Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék

Biológia Doktori Iskola

A polycomb protein RYBP/DEDAF *in vivo*
funkcióinak vizsgálata transzgenikus
módszerekkel

Ph.D. értekezés

Pirity Melinda Katalin

Témavezető: Dr. Gácsér Attila

Szeged

2011

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS	6
1.1. ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	6
1.1.1. A GÉNEXPRESSZIÓ SZABÁLYOZÁSA ÉS A TRANSZKRIPCIÓS FAKTOROK SZEREPE	6
1.1.2. AZ RYBP FEHÉRJE, MINT TRANSZKRIPCIÓS REGULÁTOR	7
1.1.3. CÉLKITŰZÉSEK	8
1.2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS ÉS TUDOMÁNYOS HÁTTÉR	9
1.2.1. AZ RYBP KÖLCSÖNHATÁSAI EGYÉB ISMERT FEHÉRJÉKKEL	9
1.2.2. AZ RYBP HOMOLÓG YAF2 ÉS FELTÉTELEZETT SZEREPEI: A FUNKCIONÁLIS REDUNDANCIA KÉRDÉSE	10
1.2.3. A POLYCOMB CSOPORT PROTEINEK (PCG) ÉS SZEREPÜK A SZABÁLYOZÁSI FOLYAMATOKBAN	10
1.2.4. A PRC KOMPLEX TAGOK FENOTÍPUSAI EMLŐSÖKBEN	11
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	12
2.1. DNS KONSTRUKCIÓK ELKÉSZÍTÉSE	12
2.1.1. RYBP KNOCK-OUT KONSTRUKCIÓ ELKÉSZÍTÉSE	12
2.2.2. RYBP TRANSZGENIKUS VEKTOR-KONSTRUKCIÓ ELKÉSZÍTÉSE	13
2.2. ES SEJTEK ALAPÍTÁSA ÉS KARAKTERIZÁLÁSA	13
2.2.1. ES SEJTEK TENYÉSZTÉSE	13
2.2.2. ES SEJTEK ELEKTROPORÁLÁSA	14
2.2.3. <i>RYBP</i> ^{+/-} ES SEJTEK ALAPÍTÁSA	14
2.2.4. AZ <i>RYBP</i> ^{-/-} ES SEJTEK ALAPÍTÁSA	15
2.2.5. ROSA26-RYBP/EGFP TRANSZGENIKUS ES (<i>TG</i> ^{ROSA26-RYBP/EGFP/+} SEJTEK ALAPÍTÁSA	16
2.2.6. ES SEJTEK KARAKTERIZÁLÁSA	16
2.2.6.1. SOUTHERN BLOT ANALÍZIS	16
2.2.6.2. PCR ANALÍZIS	17
2.2.6.3. ELEKTROFORÉZIS ÉS IMMUNOBLOT	17
2.3. RYBP KNOCK OUT ÉS TRANSZGENIKUS EGEREK LÉTREHOZÁSA ÉS ANALÍZISE	18
2.3.1. <i>RYBP</i> ^{+/-} EGEREK ELŐÁLLÍTÁSA	18
2.3.2. A ROSA26-RYBP/EGFP EGÉR (<i>TG</i> ^{ROSA26-RYBP/EGFP/+}) ELŐÁLLÍTÁSA	19
2.3.3. KIMÉRA EGÉR ELŐÁLLÍTÁSA <i>RYBP</i> ^{-/-} ES SEJTVONALBÓL	19
2.3.4. GÉNMODOSÍTOTT EGEREK ANALIZÁLÁSA	19
2.3.4.1. HISZTOLÓGIA ÉS IMMUNHISZTOKÉMIA	19
2.3.4.2. APOPTÓZIS VIZSGÁLAT	20
2.3.4.3. BLASZTOCISZTA "OUTGROWTH ASSAY"	21
2.3.4.4. ELEKTRONMIKROSKÓPIA	22
2.3.4.5. KVANTITATÍV RT-PCR	22
3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESLÉSÜK	24
3.1. A <i>RYBP</i> GÉN CÉLZOTT KIKAPCSOLÁSA A KORAI EMBRIÓ ELPUSZTULÁSÁHOZ Vezet	24
3.2. PROLIFERÁCIÓS ÉS APOPTOTIKUS DEFEKTUSOK A <i>RYBP</i> NULL HOMOZIGÓTA EGÉR EMBRIÓKBAN	30
3.3. AZ RYBP EXPRESSZIÓJÁNAK LOKALIZÁCIÓJA A MÉHEN BELÜLI FEJLŐDÉS KORAI STÁDIUMÁBAN	33

3.4. RYBP SZINTJÉNEK CSÖKKENÉSE BEFOLYÁSOLJA A KÖZPONTI IDEGRENDSZER NORMÁLIS FEJLŐDÉSÉT	36
3.5. A RYBP FEHÉRJE IMMUNOLOKALIZÁCIÓJA A FEJLŐDŐ CNS-BEN.....	40
3.6. AZ <i>RYBP</i>^{+/-} EMBRIÓK EGY RÉSZÉ SZEM FEJLŐDÉSI RENDELLENESÉGEKET MUTAT .	47
3.7. A <i>RYBP</i>^{-/-} <-> <i>RYBP</i>^{+/+} KIMÉRA EMBRIÓK VÁLTOZATOS SZEMFEJLŐDÉSI RENDELLENESÉGEKET MUTATNAK	51
3.8. AZ RYBP TÚLTERMELTETÉSE SZEMLENCSE, RETINA ÉS SZARUHÁRTYA FEJLŐDÉSI RENDELLENESÉGEKHEZ VEZET	53
3.9. AZ RYBP TRANSZGENIKUS LENCSEKBEN BIZONYOS GÉNEK EXPRESSZIÓJA MEGVÁLTOZOTT	59
<u>4. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....</u>	<u>61</u>
<u>5. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....</u>	<u>69</u>
<u>6. SUMMARY.....</u>	<u>71</u>
<u>7. IRODALOMJEGYZÉK.....</u>	<u>74</u>
<u>8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</u>	<u>78</u>

