

**EPIGENETIKAI MECHANIZMUSOK SZEREPE AZ EMBRIÓ IMPLANTÁCIÓBAN
(DNS-METILÁCIÓ SZABÁLYOZZA AZ ÚJ TEAD4 PROMÓTER EXPRESSZIÓJÁT)**

Ph.D. értekezés

Shima Rashidani



Témavezető:

Dr. Rauch Tibor Attila. Ph.D.

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Prof. Dr. Gallyas Ferenc PhD, DSc.

Program és Doktori Iskola Vezető

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Általános Orvostudományi Kar

Pécsi Tudományegyetem

2024

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	3
1.1. Epigenetika.....	3
1.1.1. DNS metiláció írói.....	4
1.1.2. DNS metiláció olvasói.....	4
1.1.3. DNS mintázat törlői.....	5
1.1.4. Epigenetikai faktorok működése az egyedfejlődés korai stádiumaiban.....	5
1.2. TEAD transzkripciós factor család tagjai.....	6
1.3. A TEAD4 fehérje és hippo jelátvitel.....	6
1.4. Tead4 szerepe az embrió implantációjában	7
2. CÉLKITŰZÉSEK	9
3. EREDMÉNYEK	10
3.1. Epigenetikai profil-analízis egy új promótert jeleznek a TEAD4 gén 3. intronjában.....	10
3.2. Az in silico prediktált TEAD4 promóter jelenlétét a kísérleti eredmények megerősítik ...	10
3.3. Az új TEAD4 izoforma egy DNS-kötő domén nélküli fehérjét kódol	11
3.4. TEAD- Δ N isoform is excluded from the nucleus	11
3.5. A TEAD4- Δ N expresszió sejttípus-specifikus.....	11
3.6. Az alternatív TEAD4 promóter in vitro elemzése	11
3.7. A TEAD4 promóter(ek) funkcionális jellemzése tranziens transzfekciós vizsgálatokban	12
3.8. A TEAD4- Δ N expresszióját a placentában a DNS-metiláció szabályozza	12
4. DISZKUSSZIÓ & KÖVETKEZTETÉSEK	13
6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	16

1. BEVEZETÉS

Világszerte minden hetedik házaspár meddségben szenved, és az embrió implantációjának sikertelensége a nem kívánt gyermektelenség egyik fő oka lehet. A humán embrió implantációja a sikeres terhesség kialakulásának lényeges tér és időbeli folyamata. Az epigenetikai faktorok és folyamatok szerepe az endometrium receptivitásának kialakításában elengedhetetlen. Az epigenetikai módosítások, beleértve a DNS-metilációt, a különböző hiszton-módosításokat, és a mikroRNS-eket, részt vesznek az embrió és az endometrium megfelelő génexpressziós profiljának kialakulásában. A bemutatásra kerülő munka a TEAD4 transzkripciós faktor egy alternatív izoformájának felfedezését írja le, amely a trophoctoderma vonal differenciálódásához és az azt követő embrionális beágyazódáshoz feltehetően szükséges. A kísérleteink vizsgálták, hogy a DNS-metiláció, mint az egyik legismertebb epigenetikai mechanizmus, milyen szerepet játszik az új TEAD4 izoforma expressziójának köldökzsinórban és a méhlepényben szabályozásában.

1.1. Epigenetika

Egyre több kutatási eredmény bizonyítja, hogy az öröklött genetikai állomány (azaz a genomális DNS) mellett különböző környezeti tényezők is jelentősen hozzájárulnak a sejt normál működéséhez és betegségek etiológiájához. Az epigenetikai faktorok a külső ingerekre reagálnak, és hídként működnek a környezet és a genetikai információt hordozó DNS között. Az epigenetikai mechanizmusok a genetikai információ értelmezését segítik a génexpresszió szabályozásával, és ezen keresztül befolyásolják a sejtek aktivitását. Összességében az epigenetikai faktorok és mechanizmusok a génreguláció komplexitását növelik azáltal, hogy finom hozzájárulást nyújtanak a gének kifejeződéséhez. Bár a genetikai és az epigenetikai tényezők szerepe, illetve azok kontribúciója a betegségek etiológiájához gyakran vitatott, egyre világosabbá válik, hogy ez a két rendszer kölcsönhatásban áll egymással, és végső soron a legösszetettebb betegségek kialakulásáért is felelős. Az epigenetika eredetileg a DNS-metilációra és a különböző hiszton-módosításokra összpontosított, de a közelmúltban kibővült a nem-kódoló RNS-ekre is. Ab ovo a szervezet minden sejtje ugyanazt a genetikai információt örökli. Az egyes sejteket az teszi egyedivé, hogy az ontogenezis során különböző génkészletek kapcsolnak ki és be. Az epigenetika - tágabb értelemben - híd a genotípus és a fenotípus között - egy olyan jelenség, amely megváltoztatja génexpressziót egy adott kromoszómális régióban anélkül, hogy a primer nukleotidsorrend megváltozna. Az epigenetikai mechanizmusok határozzák meg a sejt-specifikus gének kifejeződését, és felelősek a sejtmemóriáért, azaz a sejt-specifikus génexpressziós mintázatok fenntartásáért és továbbadásáért az utódsejtekbe. Az epigenetikai faktorok képesek az epigenetikai információ létrehozására, értelmezésére és törlésére, és ebben az értelemben különböző funkcionális csoportokra oszthatók: az epigenetikai „*írók*” vagy enzimek, amelyek módosítják a DNS-t és a hisztonokat; az epigenetikai „*olvasók*” specifikus doménekkal, amelyek felismerik a DNS- vagy hiszton-jeleket; és az epigenetikai „*törölők*”, amelyek képesek törölni a meglévő jeleket, hogy helyet csináljanak az új módosításoknak.

