

# Transzkripció és genom-szintű epigenetikai változások környezeti stresszhatásokra

Doktori tézisek

**Vető Borbála**

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Arányi Tamás, Ph.D., tudományos  
főmunkatárs
- Hivatalos bírálók: Dr. Nemoda Zsófia, Ph.D., adjunktus  
Dr. Varga Máté, Ph.D., adjunktus
- Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Réthelyi M. János, Ph.D., habilitált  
egyetemi docens
- Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Takács Krisztina, Ph.D., egyetemi  
docens  
Dr. Patócs Attila, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2018

## BEVEZETÉS

Az eukarióta génexpressziót a transzkripció szabályozza. Ezt a lépést specifikus génszabályozó régiókhoz kötő fehérjék irányítják, melyek az RNS polimeráz aktivitását módosítják. A génexpresszió szigorú szabályozását ezek összetett és bonyolult hálózata végzi. Az emlős génexpressziót specifikus szekvenciák szabályozzák: promóterek és enhancerek, melyek a transzkripciós starthelyhez közel vagy távol esnek, ebben a sorrendben. Az utóbbi a TATA boxtól upstream eső, specifikus, konzervált konszenzus szekvenciákat tartalmaz, mint például a CCAAT szekvencia, mely a C/EBP-t köti. Transzkripciós faktorok (TF-ok) sokasága tud kötni a cis promóterekhez és enhancerekhez, melyek kölcsönhatnak az RNS polimerázzal és a transzkripciós apparatus fehérjéivel DNS hurok által. A TF-ok alapfunkciója a DNS kötése. Ez a DNS-kötő domén (DBD) által történik. Továbbá, a TF-okat a DBD-juk szerint lehet csoportosítani.

Az egyik fő, evolúciósan nagyon konzervált TF család tagjait különféle homeobox gének kódolnak. A Hox gének alapvető szerepet játszanak a fő testrészek kialakításában a korai embionális fejlődés során. A PRD osztály a második legnagyobb a homeobox génosztályok közül, melynek neve a *Drosophila* Paired (Prd) génből ered. A PRD osztály homeodomain-t tartalmazó „új” csoportjának tagjai - Argfx, Dprx, Leutx és Tprx - a Crx génből tandem duplikációval alakultak ki számos méhlepényes emlősben. Továbbá, néhány gén áthelyeződött a kromoszóma mentén (Dprx és Leutx) vagy más kromoszómára (Argfx) aszimmetrikus evolúció során. Azt azonban még nem mutatták ki, hogy ezek a fehérjék valóban TF, melyek a sejtmagban lokalizálódnak és még nem ruházták fel őket szabályozó szereppel totipotens embionális sejtekben.

A nukleáris hormonreceptorok (NR) szupercsalád tagjai ligandkötésre válaszolva szabályozzák a transzkripciót. A ligandok lehetnek hormonok (szteroid, pajzsmirigy hormonok), D vitamin, reténsav, zsírsavak és foszfolipidek. A NR-oknak ligandkötő és DNS-kötő doménje van. A NR-ok fontos szerepet játszanak a környezeti hatásokra adott válaszban, így irányítják a fejlődést, a homeosztázist és az anyagcserét is. A HNF4 $\alpha$  TF szükséges a májfejlődéshez és a májsejt-differenciációhoz. A HNF4 $\alpha$  kölcsönhatását más TF-okkal, koaktivátorokkal és korepresszorokkal feltárták. Poszttranszlációs módosítások tömegspektrometriával történő vizsgálatai kimutatták,

hogy a HNF4 $\alpha$  fehérje több helyen foszforilálható HepG2 hepatocelluláris karcinóma sejtekben. A HNF4 $\alpha$  fehérjét több kináz is tudja foszforilálni meghatározott helyeken.