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

C	cornea
DEDAF	death effector domain associated factor
dH ₂ O	desztillált víz
E	embrionális (embryonic)
EC	ektoplacentális kónusz (ectoplacental cone)
EGFP	zölden fluoreszkáló fehérje (enhanced green fluorescent protein)
EYFP	sárgán fluoreszkáló fehérje (enhanced yellow fluorescent protein)
ESC	embrionális őssejt (embryonic stem cell)
EEE	extraembrionális ektoderma (extraembryonic ectoderm)
Ep	corneal epithelium
ES	őssejt (embryonic stem cell)
INL	inner nuclear layer
L	szemlencse (lens)
LE	szemlencse epitélium (lens epithelium)
Lp	lencse plakód (lens placode)
OC	szemkehely (optic cup)
P	születés után (postnatal)
PE	parietális endoderma (parietal endoderm)
PcG	polikomb fehérjecsoport (polycomb group protein)
PLF	elsődleges szemlencserost sejtek (primary lens fiber cells)
POME	szem körüli mezenhima (periocular mesenchyme)
PRC1	polikomb represszáló komplex 1 (polycomb group repressive complex)
Rybp/RYPB	Ring1 and YY1-Binding Protein

SE	felszíni ektoderma (surface extoderm)
SLF	másodlagos lencserost (secondary lens fiber)
TGC	trofoblaszt óriássejt (trophoblast giant cell)
GAL4DB	GAL4 DNS-kötő domén (GAL4 DNA binding domain)
GCL	ganglion cell layer
MEF	egér embrionális fibroblaszt (mouse embryonic fibroblast)
NTD	velőcső rendellenesség, nyitott velőcső (neural tube defect)
ON	szemideg (optic nerve)
ORF	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
T	tranzíciós zóna (transitional zone)
Tg	transzgén
YAF2	YY1 asszociált factor 2 (YY1 associated factor 2)
Y2H	élesztő két hibrid (yeast two hybrid)
YY1	Ying Yang 1 transzkripció faktor
VA	valporsav (valporic acid)
VE	viszcerális endoderma (visceral endoderm)

1. BEVEZETÉS

1.1. Általános bevezetés és célkitűzés

1.1.1. A génexpresszió szabályozása és a transzkripció faktorok szerepe

Egy többsejtű élőlény összes sejtje (egyes immun- és ivarsejtek kivételével) ugyanazon genetikai állománnyal rendelkezik. Ennek ellenére a különböző szövetek teljesen eltérő sajátosságúak, mert bennük a gének különbözőképpen expresszálódnak, ami különböző funkciók kialakulására ad lehetőséget. Az egyedfejlődés során a transzkripció faktorok és jelátviteli folyamatok precízen összehangolt hálózata biztosítja a sejtekben zajló összetett folyamatokat úgy mint sejtproliferáció, programozott sejthalál (apoptózis), differenciáció vagy migráció. A sejtek specializációja a gének megfelelő csoportjainak kiválasztásán, expresszióján, illetve annak szabályozásán alapul. A sejtek különböző hatásokra adott válaszai ezeknek a géntermékeknek az összehangolt szabályozásában rejlenek. Valamennyi gén expressziójának elsődleges szabályozása a transzkripció faktorok által valósul meg, amelyek DNS-szabályozó szekvenciákhoz kötődve indítják el a DNS átírást RNS-sé.

A szabályozó szekvenciák olyan szekvenciaszakaszokat jelentenek, amelyek az átírt gén előtti szekvenciaregióban, az úgynevezett promóteren illetve a gének intronjaiban helyezkednek el. A promótereken többnyire több szabályozó szekvencia helyezkedik el, és általában több transzkripció faktor együttes kapcsolódása szükséges az átírás megindításához. A transzkripció faktorok aktivitása kapcsolatfüggő, és más szomszédos kapcsolódó szabályozó molekulák által is befolyásolt. Ennek megfelelően egy aktivált transzkripció faktor egy gén

transzkripcióját indukálhatja, mialatt egy másikat gátolhatja. Így lehetséges, hogy valamennyi gén több jelátviteli folyamathoz kapcsolódik, és átírása finom szabályozási hálózaton keresztül valósul meg [1, 2]. Az eltérő típusú transzkripciós faktorok bevonása a génregulációba lehetővé teszi a különböző jelátviteli utak összehangolását a sejtmagban [3].

1.1.2. Az Rybp fehérje, mint transzkripció regulátor

Az Rybp fehérjét (Ring1 and YY1-Binding Protein; szintén ismert, mint DEDAF, YEAF1; UniGene Mm.321633; MGI:1929059) elsőként Miguel Vidal munkacsoportja írta le 1999-ben [4]. A munkacsoport a polycomb proteinek szabályozási folyamatokban betöltött szerepét vizsgálja már több mint egy évtizede. Az Rybp fehérjét, mint a Ring1 polycomb fehérje interakciós partnerét izolálták élesztő két hibrid technológia segítségével (yeast two hybrid; Y2H). A feltételezések szerint az újonnan felfedezett Rybp fehérje az emlős polycomb komplex egy új tagjának tekinthető. A Rybp fehérjéről kimutatták, hogy egér embriókban a korai fejlődési stádiumokban mindenütt jelenlevő, általános (ubiquitous) módon expresszálódik és hogy számos, transzkripcióban fontos fehérjével kapcsolatba lép. Így az úgynevezett “moonlighting” fehérjék családjába tartozik, melyekre jellemző hogy egynél több, egymástól eltérő funkciót képesek ellátni [5]. Ennek megfelelően, az Rybp/DEDAF protein - amellett hogy maga is transzkripciós regulátor és polycomb protein - *in vitro* kölcsönhatásba lép számos, változatos biológiai funkcióval bíró fehérjével, úgymint DNS kötő (YY1), kromatin módosító (Brg1), pro-apoptotikus (pro-caspase-8), egyéb polycomb (Ring1A, Ring1B, M33, mPC2) vagy például a sejtek proliferációjában és differenciációjában fontos szabályzó funkcióval bíró Myc-Mad-Max hálózat tagjaival (Mxi1). Vidal és munkatársai javasolták, hogy

az Rybp gén/terméke a transzkripció szabályozó faktorok közé kerüljön besorolásra, mégpedig azok közé amik a polycomb komplexek tagjaival is kölcsön hatnak. Ezzel egybevágóan a GAL4DNS-kötő domén (GAL4DB)-egér Rybp fúziós protein (GAL4DB-Rybp) valóban transzkripció represszorként hatott az egér sejteken végzett riporter gén ko-transzfekciós vizsgálatokban [4].

