G., & Singh, S. K. (2019). Estrogen signaling: An emanating therapeutic target for breast cancer treatment. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 177, pp. 116–143). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.023>
- Saldanha, A. J. (2004). Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics*, 20(17), 3246–3248. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth349>
- Schwabe, J. W., Chapman, L., Finch, J. T., Rhodes, D., & Neuhaus, D. (1993). DNA recognition by the oestrogen receptor: from solution to the crystal. *Structure*, 1(3), 187–204. [https://doi.org/10.1016/0969-2126\(93\)90020-H](https://doi.org/10.1016/0969-2126(93)90020-H)
- Schwabe, J. W., Chapman, L., & Rhodes, D. (1995). The oestrogen receptor recognizes an imperfectly palindromic response element through an alternative side-chain conformation. *Structure (London, England : 1993)*, 3(2), 201–213. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(01\)00150-2](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(01)00150-2)
- Schwabe, J. W., & Rhodes, D. (1991). Beyond zinc fingers: steroid hormone receptors have a novel structural motif for DNA recognition. *Trends in Biochemical Sciences*, 16(8), 291–296. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(91\)90121-b](https://doi.org/10.1016/0968-0004(91)90121-b)
- Seilcr-Tuyns, A., Walker, P., Martinez, E., Méritat, A. M., Givel, F., & Wahli, W. (1986). Identification of estrogen-responsive DNA sequences by transient expression experiments in a human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Research*, 14(22), 8755–8770. <https://doi.org/10.1093/nar/14.22.8755>
- Sentis, S., Le Romancer, M., Bianchin, C., Rostan, M. C., & Corbo, L. (2005). Sumoylation of the estrogen receptor β hinge region regulates its transcriptional activity. *Molecular Endocrinology*, 19(11), 2671–2684. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0042>
- Severson, T. M., Kim, Y., Joosten, S. E. P., Schuurman, K., Van Der Groep, P., Moelans, C. B., Ter Hoeve, N. D., Manson, Q. F., Martens, J. W., Van Deurzen, C. H. M., Barbe, E., Hedenfalk, I., Bult, P., Smit, V. T. H. B. M., Linn, S. C., Van Diest, P. J., Wessels, L., & Zwart, W. (2018). Characterizing steroid hormone receptor chromatin binding landscapes in male and female breast cancer. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02856-2>
- Shin, S.-W., Kwon, H.-C., Rho, M.-S., Choi, H.-J., Kwak, J.-Y., & Park, J.-I. (2009). Clinical significance of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II expression in human colorectal cancer. *Oncology Reports*, 21(1), 101–106. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19082449>
- Siersbæk, R., Baek, S., Rabiee, A., Nielsen, R., Traynor, S., Clark, N., Sandelin, A., Jensen, O. N., Sung, M. H., Hager, G. L., & Mandrup, S. (2014). Molecular architecture of transcription factor