A TF-ok alapvetően befolyásolják a génexpressziót. Azonban, a DNS szerkezete (pl. DNA hurkok) és a sejtek DNS-t körülvevő genomi környezete és kromatinszerkezete szintén alapvető fontosságúak. A génexpresszió tehát 2 szorosan összefüggő szinten szabályozódik: transzkripciós és epigenetikai. Az epigenetika az a tudományág, mely a sejtmagban lévő örökletes információt vizsgálja, mely azonban nincs a genomban kódolva. A kovalens epigenetikai módosítások (hisztionmódosítások, DNS metiláció) a kromatinszerkezet és transzkripció módosítására is hatnak. A DNS metiláció a citozinok módosítását jelenti egy metilcsoport hozzáadásával. Egy szabályozó régióban történő metiláció géncsendesítést von maga után. A DNS metiláció visszafordítható, ezért a metilációs mintázatok létrehozhatók *de novo* és módosíthatók genom-szinten vagy specifikus lokuszokon is változó környezeti hatásokra. A DNS metilációját a DNMT enzimek végzik. Számos rákellenes gyógyszert fejlesztettek ki, HDAC gátlókat és DNMT gátlókat, mint például a Decitabine.

Az 5-hidroximetil-citozin (5hmC) egy olyan epigenetikai módosítás, melyet a TET enzimek hoznak létre, szerepet játszva a demetilációban. Kimutatták, hogy az 5hmC-nak nincs nyilvánvaló gátló hatása a transzkripcióra. A globális 5hmC-szintek pontosan megmérhetők a megbízható és egyszerű LC-MS/MS módszerrel. A TET enzimek 2-oxoglutarát, oxigén- és vasfüggő demetilázok, így az  $\alpha$ -ketoglutarátnak, a citromsavciklus egyik főszereplőjének epigenetikus hatása van a genom aktivitásra, így az egészségre és betegségre is hatással van. A kromatinmódosítások aktivitását az intermedier anyagcseréből származó fő metabolitok és kofaktorok befolyásolják, mint például az acetil-koenzimA, NAD<sup>+</sup>, S-adenozilhomocisztein (SAM) és  $\alpha$ -ketoglutarát ( $\alpha$ -KG).

A környezeti kihívásokra dinamikusan változó kromatinmódosítások *in vivo* vizsgálata egyre gyakoribb. A terhesség alatti anyai étrendnek (pl. folsav vagy más metildonorok) hatása van az utódok DNS metilációjára és metabolizmusára. Az epigenetika jelenti a kapcsolatot a korai táplálkozás és a későbbi egészség között. A fenti példákból látszik, hogy a táplálkozásbeli kihívások gyakran együtt járnak a kovalens kromatinmódosításokban történő zavarokkal. Az anyagcseréhez kapcsolódó TF-ok és enzimek jól tanulmányozottak rövidtávú éhezés esetében. Az éhezés beindítja a

glükoneogenezist (a PEPCK aktivitásán keresztül), a glükogenzist, a  $\beta$ -oxidációt és a ketogenezist. Az újraetetés azonnal leállítja a májban a ketogenezist. A hasnyálmirigy hormonjai szabályozzák a máj metabolikus stresszre adott válaszát. Az insulin/glukagon arány lecsökken az éhezés hatására, míg ez újraetetés hatására visszaáll.

A glükóz a legtöbb emlős szövet számára esszenciális energiát biztosító forrása. Éhezés hatására a glükoneogenezis és a glükogenezis aktiválódik a glükóz-szintek fenntartása érdekében termelés és felszabadítás által. Az éhezéshez kapcsolódó TF családokat leírták, melyek a következők: nukleáris receptorok (pl. HNF4 $\alpha$ , GR, PPAR $\alpha$ , RXR), CREB1, FoxOs és CEBP $\alpha$ ,  $\beta$ . A glükoneogenezis alapvető koaktivátorai a CBP/p300 és a PGC-1 $\alpha$ . A glükóz homeosztázis fenntartása éhezés és etetés (vagy hormon) hatására szigorúan szabályozott már transzkripciós szinten is, például a HNF4 $\alpha$  aktivitásán keresztül. PGC-1 $\alpha$  kölcsönhat a HNF4 $\alpha$ -val a PEPCK promóter egy adott szakaszán. Újraetetés hatására, az insulin elnyomja a hasnyálmirigy glukagon-szekrécióját és annak aktivitását a májban. Összességében, a glükoneogenezis, a glükogenezis és a zsírsav-oxidáció gátlás alá kerül, míg a glükóz lebontása, a citromsavciklus, a zsírsav- és triglicerid-szintézis útvonalai aktiválódnak. A DNS metilációs változások, a szerepük és hatásmechanizmusuk az éhezés-újraetetés hatására még nem ismert részletesen.