1.1.1. DNS metiláció írói

A DNS-metiláció, a legjobban tanulmányozott epigenetikai jel, kritikus szerepet játszik számos epigenetikai folyamatban, beleértve a genomi imprintinget, a transzpozonok elnémítását, az X-kromoszóma inaktiválását és a gének silencingjét. Emellett olyan létfontosságú biológiai működésekben is részt vesz, mint a korai embriogenezis, az őssejt-differenciálódás, a neuronális fejlődés szabályozása és az onkogenezis. A DNS-metiláció során a citozin-pirimidin gyűrű 5. szénatomjához metilcsoportot adódik, azaz 5-metil-citozin (5mC) keletkezik. Általában a CpG-dinukleotidok az emlősökben túlnyomórészt metilálódnak, ami a CpG-sziget (CGI) promóterek transzkripció gátlásával korrelál. A DNS-metiláció transzkripció aktivációt is kiválthat, amely jelenség különösen hangsúlyos az oocitákban, csírasejtekben és pluripotens sejtekben. A DNS-metilációról ismert, hogy bizonyos transzkripció aktivátorok kötődésének gátlásával és/vagy represszív funkciójú metilkötő fehérjék toborzásával elnyomja a génexpressziót. A DNS-metiltranszferázok (DNMT-k) a DNS-metiláció megírásáért és fenntartásáért felelős enzimek családjá. Ezek az enzimek specifikusan felismerik a citozinokat és metilcsoportot visznek át az S-adenozil-metioninból (SAM) a cél-DNS-szekvenciákra. A DNS-metiláció a CpG-dinukleotidok C5-ös pozíciójában történik, és két fő enzimosztály - a fenntartó metiláció és a *de novo* metiláció - katalizálja. A DNMT1 a fenntartó metil-transzferáz, amely a DNS replikáció során a DNS-metilációs mintázatokat leányszálakra történő átmásolásáért felelős. DNMT1 nélkül metilálatlan leányszálak keletkeznének, ami passzív demetilációhoz és genom-instabilitáshoz vezetne. A DNMT3a és DNMT3b a korai fejlődés során a DNS-metilációs mintázatot létrehozó *de novo* metiltranszferázoknak tekinthetők.

1.1.2. DNS metiláció olvasói

A DNS-metiláció funkciójának és jelentőségének megértése a génexpresszióban és a sejt-differenciálódásban megköveteli a metilált jeleket olvasó fehérjék részletes vizsgálatát. Ezek a fehérjék, amelyeket tágabb értelemben a DNS-metiláció „olvasóinak” nevezünk, döntő fontosságúak az epigenetikai jelek biológiai eredményekké való átalakításában, elsősorban a génrepresszióban, de bizonyos kontextusokban az aktiválásban is. A metilált DNS olvasásában részt vevő fehérjék elsődleges csoportja a metil-CpG-kötő domén (MBD) fehérjék. Ez a család több kulcsfontosságú tagot foglal magában: MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 és MBD4. Mindegyiküknek egyedi kötési tulajdonságai és biológiai funkciói vannak, de általában a DNS-en belüli metilált CpG-dinukleotidok felismerésére és kötődésére szolgálnak. A MeCP2 talán a klinikai jelentősége miatt a legjobban tanulmányozott; a MeCP2 gén mutációi a Rett-szindróma, egy súlyos neurológiai rendellenesség elsődleges okozói. Funkcionálisan a MeCP2 a metilált DNS-hez kötődik, és más kromatin remodelling fehérjéket toboroz, amelyek hozzájárulnak a kromatin tömörítéséhez, ami géncsendesítéshez vezet. Az MBD1 szerepet játszik a genom stabilitásának fenntartásában és a géntranszkripció szabályozásában a kromatin módosítókkal és korepresszorokkal való kölcsönhatásán keresztül. Előnyösen kötődik a metilált DNS-hez, és toborozza a H3-hisztin H3 lizin 9 (H3K9) metiltranszferázokat, megerősítve a kromatin transzkripció inaktív állapotát. Az MBD2 és MBD3 nem kötődik olyan erősen a metilált DNS-hez, mint a MeCP2 vagy az MBD1, de a NuRD komplex részei, amely jelentős szerepet játszik a

kromatin remodellingjében és a transzkripció repressziójában. Az MBD2-ről mutatták ki, hogy alapvető fontosságú a DNS-metiláció géncsendítésre gyakorolt hatásainak közvetítésében. Az MBD4-nek kissé eltérő szerepe van, elsősorban a DNS-javításban vesz részt. A citozin-deaminálódás helyein metilált DNS-hez kötődik, felismeri a timin-guanin eltéréseket, és a mutációk megelőzése érdekében javítási folyamatokat indít el, így fenntartva a genom integritását. Az MBD családon kívül a metilált DNS másik jelentős olvasója az UHRF1 (Ubiquitin-like with PHD and RING Finger domains 1), amely kulcsszerepet játszik a DNS-metiláció fenntartásában a DNS-replikáció során. Az UHRF1 felismeri a hemimetilált DNS-t, és a DNMT1-et toborozza ezekhez a helyekhez, biztosítva, hogy az újonnan szintetizált DNS-szál ugyanazt a metilációs mintázatot kapja, mint az anyaszál.

1.1.3. DNS mintázat törölői

A DNS-metiláció egy reverzibilis epigenetikai módosítás, és a metilsoportok DNS-ről való eltávolításáért felelős enzimek - a „*törölők*” - döntő fontosságúak a génexpresszió dinamikus változásában. A *DNS-demetiláció* történhet passzív és az aktív demetiláció útján, amelyek eltérő enzimaktivitásokra vezethetők vissza. A passzív demetiláció a DNS-replikáció során történik. Ez a folyamat a metil-szignál kihígulását eredményezi a DNS-metiltransferázok (DNMT-k), különösen a DNMT1 hiánya vagy csökkent aktivitása miatt, amely így nem képes fenntartani a metilációs mintázatokat a sejtosztódás során. Az aktív demetiláció ezzel szemben egy közvetlenebb és gyors enzimatikus folyamat, amelyben több kulcsfontosságú szereplő, elsősorban a Ten-Eleven Translocation (TET) enzimesalád vesz részt. Ezek az enzimek - a TET1, TET2 és TET3 - katalizálják az 5-metilcitozin (5-mC) oxidációját 5-hidroxi-metilcitozinná (5-hmC), ami egy köztes lépés a teljes demetiláció felé. Ez az átalakítás döntő fontosságú, mivel az 5-hmC további oxidációval vagy 5-formilcitozin (5-fC) és 5-karboxilcitozin (5-caC) képződik, amelyeket a timin-DNS-glikoziláz (TDG) kivághat, majd a báziskivágási javítási útvonalon (BER) módosíthatatlan citozinnal helyettesíthet. A TET-enzimek nemcsak az aktív demetilációt segítik elő, hanem önmagukban is epigenetikai markerekként szolgálnak. Az 5-hmC például a géntestekben és az enhancerekben dúsul, különösen az agyban és az embrionális őssejtekben, ami az aktív transzkripció szabályozásában és a pluripotenciában betöltött szerepére utal.