1.1.3. Célkitűzések

Jelen disszertáció az egér *rybp* génnek és termékének, az Rybp proteinnek, *in vivo* funkcióinak felderítésére szolgáló kísérletsorozatot és azok eredményeit tartalmazza. A disszertáció az egérgenetika transzgenikus eszközeinek alkalmazásával, gén-kiütéssel (KO - knock out ; LOF - loss of function, gén veszítéses/hiányos) és gén túltermeltetéssel (“overexpression” avagy klasszikus transzgenikus; Tg) kívánt rávilágítani az Rybp gén embrionális fejlődésben játszott potenciális szerepére. Ezért munkám során célul tűztem ki a következőket:

- (i) Van-e szerepe az Rybp génnek és géntermékének az embrionális fejlődésben?
- (ii) Amennyiben nincs szerepe - úgy az *rybp* géntermék szerepe redundánsnak tekinthető-e és más fehérjék (pl. homológ YAF2 protein) átvehetik-e a szerepét az embrionális fejlődés során?
- (iii) Amennyiben van szerepe (letális fenotípus vagy elváltozások az embrionális fejlődés folyamán), úgy mi a fenotípusa a géndeléciónak és milyen szerveket érint az Rybp gén hiánya az embrionális fejlődésben?
- (iv) Összefügg-e a fenotípus az expressziós mintázattal, azaz a fenotípus által érintett szervekben lokalizálódik-e az Rybp fehérje és milyen az expressziós mintázata?
- (v) Mi történik ha túltermeltetjük a fehérjét (overexpression) egérben, mely szervek érintettek az embrionális illetve poszt-natális (születés utáni) fejlődésben?

(vi) Mi lehet a mechanizmus, amivel az Rybp kifejti hatását?

Ezen kérdések megválaszolása segíthet bővíteni, illetve pontosabbá tenni a *Polycomb*- és *trithorax*-csoportba tartozó gének működéséről kialakított modellünket.

1.2. Irodalmi áttekintés és tudományos háttér

1.2.1. Az Rybp kölcsönhatásai egyéb ismert fehérjékkel

Az Rybp protein különböző változatos funkciójú fehérjékkel alkotott funkcionális kapcsolatai révén számos fiziológiás és patológias folyamathoz köthető [6]. Így kölcsönhatásba lép transzkripcionális ko-represszorokkal vagy a sejtproliferációban kulcsfontosságú géntermékekkel. Valójában az Rybp fehérje felfedezése és izolálása a Ring1A (Ring1; a *Drosophila* ortológja a dRing/Sce/nek) polycomb szabályozó proteinnel való kölcsönhatása révén vált először lehetővé [4]. Később kimutatták, hogy az Rybp a Ring1B-vel (Ring2/Rnf2; *Drosophila* dRing/Sce orthológ) és a M33-mal (Pc1 *Drosophila* Pc orthológ) is kölcsönhat [4]. Ez a három PcG protein a gének stabil represszált állapotáért felelős, a PRC1 PcG multiprotein komplex tagjaiként is ismertek.

Más tanulmányok kimutatták hogy az Rybp fehérje kölcsönhat számos egyéb transzkripciós faktorról is, így például a DNS kötő E2F család tagjaival [7], valamint a proto-onkogén myc szabályozott (“responsive”) génekkel [8]. Az Rybp és Myc (N- és C-myc) kapcsolat egyben a sejtciklus szabályozásban betöltött potenciális szerepkörre is utal, hiszen a myc géncsalád tagjainak a sejtciklus szabályozásában bizonyítottan fontos és meghatározó szerepe van. Az Rybp gén kulcsfontosságú szerepét támasztja alá az a megfigyelés is, hogy valószínűleg E2F és YY1 kötőhelyek között létesít kapcsolatot és mintegy „áthidaló” feladatot lát el a specificitást

biztosítva [7].

1.2.2. Az Rybp homológ Yaf2 és feltételezett szerepei: a funkcionális redundancia kérdése

A Yaf2 fehérjét 1997-ben írták le először, mint a DNS kötő YY1 transzkripció faktorral kölcsönható cink-finger proteint [9], amelyet az Rybp fehérjéhez hasonlóan élesztő két hibrid technológia segítségével azonosítottak. A Yaf2 fehérjéről, ami aminosav szinten 55%-ban homológ az Rybp-vel, szintén kimutatták hogy kölcsönhatásba lép számos PRC1 komplex taggal és DNS kötő fehérjével [6, 9, 10]. Egy korai modell szerint az Rybp transzkripcionális ko-represszorként, míg a Yaf2 ko-aktivátorként funkcionál [4, 6, 9], noha későbbi tanulmányok kimutatták ennek az ellenkezőjét is [7, 11]. A két fehérje domén szerkezete is hasonló: azok N-terminális régiót kivéve, ahol a cink-finger domének találhatók, egy szerin-gazdag rész húzódik amely nem mutat homológiát más ismert fehérje doménekkal és nagyfokú rendezetlenséget mutat (IDP; intrinsically disordered proteins) [4, 5, 9].