## CÉLKITŰZÉSEK

A PhD kutatásom során az alábbi kérdések megválaszolását tűztem ki célul:

- I. Mi a sejten belüli lokalizációja és a humán embrionális fejlődésben betöltött szerepe a PRD-osztályba tartozó humán fehérjéknek (Argfx, Dprx, Leutx és Tprx)?
- II. Foszforilálja-e az ERK1 a HNF4 $\alpha$ -t? Ha igen, mi az eredménye az ERK1/2 által foszforilált HNF4 $\alpha$ -nak a target gének transzkripcióját és target DNS-kötését tekintve?

- III. Milyen a makroszkopikus, fehérjeszintű és metilációs változások történnek rövidtávú éhezés és újraetetés hatására *in vivo*?
- IV. Hogyan hat a DNS metiláció gátlása és aszkorbinsavas kezelés a genomi 5mC és 5hmC szintekre sejtvonalakban?

## MÓDSZEREK

### *Sejtkultúra*

Az A375 melanóma, A2058 melanóma, HepG2 hepatokarcinóma, HeLa méhnyak carcinóma, MES-SA méh szarkóma, H1650 bronchoalveoláris karcinóma and HTR8 placenta sejtvonalak az ATCC-től származnak és DMEM, Advanced MEM vagy RPMI-1640 médiumban tenyésztetem őket, amit 10% FBS-sel, 1% glutaminnal és 1% penicillin/streptomicinnel egészítettem ki. A DT40 sejteket RPMI-1640 médiumban tenyésztetem, amit 7% FBS-sel, 3% csirkeszérummal, 50  $\mu$ M  $\beta$ -merkaptotetanollal és penicillin/streptomicinnel egészítettem ki.

### *Kezelések*

A kezelések egy része szérummentes médiumban végeztem 30 percig humán rekombináns EGF-fel 100 ng/ml-es végkoncentrációban.

A kezelések másik része 48 óráig végeztem 5-aza-2'-deoxycytidinnel vagy DMSO-val 1  $\mu$ g/ml végkoncentrációban 48 óráig.

### *Transzfekció és luciferáz esszé*

A PcDNA5-FRT/TO expressziós vektort - mely a vad típusú, teljes humán HNF4 $\alpha$ -t tartalmazza - az Addgene-től vásároltuk. A mutációkat szerin vagy treonin foszforilációs helyekre terveztem, hogy foszfomimetikus (glutamát vagy aszpartát) vagy semleges (alanin) mutánsokat kapjak. Helyspecifikus mutációt végeztem, a génszintézist a GenScript végezte. Hármass transzfekciót végeztem HeLa sejtekben phACCC6(-332/+72)Luc konstrukcióval – mely az *ABCC6* promóter fragmensét tartalmazza (-332/+72) pGL3-Basic vektorban -, HNF4 $\alpha$  mutánsokat kódoló pcDNA5-

FRT/TO plazmival és pRL-TK Renilla luciferáz Kontroll Riporter Vektorral. A luciferáz esszét a DualGlo Luciferáz rendszerrel végeztem, a szövettenyésztő lemezeket luminométerrel olvastam le. Az eredményeket először a háttérre normalizáltam, majd a transzfekciós hatékonyságra, melyet a kotranszfektált Renilla kontroll riporter vector nyújtotta.