1.1.4. Epigenetikai faktorok működése az egyedfejlődés korai stádiumaiban

A petesejt megtermékenyítése után kialakul az egysejtű zigóta, amely több hasadási körön megy keresztül anélkül, hogy a teljes embrió térfogata növekedne. Ahogy az embrió eléri a nyolccellás stádiumot, a polarizáció lehetővé teszi a tömörülést, ami megalapozza a különálló sejtvonalak kialakulását: a trophectoderma (TE) és a belső sejtömeg (ICM). Ezek a sejtvonalak a következő aszimmetrikus hasadási osztódások során fejlődnek, és a blastocoel-üreg kialakulásáig tartanak. Az üregképződés a blastociszta teljes kiterjedését eredményezi, amely a környező zona pellucida rétegből kiszabadul, mielőtt beágyazódna a méhnyálkahártyába. A preimplantációs embriogenezis során a DNS-metilációban dinamikus változások következnek be. A megtermékenyítés után kialakul az apai és az anyai mag, amelyek aktív és passzív demetiláción mennek keresztül. Az embrionális fejlődés előrehaladtával *de novo* metiláció következik be, ami döntő fontosságú az

első sejtdifferenciálódás és a pluripotenciát fenntartó gének elnémítása szempontjából. A metilációs szintek globális ingadozása ellenére az imprintált gének metilációs állapota következetes marad. Vizsgálatok kimutatták, hogy a Dnmt1 a Dnmt3a és Dnmt3b segítségével is képes fenntartani a metilációt a legtöbb imprintelt lókuszban. Emellett a Dnmt1s izoforma a preimplantációs fejlődés során végig a sejtmaghoz kapcsolódik, segít fenntartani a metilációt specifikus genomi régiókban. A metiláció a globális szinteken túl is változik; a Dnmt1o, egy Dnmt1 izoforma, amely elsősorban az oogenezis és a korai preimplantáció során fejeződik ki, stádiumspecifikus metilációs változásokat mutat. A metiltranszferázok és a velük kölcsönható fehérjék expressziós mintázatának elemzése eltérő epigenetikai profilokat jelez egyetlen embrión belül. Ez a komplexitás részletes egysejtes metilációs profilalkotást tesz szükségessé a sejtsorsok megkülönböztetéséhez, és hozzájárul a korai fejlődés során a DNS-metiláció átprogramozásának bonyolult folyamatának megértéséhez. A DNS-metiláció tehát egy alapvető és dinamikus epigenetikai módosítás, amely alapvető fontosságú a preimplantációs embrió fejlődésben, hatással van mind a globális, mind a lókuszs-specifikus génextpresszióra, és rávilágít az egysejt-szintű részletes epigenetikai profilalkotás szükségességére.

1.2. TEAD transzkripciós factor család tagjai

A TEAD család négy különböző tagból (TEAD1-4) áll, amelyeket négy különálló gén kódol, és az emlősök szinte minden szövettípusában kifejeződnek. Az N-terminális domén olyan DNS-cisz-elemekhez kötődik, mint az 5'- GGAATG - 3' szekvencia, amelyek az SV40 enhancerben és a TEAD célgének promóter régióiban vannak jelen. A C-terminus transzaktivációs doménként funkcionál a transzkripciós koaktivátorok toborzásában. A TEAD-ok számos koaktivátor-jelöltjét azonosították, köztük a YAP-ot és annak paralógiát, a TAZ-t, a VgLL fehérjét és a nukleáris receptor koaktivátorok p160 családját. A TEAD1 kulcsfontosságú a szívizom fejlődésében, elősegítve a szívspecifikus gének kifejeződését. A TEAD2 szerepe továbbra is kissé homályos, de feltételezhetően részt vesz az agyfejlődés szabályozásában. A TEAD4 elsősorban az embrió implantációjában jut szerephez. A TEAD3 pontos funkcióját még vizsgálják.

1.3. A TEAD4 fehérje és hippo jelátvitel

A TEAD transzkripciós faktorok a Hippo jelátviteli útvonal kulcsfontosságú közvetítői. Aktivitásukat a nukleáris koaktivátorokkal való kölcsönhatásokon keresztül fejtik ki, amelyeket három csoportba sorolnak: YAP (yes associated protein) és annak paralógiája TAZ (PDZ-kötő motívummal rendelkező transzkripciós koaktivátor, más néven WWTR1), VgLL-ek és p160s fehérjék. A Hippo jelátviteli útvonal a szervméret szabályozója, amely egy központi kináz kaskádokon keresztül működik. A YAP vagy a TAZ, a downstream effektorai, foszforilálatlanul a sejtmagban helyezkednek el, foszforiláláskor pedig a citoplazmába helyeződnek át. Foszforilált formájukban a YAP és a TAZ az ubikvitin/proteasomális útvonalon keresztül degradálódnak. Foszforilálatlanul a YAP/TAZ a sejtmagba kerül, és aktiválja a különböző nukleáris transzkripciós faktorokat, köztük a TEAD-okat. Egyre több bizonyíték van arra, hogy a Hippo-YAP útvonal néhány kulcskomponense az alternatív splicing szintjén szabályozott. A YAP-nak például nyolc különböző splicing izoformája van. Ezeknek az izoformáknak a szerepe még nem teljesen

tisztázott. Mivel a TEAD4 a Hippo-jelátvitel egyik kulcsfontosságú összetevője, feltételezzük, hogy további izoformák is létezhetnek, és biológiailag releváns szerepet játszhatnak ebben a folyamatban. A TEAD4 kritikus szerepet játszik a Hippo jelátviteli útvonalban. A TEAD4 szabályozása ebben az útvonalban koaktivátorai, a Yes-asszociált fehérje (YAP) és a PDZ-kötő motívummal rendelkező transzkripciós koaktivátor (TAZ) foszforilációs állapotától függ. A TEAD4 emellett kulcsszerepet játszik az embrionális fejlődésben és a pluripotenciában, mivel része annak a transzkripciós hálózatnak, amely az embrionális őssejtek pluripotenciáját szabályozza. Olyan alapvető pluripotenciális faktorokkal működik együtt, mint az Oct4, Sox2 és Nanog és olyan géneket szabályoz, amelyek elengedhetetlenek az embrionális őssejtek differenciálatlan állapotban tartásához. Ez a kölcsönhatás hangsúlyozza a TEAD4 jelentőségét a korai fejlődési szakaszokban és a sejt differenciálódásban. A TEAD4 a Wnt jelátviteli útvonalban is szerepet játszik, amely kulcsfontosságú a sejt sors meghatározásában és a szöveti homeosztázis fenntartásában. A TEAD4 kölcsönhatásba léphet a β -kateninnel, a Wnt-szignalizáció egyik alapvető közvetítőjével a génexpresszió szabályozása érdekében. A TEAD4 és a Wnt jelátvitel közötti ilyen kölcsönhatás aláhúzza a fehérje azon képességét, hogy különböző jelátviteli útvonalakat integráljon, elősegítve ezzel a komplex sejt választásokat.