1.2.3. A polycomb csoport proteinek (PcG) és szerepük a szabályozási folyamatokban

A polycomb csoport proteinek (PcGs) az ecetmuslicában (*Drosophila melanogaster*) írták le először. Multimer komplexeket alkotnak (PcG bodies), amelyek a génexpresszió stabil represszállásában játszanak alapvető szerepet így a kromatin remodellező epigenetikus szabályozógének családjába is besorolást nyertek. A PcGs csoportjába tartozó fehérjék a *cis*-regulátorok inaktív állapotának (zárt kromatin-konformációjának) fenntartásáért felelősek, míg a TRITHORAX-csoport (TRXG) tagjai az aktív *cis*-regulátorok (nyílt kromatin-konformációjú) állapotát tartják fenn. Ez a két komplex egymással ellentétesen dolgozik, míg a PcG fehérjék

represszálnak addig a TRXG fehérjei aktiválnak. Target génjeik az úgynevezett homeotikus gének, amelyek olyan konzervált mestergének (transzkripciósz-regulátorok), melyek az egyedfejlődés során korán bekapcsolnak és mindvégig aktívak maradnak. A PcG és TRXG csoport tagjai egymással genetikai kölcsönhatást mutatnak: azonos csoportba eső gének mutációi egymás fenotípusát általában erősítik, míg az ellentétes hatású gének mutációi gyengítik egymást. A POLYCOMB, illetve TRITHORAX-csoportba tartozó fehérjék a homeotikus gének *cisz*-regulátoraiban található PRE- (Polycomb Response Element), illetve TRE-szakaszokon (TRE: Trithorax Response Element) keresztül szabályoznak. Expressziójuk szelvényt specifikus, szerepük, hogy az általuk szabályozott végrehajtó géneken keresztül kialakítsák az adott szelvény identitását. Mind a TRXG, mind pedig a PcG fehérjék nagyfokú evolúciós konzervativizmust mutatnak a férgekől egészen a magasabb rendű gerincesekig, ami működési mechanizmusuk konzervatív jellegére utal és egyben rámutat evolúciós fontosságukra is [12].

1.2.4. A PRC komplex tagok fenotípusai emlősökben

Emlősökben a PcG fehérjék számos fontos fejlődésbiológiai szereppel bírnak. Így például az egér PRC2 komplex tagjainak mutációi embrionális letális fenotípust okoznak, míg a PRC1 komplex tagok működésének a felfüggesztése homeotikus transzformációkat mutató peri-natális (születés körüli) fenotípust okozott [14]. Ezzel ellentétben a PcG komplex tagjainak túltermeltetése bizonyos rákos folyamatok áttételekre való hajlamának (“invasiveness”) és rossz indulatának (“malignancy”) az egyik fokmérője. Sőt, a *Drosophila* PRC1 komplexek nagyon hasonlóak az emlős PRC1 komplexhez ami például a rákos folyamatok szabályozásában kiemelkedő szereppel bíró ink4 (P16, P19ARF) lókuszt is szabályozza [13].

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. DNS konstrukciók elkészítése

2.1.1. Rybp knock-out konstrukció elkészítése

Az Rybp eltávolítását célzó (gene targeting) vektor elkészítéséhez először génkönyvtárból ki kellett nyernünk az Rybp genomikus szekvenciáját. Ehhez az egér Rybp cDNS szekvenciájával hibridizáltunk a *129/SvJ* háttérű egér genom-könyvtárra. Először egy 18 kb méretű genomikus részt (klónt) azonosítottunk, amely tartalmazta a Rybp gén 3-4-5-ös exonjait (pRYBP18). Az így azonosított genomikus szakaszt pBluescript SK(+) plazmidba klónoztuk be. Az így elkészített pRYBP18 fragmentumot szekvenáltuk és a szekvencia alapján megállapítottuk ennek a szakasznak az exon-intron határait és azonosítottuk a restrikciós hasító helyeit.

A vektor elkészítéséhez egy 5 kb DNS szakaszt, ami az Rybp gén 3., 4. és 5. exonjait tartalmazta kicseréltük egy sárga fluoreszcens riporter fehérjére (enhanced yellow fluorescent protein (EYFP), és egy loxP szekvenciákkal körülvett PGKneo kazettára. Az így elkészített konstrukció 5' végére 0,75 kb hosszúságú, a 3' végére pedig 5,25 kb hosszúságú homológ genomikus régiót klónoztunk.

Az 5' homológ régiót a pRYBP18 genomikus szakaszából nyertük PCR reakcióval (primer A, 5'-GTTAAGCTTACGCGTTGTGCAGAAATATTG-3', és primer B, 5'-GTTAAGCTTCGATGCGAGGTTTCCTACAAC-3'). A PCR terméket ezután EYFP (Clontech)-floxed neo vektorba klónoztuk. A 3' homológ régió elkészítéséhez, *HindIII* enzimmel kivágtunk a Rybp gén nem átíródo régiójából egy 5,25 kb hosszúságú szakaszt, amelyet a floxed pGK-Neo kazetta 3' végén elhelyezkedő *SacII* helyre klónoztunk be. A targetáló vektort *MluI* enzimmel (melyet

primerA-val vittünk be) linearizáltuk és R1 ES (embryonic stem) sejtekbe elektroporáltuk.

2.2.2. Rybp transzgenikus vektor-konstrukció elkészítése

A ROSA26-RYBP/EGFP transzgenikus egér előállításához egy olyan vektor konstrukciót készítettünk, amely a RYBP/EGFP fúziós fehérje szekvenciája előtt tartalmazott egy LoxP szekvenciákkal körülvett neomicin kazettát (floxedNeo) és a ROSA26 targetálásához szükséges szekvenciákat [15].