#### *ChIP (Kromatin immunprecipitáció)*

1%-os formaldehidet adtam a HepG2 sejtek médiumához. 10 perc szobahőn történő inkubálás után a fixálást 125 mM-os jéghideg glicinnel állítottam le, majd háromszor mostam jéghideg PBS-sel. A sejteket felszedtem, majd lizáltam őket. A szonikálást 6 pulzusban 15 másodpercig ON és 30 másodpercig OFF üzemmódban végeztem, hogy 500 bp-os fragmenseket kapjak. Az immunprecipitációt Dynabeads A és G gyöngyökkel, valamint 2 µg anti-HNF4α egér monoklonális or H3K27ac antitesttel végeztem. A gyöngyöket megmostam, majd a mintákat eluáltam. A keresztkötéseket 65°C-on végeztem éjszakán át. A mintákat ezután RN-ázzal és proteináz K-val kezeltem. A DNS-t a High pure PCR template preparation kittel tisztítottam.

#### *ChIP-qPCR*

A primereket a BiSearch programmal terveztem. A qPCR-t SYBR Green mix-szel végeztem. A lemezeket LightCycler 480 real-time PCR gépen futtattam. A standard görbékét különböző hígítású DNS mintákból csináltam, és a relatív koncentrációjukat a hígítási sorokból számoltam ki. Egy adott DNS fragmens dúsulását úgy számoltam ki, hogy a relatív koncentrációt az input koncentrációjához hasonlítottam.

#### *RRBS módszer*

A genomi DNS-t a DNeasy Blood&Tissue kittel (Qiagen) vontam ki a friss egérmájából. Az RRBS kitet és protokolt a Diagenode tervezte. 100 ng duplaszálú DNS-et emésztettem meg MspI enzimmel. Metilált és nem metilált kontrollokat adtam a minákhoz. Ezt követte az adapter ligálás és a méretszelekció AMPure XP gyöngyök segítségével. A fragmensméret 200-1200 bp közé esik. A minták koncentrációját kvantitatív PCR-rel határoztam meg, mely lehetővé tette, hogy egyesítsem őket úgy, hogy egymáshoz hasonlítom a relatív koncentrációikat. Az amplifikációt MethylTaq

Plus polimerázzal végeztem. A könyvtárakat Illumina HiSeq2000-es platformon 50 bp-os single end readekkel szekvenáltuk, hogy pool-onként 120M readet kapjunk.

### *RT-PCR*

Az RNS-t a miRNeasy Micro kittel (Qiagen) izoláltam a friss egérmájából. A reverz transzkripciót 1 µg RNS-ből írtam át (RevertAid, ThermoFisher). Publikált primer szekvenciákat használtam az expressziós analízisre. A qPCR-t SYBR green mix-szel BioRad CFX96 PCR gépen futtattam. A standard görbékkel különböző hígítású cDNS mintákból csináltam, és a relatív koncentrációjukat a hígítási sorokból számoltam ki. Egy adott cDNS fragmens dúsulását úgy számoltam ki, hogy a relatív koncentrációt a housekeeping 18S RNS koncentrációjához hasonlítottam.

## **EREDMÉNYEK**

- I. Mi a sejten belüli lokalizációja és a humán embrionális fejlődésben betöltött szerepe a PRD-osztályba tartozó humán fehérjéknek (Argfx, Dprx, Leutx és Tprx)?*

Kimutattam, hogy a homeodomaint tartalmazó Argfx, Dprx, Leutx és Tprx fehérjék főként a sejtmagban lokalizálódnak HeLa sejtekben. Majd a V5-taget tartalmazó konstrukciókat primer human fibroblasztokba transzfektáltuk. Konfokális mikroszkópiával kimutattuk, hogy a kérdéses fehérjék szintén a sejtmagban helyezkednek el. A túlnyomóan sejtmagi lokalizáció TF-ok jellemzője. RNS szekvenálással számos szignifikánsan up- és downregulált géneket találtunk. Ezek a gének az oocita és a blasztocita állapotok között fejeződnek ki a human embrionális fejlődés során. Argfx, Leutx és Tprx1 éles átmenetet mutatott az alacsony vagy nulla expressziótól 4-sejtes állapotban magas expresszióig 8-sejtes és morula állapotban, majd ez élesen lecsökkent a blasztocista állapot előtt. Ez világosan mutatja, hogy ezek a gének éles ki-bekapcsolású kifejeződési mintázatot mutatnak, és közvetlenül a sejsors meghatározás előtt expresszálódnak.