- hotspots in early adipogenesis. *Cell Reports*, 7(5), 1434–1442. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.043>
- Siersbæk, R., Kumar, S., & Carroll, J. S. (2018). Signaling pathways and steroid receptors modulating estrogen receptor α function in breast cancer. In *Genes and Development* (Vol. 32, Issues 17–18, pp. 1141–1154). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/gad.316646.118>
- Siersbæk, R., Rabiee, A., Nielsen, R., Sidoli, S., Traynor, S., Loft, A., Poulsen, L. L. C., Rogowska-Wrzesinska, A., Jensen, O. N., & Mandrup, S. (2014). Transcription factor cooperativity in early adipogenic hotspots and super-enhancers. *Cell Reports*, 7(5), 1443–1455. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.042>
- Skafar, D. F., & Zhao, C. (2008). The multifunctional estrogen receptor- α F domain. *Endocrine*, 33(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12020-008-9054-1>
- Solomon, I. H., Hager, J. M., Safi, R., McDonnell, D. P., Redinbo, M. R., & Ortlund, E. A. (2005). Crystal structure of the human LRH-1 DBD-DNA complex reveals Ftz-F1 domain positioning is required for receptor activity. *Journal of Molecular Biology*, 354(5), 1091–1102. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.10.009>
- Stroup, D., & Chiang, J. Y. L. (2000). HNF4 and COUP-TFII interact to modulate transcription of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1). *Journal of Lipid Research*, 41(1), 1–11.
- Surjit, M., Ganti, K. P., Mukherji, A., Ye, T., Hua, G., Metzger, D., Li, M., & Chambon, P. (2011). Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell*, 145(2), 224–241. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.027>
- Szász, A. M., Lánczky, A., Nagy, Á., Förster, S., Hark, K., Green, J. E., Boussioutas, A., Busuttil, R., Szabó, A., & Gyorffy, B. (2016). Cross-validation of survival associated biomarkers in gastric cancer using transcriptomic data of 1,065 patients. *Oncotarget*, 7(31), 49322–49333. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10337>
- Takamoto, N., Kurihara, I., Lee, K., DeMayo, F. J., Tsai, M. J., & Tsai, S. Y. (2005). Haploinsufficiency of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II in female reproduction. *Molecular Endocrinology*, 19(9), 2299–2308. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0019>
- Tan, S. K., Lin, Z. H., Chang, C. W., Varang, V., Chng, K. R., Pan, Y. F., Yong, E. L., Sung, W. K., & Cheung, E. (2011). AP-2 γ regulates oestrogen receptor-mediated long-range chromatin interaction and gene transcription. *EMBO Journal*, 30(13), 2569–2581. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.151>
- Tata, J. R. (2002). Signalling through nuclear receptors. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 3, Issue 9, pp. 702–710). <https://doi.org/10.1038/nrm914>
- Theodorou, V., Stark, R., Menon, S., & Carroll, J. S. (2013). GATA3 acts upstream of FOXA1 in mediating ESR1 binding by shaping enhancer accessibility. *Genome Research*, 23(1), 12–22. <https://doi.org/10.1101/gr.139469.112>
- Tonsing-Carter, E., Hernandez, K. M., Kim, C. R., Harkless, R. V., Oh, A., Bowie, K. R., West-Szymanski, D. C., Betancourt-Ponce, M. A., Green, B. D., Lastra, R. R., Fleming, G. F., Chandarlapaty, S., & Conzen, S. D. (2019). Glucocorticoid receptor modulation decreases ER-positive breast cancer cell proliferation and suppresses wild-type and mutant ER chromatin association. *Breast Cancer Research : BCR*, 21(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1164-6>
- Tran, P., Zhang, X. K., Salbert, G., Hermann, T., Lehmann, J. M., & Pfahl, M. (1992). COUP orphan receptors are negative regulators of retinoic acid response pathways. *Molecular and Cellular*

- Biology*, 12(10), 4666–4676. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.10.4666>
- Trapnell, C., Pachter, L., & Salzberg, S. L. (2009). TopHat: Discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, 25(9), 1105–1111. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp120>
- Truong, T. H., & Lange, C. A. (2018). Deciphering Steroid Receptor Crosstalk in Hormone-Driven Cancers. *Endocrinology*, 159(12), 3897–3907. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00831>
- Tsai, M., & O'Malley, B. W. (1994). Molecular Mechanisms of Action of Steroid/Thyroid Receptor Superfamily Members. *Annual Review of Biochemistry*, 63(1), 451–486. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.002315>
- Umesono, K., & Evans, R. M. (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell*, 57(7), 1139–1146. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90051-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90051-2)
- Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J. M., Jeltsch, J. M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., & Waterfield, M. (1985). Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(23), 7889–7893. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.23.7889>
- Wang, C., Fu, M., Angeletti, R. H., Siconolfi-Baez, L., Reutens, A. T., Albanese, C., Lisanti, M. P., Katzenellenbogen, B. S., Kato, S., Hopp, T., Fuqua, S. A. W., Lopez, G. N., Kushner, P. J., & Pestell, R. G. (2001). Direct Acetylation of the Estrogen Receptor α Hinge Region by p300 Regulates Transactivation and Hormone Sensitivity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 18375–18383. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100800200>
- Wang, L. H., Ing, N. H., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W., & Tsai, M. J. (1991). The COUP-TFs compose a family of functionally related transcription factors. *Gene Expression*, 1(3), 207–216. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1820218>
- Wang, L. H., Tsai, S. Y., Cook, R. G., Beattie, W. G., Tsai, M. J., & O'Malley, B. W. (1989). COUP transcription factor is a member of the steroid receptor superfamily. *Nature*, 340(6229), 163–166. <https://doi.org/10.1038/340163a0>
- Ward, H. W. (1973). Anti-oestrogen therapy for breast cancer: a trial of tamoxifen at two dose levels. *British Medical Journal*, 1(5844), 13–14. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5844.13>
- Watson, L. C., Kuchenbecker, K. M., Schiller, B. J., Gross, J. D., Pufall, M. A., & Yamamoto, K. R. (2013). The glucocorticoid receptor dimer interface allosterically transmits sequence-specific DNA signals. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(7), 876–883. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2595>
- Weikum, E. R., Knuesel, M. T., Ortlund, E. A., & Yamamoto, K. R. (2017). Glucocorticoid receptor control of transcription: Precision and plasticity via allostery. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 18, Issue 3, pp. 159–174). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.152>
- Weikum, E. R., Tuntland, M. L., Murphy, M. N., & Ortlund, E. A. (2016). A Structural Investigation into Oct4 Regulation by Orphan Nuclear Receptors, Germ Cell Nuclear Factor (GCNF), and Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1). *Journal of Molecular Biology*, 428(24 Pt B), 4981–4992. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.10.025>
- Weiss, M. J., & Orkin, S. H. (1995). GATA transcription factors: Key regulators of hematopoiesis. In *Experimental Hematology* (Vol. 23, Issue 2, pp. 99–107).
- West, D. C., Pan, D., Tonsing-Carter, E. Y., Hernandez, K. M., Pierce, C. F., Styke, S. C., Bowie, K. R., Garcia, T. I., Kocherginsky, M., & Conzen, S. D. (2016). GR and ER Coactivation Alters the Expression of Differentiation Genes and Associates with Improved ER+ Breast Cancer Outcome.