1.4. Tead4 szerepe az embrió implantációjában

Az egerek implantációt megelőző fejlődése során az embriók az első két sejt vonal kialakulásával blasztocisztákat képeznek: a trophoctoderma (TE), amelyből a placenta keletkezik, és a belső sejt tömeg (ICM), amelyből a tulajdonképpeni embrió alakul ki. A TE differenciálódását a Caudal-related homeobox 2 (Cdx2) transzkripciós faktor szabályozza, de a Cdx2 expresszióját megelőző mechanizmusok továbbra sem ismertek. Kimutatták, hogy a Tead1, Tead2 és Tead4 kifejeződik a preimplantációs embriókban, és legalább a Tead1 és Tead4 széles körben fejeződik ki mind a TE, mind az ICM vonalban. A Tead4-et kiűtő (Tead4^{-/-}) embriók azonban a preimplantációs stádiumban elpusztulnak anélkül, hogy kialakulna a blasztocoel. Továbbá a Tead4^{-/-} embriókban nem mutatható ki TE-specifikus gén, beleértve az Eomes-t és a Cdx2-független Fgfr2 gént. Ehelyett az ICM-specifikus Oct3/4 és Nanog transzkripciós faktorok minden blasztomerben kifejeződnek. A Tead4^{-/-} embriók in vitro tenyésztés során szintén nem differenciálódnak trofoblaszt-óriássejteké, bár ezekből az embriókból normális differenciálódási képességű embrionális őssejtek (ES) még létrehozhatók. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a Tead4-nek a Tead1-től és a Tead2-től eltérő szerepe van a preimplantációs TE specifikációjában, és hogy a Tead4 egy korai transzkripciós faktor, amely szükséges a trophoctoderma vonal fejlődéséhez, beleértve a Cdx2 expresszióját is. A Tead1 és a Tead2 közötti funkcionális redundanciát figyeltek meg, mivel a Tead1 és Tead2 kettős mutáns embriók súlyosabb hibákat mutatnak, mint a Tead1 vagy Tead2 egyszemélyes mutáns embriók. A Tead4 inaktiválása egerekben azonban súlyosan befolyásolja a trophoctoderma specifikációját, ami az embrió beágyazódásának kudarcához vezet, ami a Tead4 elsődleges funkciójának tűnik. Figyelemre méltó, hogy az embriók normálisan fejlődnek, ha a Tead4 funkcióját a beültetés után megszakítják. Kezdetben kimutatták, hogy a Tead4 nem szükséges a blastocoel kialakulásához, ha az embriókat alacsony oxigénkoncentrációban tenyésztik. A glükóz hiányában tenyésztett Tead4 knockout embriók

azonban nem indítják el a blastocoel képződést, ellentétben a vad típusú embriókkal. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a TEAD4 szerepe a preimplantációs fejlődés során a morulából a blasztocisztába való átmenethez szükséges energia-homeosztázis kialakításában rejlik.

A Tead4 a placenta primordiumban a trofoblaszt progenitorok önmegújulásának és törzsfejlődésének szabályozásával a posztimplantációs fejlődésben is döntő szerepet játszik. A beültetés utáni egér embriókban a Tead4 szelektíven expresszálódik a trofoblaszt őssejt-szerű progenitor sejtekben (TSPC-k). A Tead4 elvesztése a posztimplantációs egér TSPC-kben károsítja az önmegújulást, ami embrionális letalitáshoz vezet a 9,0. embrionális nap (E9,0) előtt, ami az emberi terhesség első trimeszterének megfelelő fejlődési szakasz. A TEAD4 és kofaktora, a Yes-associated protein 1 (YAP1) is specifikusan expresszálódik a humán placenta első trimeszterének citotrofoblaszt (CTB) progenitoraiban. Néhány megmagyarázhatatlan, ismétlődő terhességvesztést (idiopátiás RPL) összefüggésbe hoztak a CTB-progenitorokban a TEAD4 károsodott expressziójával. Az RPL-páciens-specifikus trofoblaszt őssejtek (RPL-TSC) létrehozásával kimutatták, hogy a TEAD4 elvesztése az RPL-TSC-k hibás önmegújulásával korrelál, és a TEAD4 expressziójának helyreállítása megmenti ezt a képességet. A Tead4-hiányos egér TSC-k globális génexpressziós (RNA-Seq) elemzése, CHIP-Seq adatokkal kombinálva, kimutatta, hogy a Tead4 közvetlenül szabályozza a különböző sejtciklus-szabályozókat, köztük több ciklin/CDK-t. A ciklinek/CDK-k Tead4 által közvetített szabályozása a primer trofoblaszt progenitorokban elengedhetetlen az önmegújulásukhoz és terjeszkedésükhöz. A TEAD4 tehát alapvető szerepet játszik a trofoblaszt sejtek homeosztázisában a placenta fejlődése során, megelőzve a placenta elégtelenségét és biztosítva a sikeres terhességet.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A transzkripciós szabályozás kritikus szerepet játszik az embriónak a méhnyálkahártyába történő beágyazódásában. A TEAD4 egy olyan transzkripciós faktor, amely központi szerepet játszik azoknak a molekuláris eseményeknek a szervezésében, amelyek kritikusak az embrió sikeres beágyazódásához a endometriumban. Ismert, hogy a TEAD4 szabályozza a sejtdhézión, a trofoblasztok inváziójában és az endometrium receptivitásában szerepet játszó gének expresszióját. A TEAD4 az implantáció utáni egyedfejlődésben is részt vesz, és kritikus szerepet játszik a placenta kialakításában és működésében. A TEAD4 diszregulációja a placenta szerkezetének és működésének rendellenességéhez vezethet, ami terhességi komplikációkat, például méhen belüli növekedési-ütem csökkenést vagy preeklampsziát eredményezhet. Ennek megfelelően a TEAD4 epigenetikai összefüggéseinek tanulmányozása értékes betekintést nyújt a TEAD4 fejlődésben, reprodukcióban és betegségekben betöltött szerepébe. Ebből adódóan a TEAD4 karakterizálása diagnosztikai és terápiás szempontból is fontos lehet a reprodukciós orvostudomány számára. A következő célkitűzéseket vetettük fel a TEAD4 és potenciális izoformáinak analizésére:

- 1) A human 12-es kromoszómán kódoló TEAD4 gén körüli epigenetikai mintázatok feltérképezése.
- 2) A TEAD4 új promóter régióinak keresése, amelyek magyarázatot adhatnak a TEAD4 komplex funkciójára.