**II.** Foszforilálja-e az ERK1 a HNF4 $\alpha$ -t? Ha igen, mi az eredménye az ERK1/2 által foszforilált HNF4 $\alpha$ -nak a target gének transzkripcióját és target DNS-kötését tekintve?

*In vitro* foszforiláció esszéivel kimutattuk, hogy az ERK1 kináz tudja foszforilálni a humán rekombináns HNF4 $\alpha$  fehérjét. Meg akartuk határozni a foszforilált szerin/treonin helyeket, ezért tömegspektrometriás merest alkalmaztunk. Számos aminosav foszforilációs helyet találtunk. Az ERK1/2 képes foszforilálni a HNF4 $\alpha$ -t korábban leírt helyeken (S138/T139, S142/S143, S147/S148, S151, T166/S167, S313) és új, általunk azonosított helyeken is (S95, S262/S265, S451, T457/T459). Továbbá, az ERK1 ugyanazokat a helyeket célozza meg, mint más kinázok, pl. PKA, p38 és AMPK. Ezután kíváncsiak voltunk, hogy melyik foszforilációs hely van hatással a célgén transzkripcióra. Mutációkat terveztem szerin vagy treonin foszforilációs helyekre foszfomimetikus (glutamát vagy aszpartát) vagy neutrális (alanine) mutánsokat képezve: S87D, T166A/S167D, S313D, S451E, T457A/T459E és S451E/T457A/T459E tripla mutáns. Luciferáz esszéiben kimutattam, hogy a vad típusú HNF4 $\alpha$  hasonló aktivitást mutat a T166A/S167D, S451E, T457A/T459E és S451E/T457A/T459E mutánsokkal. Ezzel szemben, a S87D (pozitív kontroll) és a S131D is szignifikáns hatással voltak az *ABCC6* promóter aktivitására: gátolták annak aktivitását. Összegezve, az ERK1 és az AMPK is targetálják az S313-as foszforilációs helyet, melynek gátló hatása van a célgén transzkripciójára. Ahhoz, hogy megtaláljuk az aktív HNF4 $\alpha$  kötőhelyeket a genomban és kiválasszunk target lókuszokat az ERK1 hatásának vizsgálatához, ChIP-et és újgenerációs szekvenálást végeztünk. Az átfedés a HNF4 $\alpha$  és a H3K27ac által kötött helyek között jelentős volt, mely azt sugallja, hogy a HNF4 $\alpha$  által kötött helyek nagy része aktív szabályozó régió. Számos HNF4 $\alpha$  TF kötőhely olyan gének közelében található, melyek a PPAR és inzulin szignalizációban és a zsírsavanyagcserében játszanak szerepet. Azért, hogy azonosítsam az ERK aktiváció TF kötésre gyakorolt hatását, megvizsgáltam az ERK1/2 által indukált HNF4 $\alpha$ -kötést számos kiválasztott target genomi régióhoz HepG2 sejtekben. Összességében, az ERK1/2 foszforilálja a HNF4 $\alpha$ -t, mely lecsökkent HNF4 $\alpha$  DNS-kötő képességet eredményez.