A konstrukció elkészítéséhez az Rybp fehérjét kódoló szekvenciát PCR reakcióval szaporítottuk fel a következő primerekkel: primer A (5'-gcacgtcgaccagcccgccatgacctgg) és primer B (5'-ctctggatccgaaagattcattcactgc). Az így előállított DNS szakaszt *NheI/SaII* restrikciós enzimekkel történt emésztés után ligáltuk a *pEGFP-N3* plazmidba. Az RYBP/EGFP fúziós fehérjét *NheI/NotI* enzimekkel átklónoztuk a *pBigT* [16] plazmidba, amely a floxedNeo kazettát tartalmazta. Ezután az így létrehozott floxedNeo-RYBP/EGFP kazettát átklónoztuk a *p26ROSA* plazmidba, *AscI/PacI* restrikciós enzimekkel [16].

2.2. ES sejtek alapítása és karakterizálása

2.2.1. ES sejtek tenyésztése

A sejtek tenyésztését Nagy és munkatársai módszerét követve végeztük az alábbiak szerint [17]. Az ES sejtek differenciálatlan állapotban való fenntartásához mitomicin C antibiotikum kezelt (Sigma, 10 µg/ml), 13,5 napos egér embrió kötőszövetes részeiből származó egér embrionális fibroblaszt (mouse embryonic fibroblast; MEF) tápláló sejtréteget használtunk. A sejteket ES médiumban

tenyésztettük DMEM (Gibco) és 15% FCS kiegészítés mellett (Hyclone). A tápoldat L-glutamin (Gibco; 2 mM), β -merkaptoetanol (Sigma; 0,1 mM), Na-piruvát (Gibco, 1mM) nem esszenciális aminosav (Sigma, 10 mM), penicillin (Gibco, 50 U/ml), streptomycin (Gibco, 50 μ g/ml) és rekombináns egér Leukémia Inhibitor Faktor (ESGRO-LIF; Chemicon; 1000 IU/ml) kiegészítést tartalmazott. A sejteket kétnaponta passzáltuk Tripszin:EDTA (0,05% tripszin; Gibco) emésztést végezve új mitomicin C kezelt fibroblaszt sejtrétegre az optimális sejtszám beállítását követően.

2.2.2. ES sejtek elektroporálása

Az elektroporáláshoz az egér őssejteket a fent említett módon tripszineztek, majd centrifugálás után PBS-ben mostuk és szintén üleptettük. A sejtpelletet ezután 800 μ l PBS-ben vettük fel, $5-6 \times 10^6$ sejt/ml koncentrációban. A sejtekhez ezt követően a bevinni kívánt transzgén konstrukciót 10 μ l dH₂O-ban felvéve kevertük hozzá, majd azonnal elektroporátor küvettába helyeztük és elektroporáltuk (BioRad).

2.2.3. *Rybp*^{+/-} ES sejtek alapítása

A linearizált targetáló vektort R1 ES sejtekbe elektroporáltuk standard protokoll szerint. Ezt követően a sejteket tenyésztő médiummal tízszeres térfogatra hígítottuk, majd mitomicin C kezelt neomicin rezisztens MEF tápláló sejtréteget tartalmazó, 10 cm-es Petri-csészékre szélesztettük.

Az antibiotikum szelekciót 24-48 óra múlva kezdtük meg (300 μ g/ml G418). A klónok szelektálása 10 nap elteltével kezdődött.

A szelektált klónokat sztereómikroszkóp alatt (SZH, Olympus) mikropipetta segítségével helyeztük át egyedileg, 96-lyukú tenyésztőedénybe. A klónok növekedését követően a tenyészet egy részét analízis céljából félretettük, a maradék

sejteket pedig lefagyasztottuk. A klónok analízisét a megfelelő technikával (PCR vagy Southern blot) a targetált szekvencia alapján tervezett primerekkel és próbákkal végeztük. A jól targetált klónokat visszavettük fagyasztásból és 24-lyukú tenyésztőedényben, végül pedig 6 cm-es Petri-csészében tenyésztettük tovább, a szokásos ES-tenyésztési protokollt követve.

2.2.4. Az *rybp*^{-/-} ES sejtek alapítása

A *rybp*^{-/-} ES sejteket az *rybp*^{+/-} ES sejtekből hoztuk létre a vad típusú allél újabb targetálásával. Ehhez először a *rybp*^{+/-} ES sejtekből Cre rekombináz segítségével eltávolítottuk a PGKneo kazettát. Az ES sejteket 25 µg cytomegalovírus-Cre-rekombináz (pBS185) [18] expressziós plazmiddal elektroporáltuk. Két nappal az elektroporáció után a sejteket 10 cm-es zselatinnal fedett sejttenyésztő edényekbe tettük, 5×10³ sejt/ml koncentrációban. A sejtek 5 nap múlva jól körülhatárolható, egyedülálló kolóniákat képeztek, melyeket kiszedtünk és felszaporítottunk. Az így keletkezett sejtvonalakban teszteltük, hogy tartalmazzák-e még a PGKneo kazettát. A PGKneo kazetta jelenlétét PCR-rel és a klónok G418 érzékenységeinek meghatározásával (200 µg/ml 7-9 nap; Gibco) mutattuk ki. A következő primereket használtuk a PGKneo kazetta kimutatására: primer A, 5'-AGAGGCTATTCGGCTATGACTG-3', és primer B, 5'-CCTGATCGACAAGACCGGCTTC-3'. A PCR reakcióhoz pozitív kontrollnak az *mx1* génre specifikus primereket használtuk (primer A, 5'-CTGGTGTTCCTTCTGGCTTCC-3', és primer B, 5'-GGGGCTCGGCATGGAGGGGAA-3'). Azokat a klónokat, amelyek nem tartalmazzák a PGKneo kazettát újabb elektroporációnak vetettük alá, amelyet ismét az eredeti targetáló vektorral végeztünk. Ezt követően a sejteket mitomicin C kezelt

neomicin rezisztens MEF tápláló sejtréteget tartalmazó, 10 cm-es Petri-csészékre szélesztettük. A szélesztést követő napon a sejteket 200 µg/ml G418-tal szelektáltuk 10 napon keresztül. Ezt követően a klónokat kiszedtük és felszaporítottuk további tesztelésre.