- Molecular Cancer Research : MCR*, 14(8), 707–719. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0433>
- WHO. (2018). Global Health Estimates 2016: Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. *WHO*.
- Whyte, W. A., Orlando, D. A., Hnisz, D., Abraham, B. J., Lin, C. Y., Kagey, M. H., Rahl, P. B., Lee, T. I., & Young, R. A. (2013). Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell*, 153(2), 307–319. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.035>
- Wilson, T. E., Paulsen, R. E., Padgett, K. A., & Milbrandt, J. (1992). Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5053), 107–110. <https://doi.org/10.1126/science.1314418>
- Wu, W., Niles, E. G., Hirai, H., & LoVerde, P. T. (2007). Evolution of a novel subfamily of nuclear receptors with members that each contain two DNA binding domains. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-27>
- Wurtz, J. M., Bourguet, W., Renaud, J. P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., & Gronemeyer, H. (1996). A canonical structure for the ligandbinding domain of nuclear receptors. *Nature Structural Biology*, 3(1), 87–94. <https://doi.org/10.1038/nsb0196-87>
- Xu, M., Qin, J., Tsai, S. Y., & Tsai, M. J. (2015). The role of the orphan nuclear receptor COUP-TFII in tumorigenesis. In *Acta Pharmacologica Sinica* (Vol. 36, Issue 1, pp. 32–36). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.86>
- Xu, M., Qin, J., Wang, L., Lee, H. J., Kao, C. Y., Liu, D., Songyang, Z., Chen, J., Tsai, M. J., & Tsai, S. Y. (2019). Nuclear receptors regulate alternative lengthening of telomeres through a novel noncanonical FANCD2 pathway. *Science Advances*, 5(10). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax6366>
- Xu, Z., Yu, S., Hsu, C.-H., Eguchi, J., & Rosen, E. D. (2008). The orphan nuclear receptor chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II is a critical regulator of adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2421–2426. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707082105>
- Yan, J., Enge, M., Whittington, T., Dave, K., Liu, J., Sur, I., Schmierer, B., Jolma, A., Kivioja, T., Taipale, M., & Taipale, J. (2013). Transcription factor binding in human cells occurs in dense clusters formed around cohesin anchor sites. *Cell*, 154(4), 801–813. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.034>
- Yang, F., Ma, Q., Liu, Z., Li, W., Tan, Y., Jin, C., Ma, W., Hu, Y., Shen, J., Ohgi, K. A., Telese, F., Liu, W., & Rosenfeld, M. G. (2017). Glucocorticoid Receptor:MegaTrans Switching Mediates the Repression of an ER α -Regulated Transcriptional Program. *Molecular Cell*, 66(3), 321–331.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.03.019>
- Yi, P., Wang, Z., Feng, Q., Pintilie, G. D., Foulds, C. E., Lanz, R. B., Ludtke, S. J., Schmid, M. F., Chiu, W., & O'Malley, B. W. (2015). Structure of a biologically active estrogen receptor-coactivator complex on DNA. *Molecular Cell*, 57(6), 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.025>
- You, F. P., Wansa, K. D. S. A., Mei, H. L., Zhao, B., Shu, Z. H., Peck, Y. T., Kar, S. L., Bourque, G., Liu, E. T., & Cheung, E. (2008). Regulation of estrogen receptor-mediated long range transcription via evolutionarily conserved distal response elements. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47), 32977–32988. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802024200>
- You, L. R., Lin, F. J., Lee, C. T., DeMayo, F. J., Tsai, M. J., & Tsai, S. Y. (2005). Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity. *Nature*,