### *III. Milyen a makroszkopikus, fehérjeszintű és metilációs változások történnek rövidtávú éhezés és újraetetés hatására in vivo?*

8 órás éhezés hatására nem, de 16 és 24 órás éhezés hatására lecsökkent az egerek testtömege a kontroll csoportjukhoz képest. A 8 órás újraetetés nem tudta visszaállítani az eredeti testtömeget. Elmondható, hogy az éhezés és az újraetetés drasztikus hatással van az egerek testsúlyára. Továbbá, éhezés (8, 16 és 24 óráig) hatására az egerek vércukorszintje is lecsökkent. A 8 órás újraetetés visszaállította az eredeti vércukorszintet. Kíváncsiak voltunk, hogy egyes fehérjék, melyek fontos szerepet játszanak a máj környezeti stressz - pl. rövidtávú éhezés - hatására történő metabolikus adaptációjában. Az éhezés ismert módon felborítja a glükóz homeosztázist, és a HNF4 $\alpha$  fehérjének jelentős szerepe van a glükóz anyagcsere szabályozásában. A HNF4 $\alpha$  fehérje szintje nem változott akut metabolikus stressz (éhezés) hatására. Továbbá, a PCK1 enzim fontos szereppel bír a glükoneogenezis során. Mint a PCK1, mint a CEBP $\alpha$  fehérjeszintek megemelkedtek éhezés hatására. Megvizsgáltuk a metilációs változásokat, melyek 16 óra során valamint a 16 óra éhezést követő 8 órás újraetetés során jelentkeztek, azért, hogy megtudjuk, milyen hatással van a rövidtávú táplálkozásbeli kihívás a globális és hely/régióspecifikus metilációs szintekre. Összességében nem volt szignifikáns különbség az egyes állatcsoportok átlagos metilációját tekintve, de a legfontosabb metilációs változásokat akart megtalálni. A 16 órás éhezés globális hipometilációt, míg a 16 órás éhezést követő 8 órás újraetetés globális hipermetilációt okozott. A hipermetiláció főként CpG szigeteken és partokon kívül történt, míg a hipometiláció nagyban érintette a CpG partokat. A hipometiláció eloszlását tekintve a DNS metilációs változások jobban jelentek voltak a promóterekben, mint a többi régióban külön-külön. Továbbá, a disztális promótereken belüli intergenikus régiók is fontos célpontjai voltak a DNS metilációs változásoknak. Ezután kíváncsiak voltunk, hogy melyik gének azok, melyekben egy konkrét CpG változott az egyik irányban éhezés hatására, majd ugyanez a CpG az ellenkező irányba változott újraetetés hatására. A metilációs változások olyan anyagcsere-útvonalakat foglaltak magukba, mint koleszterin, zsírsav, foszfolipid, aminosav és szénhidrát (glükoneogénikus és glikogén metabolikus) anyagcserefolyamatok. A DMR analízissel további számos anyagcsereben szerepet játszó gént találtunk, melyek promóterében

metilációs változás történik. RT-PCR-t is végeztem néhány metabolikus gén mRNS expressziójának vizsgálatára, melyek szignifikáns metilációs változáson mennek. Ezután megnéztük, hogy az RRBS módszerrel detektált metilációs változások CpG-specifikusak és CpG-gazdag régiókban dúsulnak-e, vagy bármely genomi C-re jellemzők. Tömegspektrometriás méréssel kimutattuk, hogy az akut metabolikus stressz nem okoz mennyiségi változást a genomi 5mC és 5hmC szintekben, amikor a teljes genom összes citozinját vizsgáljuk.