Epigenetikai hiszton-profilok *in silico* tanulmányozása felvetette, hogy egy új, ismeretlen funkciójú TEAD4 izoforma lehet jelen a sejtekben, és fel akartuk térképezni a szövetekben való expresszióját:

- 3) Az új TEAD4 izoforma klónozása és nukleotidszekvencia analízise.
- 4) Az új izoforma génexpressziós mintázatának vizsgálata.
- 5) Az új izoforma szubcelluláris lokalizációjának felderítése.
- 6) Az alternatív TEAD4 promóter azonosítása, klónozása és transziens expressziós körülmények közötti tanulmányozása.

Miután kimutattuk, hogy az új izoforma jelen van a placentában, két új célkitűzéssel egészítettük ki a vizsgálatainkat:

- 7) Annak bizonyítása, hogy az új izoformát kódoló mRNS transzlálódik a placentában.
- 8) A DNS-metilációs mintázat vizsgálata placentában és milyen szerepet játszhat az expresszióban.

Összefoglalva, a PhD dolgozat fő céljai a következők voltak: a potenciális új TEAD4 izoformák feltárása, expressziójuk jellemzése, és annak vizsgálata, hogy az epigenetikai mechanizmusok, mint például a DNS-metiláció, hogyan játszhatnak szerepet ezekben a folyamatokban.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Epigenetikai profil-analízis egy új promótert jeleznek a TEAD4 gén 3. intronjában

Az eredeti hipotézisünk az volt, hogy a TEAD4 génnek több promótere is lehet, és az új transzkriptum kódolta izoforma részt vehet a blasztociszták méhnyálkahártyába történő implantációjában. Számos olyan eset ismert az irodalomból, amikor különböző promótereket használtak a sejttípus-specifikus genetikai és epigenetikai döntésekkel összefüggésben. A TEAD4 gén további, korábban nem azonosított promótereinek felderítésére az ENCODE-adatbázisában található epigenetikai mintázatokat vizsgáltuk a TEAD4 génben, valamint a szomszédos kromoszómális régiókban. Az *in silico* analízis elején azokra az epigenetikai hiszton-jelekre fókuszáltunk, amelyekről ismert, hogy alkalmasak a transzkripcionálisan aktív promóterek jelzésére. Például a H3 hiszton 4-es lizinjén (H3K4me3) és H3 hiszton 27-es lizinjén (H3K27ac) történő tri-metiláció, illetve acetiláció, valamint a hiszton 2A Z-izoformájának (H2A.Z) depozíciója a transzkripcióban kompetens promóterek indikátorai. A transzkripcionálisan aktív promóter jelenlétét jelzi, ha az RNS-polimeráz II (Pol2) depozíciója átfedésben van ezekkel az epigenetikai hiszton-jelekkel. A TEAD4 gén intergenikus régiójában megfigyeltük mindezen jelek átfedését, ami egy új, a 3. intronba ágyazott promóter létezésére utal. Ennek a hipotetikus TEAD4 intronális promóternek a jelenlétét támogatják a transzkripció faktorokkal kapcsolatos CHIP-Seq adatok az ENCODE adatbázisban. Az elemzést két jól ismert sejtvonalon végeztük el: K562, amely humán myelógen leukémiából származik, és H1-hESC, egy totipotens humán embrionális sejtvonal.

Az epigenetikai szignálok elemzése két olyan területet azonosított, ahol az epigenetikai markerek átfedésben vannak, ami erős transzkripció aktivitásra utal. Az egyik az elismert kanonikus TEAD4 promóter, a másik pedig körülbelül 40 kb-sal lejjebb található a 3. intronban. Ezt a prediktált intronális prediktált promótert még nem vizsgálták. A CHIP-Seq adatok azt jelzik, hogy csak bizonyos sejttípusokban funkcionális, ami arra utal, hogy az alternatív TEAD4 promóterből származó transzkriptumok kódolta TEAD4 izoformának egyedi szerepe lehet bizonyos sejtekben.

3.2. Az *in silico* prediktált TEAD4 promóter jelenlétét a kísérleti eredmények megerősítik

A prediktált promóter transzkripció iniciációs pontjának meghatározását az 5'RACE módszerrel végeztük K562 sejtekből izolált RNS felhasználásával. A kapott fragmentumot PCR-rel amplifikáltuk és egy plazmidvektorba (pDrive) építettük, majd a klónozott fragmentum nukleotidszekvenciáját Sanger szekvenálás módszerével határoztuk meg. A fragmentum nukleotidszekvenciájának ismeretében a humán genomban azonosítani tudtuk a transzkripció startpontot. Ennek értelmében, az új transzkriptum a TEAD4 gén 3. intronjában iniciálódik, azaz egy új TEAD4 promótert azonosítottunk. Továbbá, a nukleotidszekvencia birtokában olyan PCR primereket terveztünk, amikkel vizsgálni tudtuk, hogy az intronális iniciációjú transzkriptum 3' vége milyen további exonokat hordoz. A PCR terméket az előbbihez hasonló módon klónoztuk, majd szekvenáltuk. A szekvencia adatok elemzése azt jelzi, hogy az új promóter által azonosított első exon nem kódoló, de a további exonok azonosak az eredeti TEAD4 gén exonjaival.

3.3. Az új TEAD4 izoforma egy DNS-kötő domén nélküli fehérjét kódol

Az újonnan azonosított transzkriptum jelentősen rövidebb, mint a teljes hosszúságú TEAD4-változat, a TEAD4-FL. Az új transzkriptum *in silico* translációja azt mutatja, hogy egy trunkált TEAD4 izoforma (TEAD- Δ N) kódoló, amiből az N-terminális, DNS-kötő domén hiányzik, azonban a C-terminális régióban teljesen azonos a kanonikus változattal. A TEAD- Δ N izoforma DNS-kötő doménjének delécioja érdekes kérdéseket vet fel a sejtes és molekuláris funkcióival kapcsolatban.