2.2.5. ROSA26-RYBP/EGFP transzgenikus ES ($Tg^{ROSA26-RYBP/EGFP/+}$) sejtek alapítása

Rybp transzgenikus ES sejtvonal létrehozásához a floxedNeo-RYBP/EGFP kazettát tartalmazó ROSA26 targetáló konstrukcióval R1 ES sejtvonalat elektroporáltunk, majd G418-cal (GIBCO, 300 µg/ml) szelektáltuk (ld. 2.3 pont). A klónokat DNS-DNS hibridizációval vizsgáltuk a transzgén jelenlétére [16].

2.2.6. ES sejtek karakterizálása

2.2.6.1. Southern blot analízis

Az analízishez a genomikus DNS-t *Xba*I enzimmal emésztettük, majd a fragmentumokat gélelektroforézissel szétválasztottuk. Ezután nylon membránra blottoltuk és [α - 32 P]dCTP izotóppal jelölt próbával hibridizáltuk. A próba az Rybp gén 2. intronjának egy 0,35 kb régióját tartalmazta, melyet a pRYBP18 fragmentumból PCR reakcióval nyertünk (primer A 5'-CAAACCCTATCTCGGGTTGCA-3', primer B 5'-GGGTACAATGCGAGGACAGTT-3'). Ez a próba *Xba*I emésztés után egy 8 kb-os szakaszt ismert föl a vad típusú allélt tartalmazó, és egy 5 kb-os szakaszt a targetált klónokban.

2.2.6.2. PCR analízis

Genomikus PCR reakciót az Rybp 2. intronra tervezett primerrel (5'-TATGGCTACACGATATGGGCT-3') és az EGFP-N (Clontech) szekvenáló primerrel végeztük a következő körülmények között: denaturálás - 94°C 40 s, primer feltapadás - 60°C 30 s, és lánchosszabbítás - 72°C 120 s, 33 cikluson keresztül. A PCR reakció 800 bázis hosszúságú fragmentumot eredményezett a jól targetált klónokból.

2.2.6.3. Elektroforézis és immunoblot

Az ES sejteket feltárás előtt PBS-sel mostuk és jégen tartottuk. A feltárást jégben előhűtött feltáró oldattal végeztük proteáz inhibitor koktél jelenlétében (1% NP-40, 1% deoxycholic acid, 0,1% sodium dodecyl sulfate, 150 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate [pH 7,2], 2 mM EDTA és 50 mM Tris-HCl). A 10 µg fehérjét tartalmazó lizátumot 7,5 ill. 10%-os SDS-poliakrilamid gélen választottuk el Mini-Protean elektroforézis készüléket (Bio Rad) használva. A gyűjtőgélben állandó 25 mA, míg a szeparálógélben 35 mA áramerősség mellett ELFO pufferben (25 mM Tris-OH, pH 7,7; 0,7 M glicin; 0,1% SDS), 1,5-2 óra alatt választottuk el a mintákat.

Ezután a fehérjéket 0,2 µm pórusméretű PVDF (Bio-Rad) membránra blottoltuk át a Mini-Trans-Blot (Bio-Rad) készülék segítségével, transzfer pufferben (25 mM Tris, pH 8,3; 25 mM glicin; 20% metanol), 200 mA áramerősségen, 60 percen át, jéghűtés mellett. A PVDF membránt ezután 5% (g/v) tejet (Carnation nonfat dry milk) tartalmazó TBS-TWEEN pufferben (50 mM pH 7,4 Tris, 200 mM NaCl és 0,1% (v/v) Tween 20) áztattuk egy órán át. A membránokat egy éjszakán keresztül inkubáltuk elsődleges ellenanyaggal; anti-RYBP (anti-DEDAF; 1:1,000, Chemicon AB3637), anti-Max (1:1,000, Santa Cruz SC-197) vagy anti-GFP (1:1,000,

Molecular Probes).

Másodlagos ellenanyagként anti-nyúl, tormaperoxidázzal konjugált 50000-szer hígított antitestet alkalmaztunk (NA934V; Amersham). A specifikusan nem kötődött másodlagos antitestet mosással távolítottuk el (háromszor 20 perc, 0,1% TBS-TWEEN), majd a peroxidáz-függő lumineszcenciát „enhanced chemiluminescence” technikával (ECL, Amersham), autoradiográfiával határoztuk meg.

2.3. Rybp knock out és transzgenikus egerek létrehozása és analízise

2.3.1. Rybp^{+/-} egerek előállítása

A knock out egerek létrehozásához három megfelelő módon, homológ targetált ES sejtvonalat használtunk (A6, F4 és G3). Hólyagsíra stádiumú egér embrióba injektáltuk a targetált ES sejteket standard protokoll szerint. Az így létrehozott hím kimérákat fehér színszűrű IRC (elnevezését az „Institute for Cancer Research” származási helyéről még 1948-ban kapta) vagy CD1 (elnevezését a „CD1” molekula hiányáról kapta) genetikai háttérű nőtény egerekkel pároztattuk és az aguti színű utódaikat teszteltük, hogy tartalmazzák-e a targetált allélt. A mutáció jelenlétét egér farokból izolált DNS-ből YFP-re specifikus PCR primerekkel mutattuk ki (primer A, 5'-AAGTTCATCTGCACCACCG-3', és primer B, 5'-TGCTCAGGTAGTGGTTGTCG-3'). A targetált allélt heterozigóta formában hordozó egereket párosítottuk, és több mint 1000 utódot analizáltunk a három sejtvonalból. Mindhárom sejtvonalból származó egerek ugyanazt a fenotípust mutatták.