#### *IV. Hogyan hat a DNS metiláció gátlása és aszkorbinsavas kezelés a genomi 5mC és 5hmC szintekre sejtvonalakban?*

Kifejlesztettünk egy újfajta tömegspektrometriás (LC-MS/MS) módszert, mellyel a genomi 5mC és 5hmC szintet tudjuk pontosan megmérni és megkülönböztetni. Megvizsgáltuk a genomi 5mC és 5hmC szinteket különböző sejt- és szövettípusokban. Az 5mC szintek elég stabilnak bizonyultak a különböző szövetekben, de az 5hmC szintek változatosak voltak. Nagyon magas 5mC/C arányokat mértünk az egér előagyban. A sejtvonalak alacsonyabb 5mC szinttel rendelkeznek. A legalacsonyabb és a legmagasabb mért 5mC szint között háromszoros különbség volt. A legalacsonyabb és legmagasabb mért 5hmC szintek között azonban százszoros különbség volt. Az egér előagyban találtuk a legmagasabb 5hmC szintet. Az egér mája és a primer hepatociták hasonló 5hmC szinttel rendelkeznek. A sejtvonalak alacsony 5hmC szinttel rendelkeznek. Összességében, az újonnan fejlesztett MS technika elég egyszerű és érzékeny ahhoz, hogy még alacsony 5hmC szintet is kimérjen. 5azadC, vagy decitabin a DNS metilációt gátolja. Nemrégiben kimutatták, hogy az 5azadC kezelés HL60 humán promieloblaszt sejtekben paradox módon megemeli az 5hmC szintet. Mi célul tűztük ki más sejtvonalak vizsgálatát is. Érdekes módon az 5azadC hatása az 5hmC szintekre csak hematopoetikus sejtekre volt jellemző. Az aszkorbinsav a DNS metiláció szabályozásához szükséges kofaktor, mely a TET dioxigenázok teljes katalitikus aktivitásához szükséges. Az 5hmC szint megemelkedett HeLa sejtekben is, de csak aszkorbinsavas együttes kezelés hatására. Az 5hmC szint szignifikánsan megemelkedett decitabin és aszkorbinsav együttes kezelésekor HL60 sejtekben. Az eredményeink azt sugallják, hogy néhány sejtben hiányoznak a funkcionálisan teljesen aktív Tet enzimek

és lehetséges, hogy aszkorbát-hiányosak is, ezért a decitabin kezelés nincs hatással az 5hmC szintjeikre.

## KÖVETKEZTETÉSEK

A PhD disszertációmban bemutattam négy kutatási területet, melyben az epigenetika fontos szerepet játszik. Azt a tényt vettem alapul, hogy a transzkripció és az epigenetika szoros kapcsolatban állnak. Továbbá, a környezeti hatások is befolyásolják a transzkripció és/vagy epigenetikai állapotát a sejteknek, szöveteknek és szervezeteknek.

Először azt láthattuk, hogy a homeodomain tartalmozó gének *Argfx*, *Dprx*, *Leutx* és *Tprx* transzkripció faktorokat kódolnak, melyeknek alapvető szerepe van az állati fejlődésben. Ezen szerepük a nagyon konzervált homeodomain tartalmú DNS szekvenciájukból ered. Kimutattam, hogy ezen fehérjék a sejtmagban helyezkednek el. A kísérleteink kimutatták, hogy ezek a TF-ok felelősek, hogy a sejteket a totipotenciából a sejtors-döntésekhez vezessék. Sőt, egy downstream effektort is azonosítottunk, ami a *HIST1H2BD* hiszton H2-es variáns. Így elmondható, hogy a fejlődésbeli változások együtt járnak transzkripció és epigenetikai változásokkal is. Valóban, ez a két folyamat egymástól függ, melyben nagy valószínűséggel az epigenetikai jelek szabályozzák a génexpressziót.

Másodsorban megvizsgáltuk a - hepatocita differenciációban és a májfejlődésben fontos - *HNF4α* transzkripció szerepét és az epigenetikai szerepét fiziológias körülmények között és extracelluláris hatásokra. Feltártuk, hogy az ERK1 képes foszforilálni a *HNF4α*-t. Továbbá kimutattam, hogy az ERK aktiváció a TF csökkent DNS-kötő kapacitásához vezet hepatikus célgénekben HepG2 sejtekben vizsgálva. CHIP-Seq kísérleteinkben 8748 TF *HNF4α* kötőhelyet találtunk. Megtaláltunk aktívan átírt *HNF4α* által szabályozott géneket; ezek a H3K27ac epigenetikai módosítás is jelöli. A *HNF4α* és H3K27ac által kötött lókuszok száma között jelentős átfedést találtunk, mely arra enged következtetni, hogy a *HNF4α* TF kötőhelyek nagy része aktívan szabályozó régió. Az általam CHIP-qPCR-rel vizsgált *HNF4α* célrégiók - melyekhez kiterjedt H3K27ac jel is tartozik - csökkent *HNF4α*-kötést mutatnak. Ebből következik, hogy az

ERK aktiváció nemcsak a TF kötését változtatja meg, hanem a változások valószínűleg epigenetikai folyamatokkal is együtt járnak.