3.4. TEAD- Δ N isoform is excluded from the nucleus

A fehérjék pontos szubcelluláris lokalizációját különböző szabályozó mechanizmusok határozzák meg. A nukleáris lokalizációs szignál (NLS) sok esetben fontos, hogy az adott fehérje a sejtmagba kerüljön, azonban arra is van példa, hogy az NLS nélküli fehérjék a sejtmagba transzlokálódnak. Az NLS-predikciós szoftverek nem tudták NLS-t azonosítani a TEAD- Δ N izoformában. Hipotézisünk az volt, hogy az izoforma lokalizációjának meghatározása betekintést nyújthat az új izoforma celluláris funkciójába. Az izoforma szubcelluláris lokalizációjának vizsgálatára tranziens expressziós kísérleteket végeztünk. Mindkét izoformát fluoreszcens fehérjéket kódoló plazmidba illesztettük. A GFP-t kódoló plazmidot a teljes hosszúságú TEAD4 (TEAD4-FL), míg az RFP-t kódoló plazmidot a TEAD4- Δ N klónozására használtuk. Ezeket a rekombináns plazmidkonstrukciókat eukarióta sejtekbe ko-transzfektáltuk és mikroszkóppal követtük azok szubcelluláris lokalizációját. A teljes hosszúságú TEAD4 izoforma döntően a sejtmagban lokalizálódott, míg a csonka TEAD4- Δ N elsősorban a citoplazmában volt megfigyelhető, de kisebb arányban sejtmagi lokalizáció is előfordult.

3.5. A TEAD4- Δ N expresszió sejttípus-specifikus

Izoforma-specifikus PCR segítségével vizsgáltuk a TEAD4 izoformák expresszióját különböző human szövetmintákban. A teljes hosszúságú TEAD4 izoforma minden vizsgált szövetben detektálható volt PCR-rel. A TEAD4- Δ N variáns expressziója azonban csak bizonyos sejttípusokra korlátozódik, ami az újonnan azonosított izoforma speciális sejtbiológiai szerepére utalhat. Az RNS expresszió mellett a fehérje expressziós profilt is vizsgáltuk, annak az esetnek a kizárására, hogy a translációs szabályozás is jelen van az izoformák expressziójának regulációjában. A TEAD4 izoformák fehérje-expressziós profiljának különböző sejtvonalakon végzett Western blot analízissel történt. A hosszabb TEAD4 izoforma minden vizsgált sejtvonalban megtalálható volt, ami összhangban van a PCR-vizsgálatok eredményeivel. Ezzel szemben a rövidebb TEAD4 izoformát kizárólag bizonyos sejtvonalakban mutatták ki, és a hosszabb változathoz képest alacsonyabb expressziós szintet mutatott.

3.6. Az alternatív TEAD4 promóter *in vitro* elemzése

A transzkripció kontroll része, hogy a transzkripció faktorok (TF-ek) kölcsönhatnak a promóter és az enhancer régiók cisz-elemeivel. Ezek a kölcsönhatások elősegítik a preiniciációs komplex kialakulását, ami az RNS-polimeráz II enzim általi hatékony transzkripcióhoz vezet. A TEAD4- Δ N promóter TF-kötőhelyek feltárása számos potenciális cisz-elemet mutatott ki, beleértve magának a TEAD4-nek is a konszenzus motívumát. A TEAD4-nek a TEAD4- Δ N promóteren

belüli, előre jelzett konszenzus motívumhoz való kötődésének megerősítése érdekében gél-shift vagy EMSA kísérleteket végeztünk. Mivel a kromatin immunprecipitációs (ChIP) vizsgálatokhoz használt kiváló minőségű TEAD4-antitestek nem álltak rendelkezésre, kompetitív EMSA-módszert alkalmaztunk a TEAD4-nek ehhez a promóter-régióhoz való kötődésének validálására. A TEAD4 cisz-DNS eleme szekvencia szintén nagyon hasonlít a TEAD4 konszenzus szekvenciájához. Az EMSA eredményeink demonstrálják, hogy a TEAD4 kötődik az alternatív TEAD4- Δ N promóterhez és feltétezzhetően szabályozza annak kifejeződését.

3.7. A TEAD4 promóter(ek) funkcionális jellemzése tranziens transzfekciós vizsgálatokban

Annak érdekében, hogy elmélyítsük a TEAD4- Δ N transzkripció szabályozásának megértését, és hogy teszteljük az *in vitro* DNS-fehérije kölcsönhatás kísérletek megállapításaink relevanciáját, A régió evolúciósan konzerválódott az emlősökben, ami arra utal, hogy jelentős szerepet játszik a transzkripció szabályozásában. Funkciójának eukarióta kontextusban történő elemzéséhez rekombináns luciferáz riporter plazmidokat állítottunk elő, amelyek mind a kanonikus TEAD4, és a TEAD4- Δ N promóterét tartalmazzák és irányítják a Luciferáz riportergén kifejeződését. Ezeket a riportergén konstrukciókat HEK293 sejtekbe jutattuk. Vizsgálatainkban az újonnan azonosított promóter jelentős luciferáz-aktivitást mutatott, bár kevésbé intenzíven működött, mint a kanonikus promóter. Ez arra utal, hogy a DNS-kötő doménnel rendelkező izoformának kiemelkedőbb szerepe lehet a sejtműködésben, míg a TEAD4- Δ N izoforma bizonyos helyzetekben és sejtípusokban lehet fontos. A TEAD4 és az említett promóter régióval való kölcsönhatásának hatásainak feltárásához egy TEAD4-et túltermelő plazmidot ko-transzfektáltunk egy 1,3 kb TEAD4- Δ N promótert tartalmazó riporter génkonstrukcióval együtt. Megfigyeltük, hogy a TEAD4-overexpresszáló plazmid mennyiségének emelésével a promóter aktivitása is emelkedett. Ez arra utal, hogy a TEAD4 a csonka izoforma expressziójának pozitív szabályozójaként működik. Fontos azonban megjegyezni, hogy a TEAD4 túl magas szintje gátolhatja a promóter működését. Bemutatott adataink együttesen azt mutatják, hogy a TEAD4 modulálja saját izoformájának expresszióját azáltal, hogy kölcsönhatásba lép az új intronikus promóterrel.