2.3.2. A ROSA26-RYBP/EGFP egér ($Tg^{ROSA26-RYBP/EGFP/+}$) előállítása

Kettő jól targetált klónt C57BL/6 egérből származó hólyagsíra állapotú embrióba injektáltunk. Az injektálással előállított ivarsejt kimérákat (ROSA26-RYBP/EGFP egér), PCR-rel genotipizáltuk [16]. A hím kimérákat ICR genetikai háttérű nőstényekkel kereszteztük, majd az aguti színű utódaikat teszteltük a transzgen jelenlétére. A mutációra heterozigóta állatokat Cre transzgenikus egerekkel kereszteztük és az így létrehozott egereknek analizáltuk a fenotípusát. A nem transzgenikus alomtársaikat kontrollként használtuk a kísérleteinkben. A heterozigóta transzgenikus utódokat pároztattuk, hogy fenntartsuk a mutáns allélt. Mindegyik analízist kevert (129 x ICR) háttérű egereken végeztük.

2.3.3. Kiméra egér előállítása $rybp^{-/-}$ ES sejtvonalból

Kiméra embriók előállításához $rybp^{-/-}$ R1 (129/Svx129-Cp háttérű) ES sejteket injektáltunk vad típusú, 129/Svx129-Cp háttérű egerekből származó hólyagsíra állapotú embriókba. Az embriókat ezután visszaültettük anya egerek méhébe. A kiméra embriókat különböző fejlődési stádiumokban vizsgáltuk fluoreszcens sztereómikroszkóppal. Az embriókról fényképeket készítettünk, majd hisztológiával analizáltuk.

2.3.4. Génmódosított egerek analízálása

2.3.4.1. Hisztológia és immunhisztokémia

Az embriókat 4% paraformaldehid tartalmú PBS-ben fixáltuk egy éjszakán keresztül. Fixálás után az embriókat metanol grádienssel víztelenítettük, majd paraffinba ágyaztuk. A paraffinba beágyazott embriókból 4-6 μ m-es szekciókat

(„serial sections” vagy sorozatos metszetek) vágunk. Immunhisztokémiai analízishez az így elkészített szekciókból eltávolítottuk a paraffint, majd re-hidratáltuk. A re-hidratált szekciókat 3% H_2O_2 oldattal kezeltük, hogy ezzel eltávolítsuk az endogén peroxidázokat. Ezután a hidrogénperoxidot vizes, majd PBS-es mosással eltávolítottuk és 10% BSA tartalmú PBS-sel blokkoltuk a szekciókat. Blokkolás után a szekciókat elsődleges ellenanyaggal egy éjszakán át inkubáltuk. Az ellenanyagok a következők voltak: anti-phospho-hisztón H3 (Ser 10), clone RR002 (egér monoklonális, 1:1,000; Upstate 05-598MG) Pax2 (hígítás 1:200, Babco, PRB276P, nyúl), Pax6 (hígítás 1:500, egér IgG1, DSHB), Nestin (hígítás: 1:100, egér IgG1, DSHB Rat-401), NeuN (hígítás: 1:1000, Chemicon MAB377), TUJ1 (hígítás: 1:2000, Sigma T8660), anti-RYBP (nyúl anti-DEDAF poliklonális, 1:100; Chemicon AB3637).

A felesleges elsődleges ellenanyag eltávolítása után a mintákat anti-egér vagy anti-nyúl 400x-os hígítású biotinnal konjugált másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk szobahőmérsékleten 45 percig (Vector laboratórium). Ezután 45 percig biotinált-avidin enzim komplex-szel inkubáltuk a szekciókat és végül DAB kittel (Vector laboratórium) hívtuk elő a színreakciót.

2.3.4.2. Apoptózis vizsgálat

Apoptózis kimutatásához embriókban úgynevezett terminál deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) analízist alkalmaztunk. Az embriókat egy éjszakán át 4% paraformaldehiddel fixáltuk, majd felszálló metanol gradienssel víztelenítettük és paraffinba ágyaztuk. A paraffinba beágyazott szövetekből 6 μm vastag metszeteket készítettünk. Az így elkészített szekciókat előinkubáltuk 0,1% Triton X-100-at tartalmazó 1x One-Phor-

All (OPA) pufferben (Pharmacia Biotech). Ezután a mintákat 100 µl hibridizáló oldatba tettük, amely 1x OPA puffert, 6 µM dATP-t, 3 µM biotin-UTP-t (Sigma), 1 µl terminális transzferázt (TdT; Pharmacia), 0,1% Triton X-100-at tartalmazott és egy óráig 37°C-on inkubáltuk. Ezután PBS-sel mostuk, majd Texas Red-del konjugált sztreptavidinnel (1:150 dilution; Calbiochem) inkubáltuk 4°C-on 30 percig. Inkubálás után a metszeteket 3x mostuk PBS-ben, majd az utolsó mosáshoz 4',6'-diamidino-2-phenylindole-t (DAPI) adtunk és lefedtük. A mintákat Axiovert 200M mikroszkóppal analizáltuk.

2.3.4.3. Blasztociszta "outgrowth assay"

Rybp +/- egerek keresztezéséből származó 3,5 napos hólyagsíra állapotú embriókat izoláltunk. Négy különböző egerből származó almot analizáltunk. A hólyagsíra állapotú embriókat ES médiumot tartalmazó, zselatinnal (Sigma) fedett 12-lyukú tenyésztő edényekbe tettük. A kihelyezést követően 4 napon át fényképeket készítettünk az embriókról. A hólyagsíra állapotú embriók általában 48 órával a kihelyezés után tapadnak le, majd trophektodermális jellegű kinövéseket formálnak.