- Yun, S. H., Park, M. G., Kim, Y. M., Roh, M. S., & Park, J. I. (2017). Expression of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II and liver X receptor as prognostic indicators for human colorectal cancer. *Oncology Letters*, 14(4), 4011–4020. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6659>
- Zechel, C., Shen, X. Q., Chen, J. Y., Chen, Z. P., Chambon, P., & Gronemeyer, H. (1994). The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *The EMBO Journal*, 13(6), 1425–1433. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8137826>
- Zhang, C., Han, Y., Huang, H., Qu, L., & Shou, C. (2014). High NR2F2 transcript level is associated with increased survival and its expression inhibits TGF- β -dependent epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 147(2), 265–281. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3095-3>
- Zhang, D. X., & Glass, C. K. (2013). Towards an understanding of cell-specific functions of signal-dependent transcription factors. *Journal of Molecular Endocrinology*, 51(3), T37-50. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0216>
- Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C. A., Eeckhoute, J., Johnson, D. S., Bernstein, B. E., Nussbaum, C., Myers, R. M., Brown, M., Li, W., & Shirley, X. S. (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biology*, 9(9). <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137>
- Zhao, Q., Khorasanizadeh, S., Miyoshi, Y., Lazar, M. A., & Rastinejad, F. (1998). Structural elements of an orphan nuclear receptor-DNA complex. *Molecular Cell*, 1(6), 849–861. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80084-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80084-2)



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.***, Ozygin, L., Kadas, 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., Györfy, B., Perone, Y., Slaven, N., Barozzi, I., **Erdős, E.**, Saiakhova, A., Goddard, K., Vingiani, A., Shousha, S., Pongor, L. S., Hadjiminis, 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 tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.03.10.



Kulcsszavak/keywords

genomika, magreceptorok, emlődaganat, COUP-TFII, ER α , HNF4 α , GATA2, kromatin immunprecipitáció, ChIP szekvenálás, RNS szekvenálás, génexpresszió, sejt-típus specifikus génszabályozás, CTCF, MCF-7, T47D, HepG2, K562

genomics, nuclear receptors, breast cancer, COUP-TFII, ER α , HNF4 α , GATA2, chromatin immunoprecipitation, ChIP-Seq, RNA-Seq, gene expression, cell-type specific gene regulation, CTCF, MCF-7, T47D, HepG2, K562

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Bálint Bálint Lászlónak, aki B.Sc, M.Sc és PhD képzésem alatt értékes elméleti és gyakorlati tanácsokkal segített, és szakmai és egyéni fejlődésemet minden körülmények között támogatta.

Szeretném megköszönni a Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola korábbi és jelenlegi vezetőjének, Prof. Dr. Fésüs Lászlónak és Prof. Dr. Tózsér Józsefnek, hogy munkámat a doktori iskola keretein belül végezhettem.

Külön köszönetem szeretném kifejezni közeli munkatársaimnak Bojcsuk Dórának, Ozgyin Lillának, Boros-Oláh Beátának, Noura Farajnak és Csumita Máriának, akik nemcsak szakmai segítséget nyújtottak, hanem barátként is támogattak a mindennapokban.

Szeretném köszönetem kifejezni a Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium jelenlegi és korábbi munkatársainak: Dr. Horváth Attilának, Dr. Póliska Szilárdnak, Dr. Széles Lajosnak, Kerekes Tamásnak, Pallér Ádámnak, Mátyás Erzsébetnek, Balogh Máriának és Nagy Évának, akik rengeteg hasznos tanáccsal láttak el a tanulmányaim során. Továbbá köszönöm társszerzőimnek, akik értékes munkájukkal hozzájárultak a közlemények létrejöttéhez.

Hálával tartozom Dr. Luca Magnani-nek (Imperial College, London) és munkacsoportjának, akitől lehetőséget kaptam Campus Mundi ösztöndíjasként külföldi szakmai tapasztalatszerzésre, és lehetővé tették, hogy egy értékes publikáció részese lehettem.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom páromnak, szüleimnek, testvéreimnek és barátaimnak, akik mindvégig mellettem álltak és támogattak céljaim elérésében.

Függelék

A függelék az értékezés alapjául szolgáló eredeti közleményeket tartalmazza.