3.8. A TEAD4- Δ N expresszióját a placentában a DNS-metiláció szabályozza

A TEAD4 kritikus szerepet játszik a humán embriók implantáció utáni túlélésének biztosításában azáltal, hogy a placenta primordiumban a trofoblaszt progenitorok önmegújulását és fejlődését szabályozza. Egerekben a TEAD4 hiánya a trofoblaszt őssejtekben/progenitor sejtekben (TSPC-k) a beültetés után csökkent önmegújulási képességhez vezet, ami az embrió halálához okozza a 9. embriónális nap előtt. Ez a fejlődési szakasz az emberekben a terhesség első trimeszterének felel meg. Ezért a TEAD4- Δ N expresszió szerepének megértése ebben a kritikus fejlődési szakaszban jelentős érdeklődésre tart számot. Előzetes lépésként megvizsgáltuk a TEAD4 izoformák expressziós mintázatát humán placenta- és köldökzsinórszöveti mintákban. Analízisünk a két TEAD4 izoforma eltérő expressziós profilját mutatta ki az emberi mintákban. A TEAD4- Δ N hiányzott a köldökzsinórmintákból, de kimutatható volt a placenta lizátumokban. Ez a differenciált expresszió a TEAD4- Δ N izoforma egyedi szerepére utal a placenta fejlődésében. Az epigenetikai módosítások, mint például a DNS-metiláció és a különböző hisztonmódosulások olyan kromatin

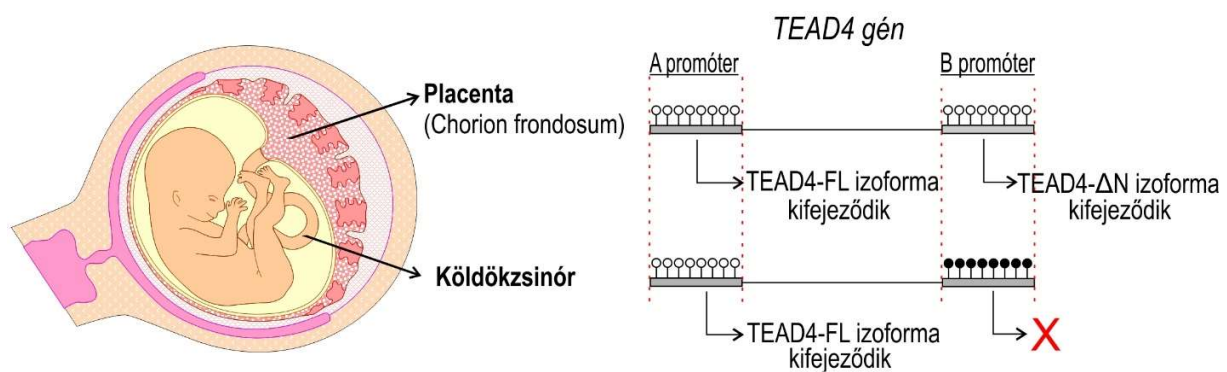
környezetet hoznak létre, amely elősegíti a hatékony transzkripciót. Erre alapozva a TEAD4 izoformák szelektív expresszióját irányító epigenetikai mechanizmusokra fókuszáltunk. DNS-metilációs elemzést (biszulfit-szekvenálást) végeztünk, a köldökzsinór- és placenta mintákból kivont genomi DNS-en. A két TEAD4 promótert - a kanonikus és az alternatív – eltérő DNS-metilációs profilt mutatott. A biszulfit-szekvenálásunk eredményei egybevágtak az általunk észlelt fehérje-expressziós mintázatokkal. Mind a köldökzsinór-, mind a placenta- mintákban a kanonikus TEAD4 promóter nem mutatott metilációt, ami korrelál a TEAD4 fehérje expressziójával. Ezzel szemben a csonka TEAD4- Δ N izoforma promótere jelentős metilációt eltérést mutatott a köldökzsinór mintákban, ami transzkripciószuppresszióhoz és következésképpen a TEAD4- Δ N izoforma expressziójának hiányához vezetett ezekben a mintákban.

4. DISZKUSSZIÓ & KÖVETKEZTETÉSEK

Az új TEAD4 izoforma felfedezése, amely transzkripciója egy intronikus promóter régióból indul, jelentős előrelépést jelent a génszabályozás megértésében. Ez az izoforma, a TEAD4- Δ N, a széles körben vizsgált TEAD4 transzkripciósfaktor N-terminálisán csonka változataként jelenik meg. Érdekes módon a TEAD4- Δ N transzkriptumból hiányzik a hagyományos DNS-kötő domént (TEA/ATTS) kódoló rész, ami a klasszikus transzkripciósfaktor voltát megkérdőjelezi ennek az izoformának. A TEAD4- Δ N:RFP kiméra fehérjével kapcsolatos megfigyelések is alátámasztják, amely a nukleáris lokalizációs jel (NLS) nélkülözésével túlnyomórészt a transzfektált sejtek citoplazmájában lokalizálódik, ami nem nukleáris funkcióra utal. Korábbi kutatások egy rövidebb TEAD4 izoformát leírtak, amely alternatív splicing terméknek volt elkönnyelve. Kísérleteink, amelyek a TEAD4- Δ N alternatív splicing eredetét célozták nem voltak sikeresek, annak ellenére, hogy számos sejttypusban próbáltuk kimutatni. Eredményeink azt demonstrálják, hogy az alternatív promóterhasználat, amely gyakoribb esemény, mint az alternatív splicing, szintén ennek az izoformának a termelődéséhez vezet, megkérdőjelezve azt az elképzelést, hogy megjelenése szigorúan a tumorigenezishez kapcsolódik. A TEAD4- Δ N molekuláris és sejtszintű funkciója nagyrészt spekulatív. Figyelemre méltó, hogy a TEAD4- Δ N megtartja a teljes hosszúságú YAP-kötő domént, ami felveti a citoplazmában lévő YAP1 fehérjével való kölcsönhatás és a sejtek jelátviteli mechanizmusainak befolyásolásának lehetőségét. A YAP1 foszforilációja és nukleáris transzlokációja, amely a Hippo jelátviteli útvonal kulcsfontosságú aspektusa, kritikus folyamatok a sejtproliferáció és a szervméret szabályozásában. Ezért annak megértése, hogy a TEAD4- Δ N hogyan befolyásolja a Hippo-útvonalat, különösen annak szabályozását és az embrió beágyazódásához és a méhlepény kialakulásához létfontosságú differenciálódási folyamatokat, betekintést nyújthat az ezeket a létfontosságú fejlődési szakaszokat irányító bonyolult mechanizmusokba.