Harmadsorban kíváncsiak voltunk, hogy a táplálkozásbeli stresszhatások (rövidtávú éhezés és újraetetés) befolyásolja-e a májsejtek DNS-ének metilációs állapotát *in vivo*. Óriási metilációs változásokat figyeltünk meg. Az éhezés globális CpG-hipometilációhoz, míg az újraetetés globális CpG-hipermetilációhoz vezetett. Ezek a változások számos anyagcsereútvonalat érintettek, például a koleszterin, zsírsav, foszfolipid, aminosav és szénhidrát (glükoneogénikus és glikogén metabolikus) anyagcserefolyamatok. A CpG metiláció befolyásolja a génexpressziót. Megvizsgáltuk ezeket a metilációs változásokat többféle módszerrel, és összekötöttük őket a testtömeg, vércukorszint, fehérje- és mRNS expresszió változásaival. Úgy tűnik, hogy a gyors és hatalmas DNS metilációs változások a visszafordíthatóság és a környezeti feltételekre való érzékenység miatt tudnak megtörténni.

Végül, de nem utolsósorban azt láttuk, hogy annak ellenére, hogy a metilációs változások részben CpG szigetekben történnek, az össz genomi citozin metilációja nem változik meg környezeti stresszhatásra. Úgy látszik, hogy az egér genomja védett az olyan óriási metilációs változásoktól, melyek túl drasztikusak lennének. Azonban a transzkripció és a génexpresszió hajlamos megváltozni részben epigenetikai folyamatok hatására. Az össz genomi 5mC és 5hmC mérésekhez felállítottunk egy új tömegspektrometriás módszert. Kimutattuk több kísérletben, hogy a DNS metiláció gátlása 5hmC szint növekedést okoz hematopoetikus sejtekben. Továbbá, az aszkorbát - a TeT enzimek kofaktora - kezelés erősíti az 5hmC keletkezést hematopoetikus sejtekben.

Összefoglalva, mind a négy epigenetikai vizsgálat sorozat egyértelmű epigenetikai vonatkozásokkal rendelkezik és felvet számos további kérdést, melyet érdemes lenne vizsgálni.

## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### Disszertáció alapjául szolgáló közlemények

1. Vető B, Szabo P, Bacquet C, Apro A, Hathy E, Kiss J, Rethelyi JM, Szeri F, Szuts D, Aranyi T. (2018) Inhibition of DNA methyltransferase leads to increased genomic 5-hydroxymethylcytosine levels in hematopoietic cells. *FEBS Open Bio*, 8(4): 584-592. IF: 2.143
2. Maeso I, Dunwell TL, Wyatt CD, Marletaz F, Vető B, Bernal JA, Quah S, Irimia M, Holland PW. (2016) Evolutionary origin and functional divergence of totipotent cell homeobox genes in eutherian mammals. *BMC Biol*, 14: 45. IF: 6.779
3. Vető B, Bojcsuk D, Bacquet C, Kiss J, Sipeki S, Martin L, Buday L, Balint BL, Aranyi T. (2017) The transcriptional activity of hepatocyte nuclear factor 4 alpha is inhibited via phosphorylation by ERK1/2. *PLoS One*, 12(2): e0172020. IF: 2.806

### Disszertációtól független közlemények

1. Pagliaroli L, Vető B, Aranyi T, Barta C. (2016) From Genetics to Epigenetics: New Perspectives in Tourette Syndrome Research. *Front Neurosci*, 10: 277. IF: 3.556