Kísérleteink azt mutatják, hogy a TEAD4- Δ N mRNS-expressziója szorosan kapcsolódik intronikus promóterének DNS-metilációs státuszához. A metiláció hiánya ebben a régióban elősegítheti a nyitottabb kromatin konfigurációt, fokozva a nukleoszóma dekonkondenzációt és megkönnyítve a különböző transzkripciósfaktorok, köztük a DNS-kötő doménnel rendelkezők kötődését. Egy ilyen környezet fokozhatja a TEAD4 génszabályozó szerepét, mivel heterodimert

alkothat más TEAD családba tartozó fehérjékkel és SMAD transzkripciós faktorokkal, tovább befolyásolva a génexpressziót. A DNS-metiláció szerepe az epigenetikai szabályozásban, különösen az embrionális fejlődés kritikus preimplantációs és posztimplantációs időszakaiban, jól ismert. A DNMT3B, a de novo DNS-metiláció egyik kulcsenzime, alapvető fontosságú a placenta fejlődésének és működésének modulálásában. A TEAD4- Δ N metilációtól függő szabályozása így új utakat nyit a vizsgálat számára ezen izoforma funkcionális következményeinek feltárására, különösen a placenta fejlődésével és az embrionális növekedéssel összefüggésben. A TEAD4 hagyományos, DNS-kötő domén nélküli formája ismert arról, hogy megzavarja a Hippo-YAP jelátviteli útvonalat, befolyásolva a sejtproliferációt, a migrációt és a szervnövekedést. A TEAD4- Δ N specifikus molekuláris funkciója, beleértve a más fehérjékkel való kölcsönhatását és a különböző jelátviteli útvonalakban betöltött szerepét, azonban még nem teljesen tisztázott. Ennek mechanizmusnak a feltárása jelentős hatással lehet a terápiás beavatkozásokra és a diagnosztikára. Például a TEAD4- Δ N expressziójának manipulálása új stratégiákat kínálhat a rákterápiában, potenciálisan megzavarva a rosszindulatúsággal összefüggő jelátviteli útvonalakat. Továbbá a TEAD4- Δ N biomarkerként szolgálhat bizonyos rákos megbetegedések esetében, diagnosztikai és prognosztikai értéket biztosítva.



A DNS-metiláció és hatása a TEAD4 izoformák expressziójára. Az A promóter a teljes hosszúságú TEAD4 (TEAD4-FL) kifejeződését irányítja, különböző szövetekben metilálatlan marad, biztosítva ennek az izoformának a kifejeződését. Ezzel szemben a B promóter, amely a csonka izoforma (TEAD4- Δ N) kifejeződéséért felelős, szövetspecifikus metilációs mutat, ami ennek az izoformának a különböző szövetekben differenciális expresszióját eredményezi. A grafikus ábrázolás “nyalókaként” ábrázolt CpG-dinukleotidokat tartalmaz; a nyitott nyalókák metilálatlan CpG-eket, míg a feketével kitöltöttek metilált CpG-eket jelölnek.

5. PUBLIKÁCIÓS LISTA

A PhD disszertációval közvetlenül kapcsolódó publikáció.

Rashidiani S, Mamo G, Farkas B, Szabadi A, Farkas B, Uszkai V, Császár A, Brandt B, Kovács K, Pap M, Rauch TA. Integrative epigenetic and molecular analysis reveals a novel promoter for a new isoform of the transcription factor TEAD4. *Int J Mol Sci*. 2024 Feb 13;25(4):2223. doi: 10.3390/ijms25042223.PMID:38396900.

IF: 5.6

További publikációk:

1. Mamo G, Rashidiani S, Farkas B, Szabadi A, Farkas B, Brandt B, Pap M, Rauch TA. Unveiling the Role of Exosomes in the Pathophysiology of Sepsis: Insights into Organ Dysfunction and Potential Biomarkers. *Int J Mol Sci*. Accepted for publication on April 30, 2024

IF: 5.6

2. Ahmadi H, Aghebati-Malek, Rashidiani S, Csabai T, Basil Nnaemeka O; Szekeres-Bartho J. Long-Term Effects of ART on the Health of the Offspring. *Int. J. Mol. Sci*. 2023, 24(17), 13564.

IF: 5.6

3. Ahmadi H, Csabai T, Gorgey E, Rashidiani S, Parhizkar F, Aghebati-Maleki L. Composition and effects of seminal plasma in the female reproductive tracks on implantation of human embryo. *Biomed. Pharmacother*. 2022 Jul;151:113065. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113065. Epub 2022 May 10.

IF: 7.5

4. Brandt B, Rashidiani S, Bán Á, Rauch TA. DNA Methylation-Governed Gene Expression in Autoimmune Arthritis. *Int J Mol Sci*. 2019; 20:5646.

IF: 5.6

5. Rashidiani S, Jalili A, Babaei E, Sheikhesmaeili F, Fakhari S, Atae P, Parhizkar B. The chemokine CCL28 is elevated in the serum of patients with celiac disease and decreased after treatment. *Am J Clin Exp Immunol*. 2017; 6:60-65

IF: 0.8

Konferenciák:

1. Rashidiani S, Pap M & Rauch TA Epigenetic profiling of the human chromosome 12 (p13.33) region reveals a novel promoter of the TEAD4 transcription factor. Hungarian molecular life sciences, 24-26 March, 2023, Eger, Hungary.

2. Rashidiani S, Pap M & Rauch TA. DNA methylation governed expression of the alternative TEAD4 promoter. Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society 2022. 25-27 August 2022. Pécs, Hungary.

3. Rashidiani S, Pap M & Rauch TA, Epigenetic profiling of the human chromosome 12 (p13.33) region reveals a novel promoter of the TEAD4 transcription factor. 29th International Student Congress Of (bio)Medical Sciences. 8-10 June 2022, Netherlands.

4. Rashidiani S, Yousefi S, Sheikhesmaili F, Jalili A. CCL28 is a novel biomarker in the patients with irritable bowel disease. 16th International Congress of Liver and Digestive Disease, 13-15 November 2016, Tehran, Iran

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni hálámat témavezetőmnek, Dr. Rauch Tibornak, amiért nagylelkűen megosztotta velem tudását és tapasztalatát, és értékes visszajelzéseket adott a doktori munkámmal kapcsolatban. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Pap Mariannának a kutatásomban nyújtott segítségéért, valamint mindazoknak, akik hozzájárultak ahhoz, hogy munkakörnyezetem kényelmes és hatékony legyen. Szeretném kifejezni őszinte hálámat Prof. Gallyas Ferencnek, a Biokémia és Orvosi Kémia Intézet vezetőjének és az Interdiszciplináris Orvostudományi Doktori Iskolának a doktori tanulmányaim során nyújtott felbecsülhetetlen támogatásukért. Továbbá mélyen hálás vagyok a Tempus Alapítványnak a Stipendium Hungaricum ösztöndíj odaítéléséért. Végül nem tudom eléggé megköszönni a családtagjaimnak a kitartó támogatásukat.