A genotipizáláshoz mindegyik embrióból mintát vettünk, majd 2 µl lízis pufferrel lizáltuk (5 mM dithiothreitol, 0,8% Igepal CA630, és 900 µg/ml proteináz K kétszer desztillált vízben). A mintákat 65°C-on melegítettük 15 percig majd 94°C-on 15 percig a PCR reakció előtt. PCR reakcióhoz a következő körülményeket használtuk: 95°C 12 perc; 35 ciklus: 94°C 1 perc, 60°C 1 perc, 72°C 2 perc; végül 72°C 7 perc. A következő primereket használtuk: *Rybp* 3'UTR PCR (nincs jelen az Rybp-/- embriókban) - primer A, 5'-GCGACATGTCAGCAGTGAATG-3', és primer B, 5'-GTGTCAAGAATAACTGTCAGGG-3'; *Rybp* 5' UTR PCR (kontroll reakció): primer A, 5'-CAAACCCTATCTCGGGTTGCA-3', primer B, 5'-

GGGTACAATGCGAGGACAGTT-3'. A PCR terméket (220 bp - 3' UTR reakció és 400 bp - the 5' UTR reakció) gélelektroforézissel analizáltuk. A nullembrók negatív reakciót adtak a 3' UTR reakcióban, de képeztek terméket az 5' UTR reakcióban.

2.3.4.4. Elektronmikroszkópia

Az elektronmikroszkópiás vizsgálathoz P1 és P21 napos szemeket izoláltunk, melyeket a szaruhártyájuknál egy finom hegyű tűvel kilyukasztottunk, majd 24 óráig Ito's fixáló oldatba tettünk. A szemeket ezután egy éjszakán át cacodylate pufferben mostuk, majd OsO_4 -dal utófixáltuk. Ezután dehidratáltuk és beágyaztuk Epon gyantába (Roth, Karlsruhe, Germany). Az így elkészített mintákból félig vékony és ultra-vékony metszeteket készítettünk. A félig-vékony szekciókat toluidin kékkel, az ultra-vékony szekciókat pedig uranil-acetáttal és ólom-citráttal festettük, majd Zeiss (Oberkochen, Germany) EM 902 elektronmikroszkóppal analizáltuk.

2.3.4.5. Kvantitatív RT-PCR

A kvantitatív PCR reakcióhoz P1 és P21 napos $TG^{ROSA26-Rybp/EGFP/+}$ (heterozigóta) vagy $TG^{ROSA26-Rybp/EGFP/ROSA26-Rybp/EGFP}$ (homozigóta); αA -crystallin/Cre egerek retinájából és szemlencséjéből totál RNS-t izoláltunk, és cDNS-t készítettünk. A PCR reakcióhoz a következő primereket használtuk: Pax6 A, (5'-gcacatgcaaacacacatga) és B, (5'-acttggacgggaactgacac); Prox1 A, (5'-gccctcaacatgcactacaa) és B, (5'-ggcattgaaaaactcccgtg); MafA A, (5'-gcacccgacttctttctgtg) és B, (5'-gcctgcgcaaactgtcc); MafB A, (5'-gcctcttagacttgggcaga) és B, (5'-cctccagcttggagaaaag); c-Maf A, (5'-gtggtggtgatggctctttt) és B, (5'-gttacgggggaattcaggtt); Rybp A, (5'-agaccagcgaaacaaaccac-3') és B, (5'-aggaggagcgcagctctttcc-3'); Crystallin $\beta A4$ (Cryba4) A, (5'-gggtttgttcccagttcct-3') és B,

(5'-acctgagtggatgctct-3'); Filensin (Bfsp1): A, (5'-cattgagattgaaggcagca-3') és B, (5'-acactggatccaaggctgag-3'); AP2 α A, (5'-gtgtcagagatgctgcgga-3') és B (5'-tgaggatggtgtccacga-3'); Integrin α -6 A, (5'-attctcctgagggtccat-3') és B, (5'-ttgagggaacaccgtcact-3'); Sox2 A, (5'-actttgtccgagaccgaga-3') és B, (5'-ctccggcaagcgtgtactta-3'); és B2M A, (5'-catacgctgcagagtaagc-3') és B, (5'-gatgcttgatcacatgtctcg-3'). A PCR reakciót 7900 HP Applied Biosystems Real Time PCR készülékkel végeztük.

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

3.1. A *rybp* gén célzott kikapcsolása a korai embrió elpusztulásához vezet

Hogy megvizsgáljuk az egér *rybp* gén fejlődésben játszott szerepét, egy mutáns allélt generáltunk gén targetált ES sejtek segítségével, amelyet aztán bevittünk egér csírasejtvonalba (germline). Röviden: az egér *rybp* gén lokuszát tartalmazó genomiális klónokat jellemeztük és kimutattuk, hogy hordozzák a 3-5 exonokat (1a ábra).

1. ábra. Az egér *rybp* gén homológ rekombinációval történő targetálása.

(A) Az egér *rybp* lokusz szerkezete (felső diagramm); a target vektor és a targetált allél a középső és alsó diagrammokon láthatók. Az exonokat téglalapok jelölik (E1-5), az üres téglalapok a nem-transzlálódó, a sátozottak pedig a kódoló régiókat jelölik. Az 1. exon kockás régiója a gén 5' nyitott leolvasási keret (open reading frame; ORF)

egér genom meg nem szekvenált, GC gazdag régióját jelöli. Az 2-es és 3-as exonok között a vonalon az áthúzás az intron nagy méretét (50 kb <) hivatott jelölni. Az 1-es exonban levő start (ATG) és az 5-ösben elhelyezkedő stop (TGA) kodonok helye jelölt, csakúgy mint a diagnosztikus XbaI restrikciós enzimé és a helyes klónok keresésére használt 5' próbáé (szürke téglalap). A vékony horizontális nyilak a tesztelésre használt primerek helyét jelölik, amelyekkel a homológ rekombinációt detektáltuk. A targetált lókuszt által kódolt fehérjetermék az 5' Rybp ORF-je (az első 58 aminosav) és az EYFP riporterje közötti fúziós termék (1D); ez a fúziós protein valószínűsíthetően az endogén lókuszt által kódolt géntermék expressziós mintázatát rekapitulálja. A "floxolt" PGK-neo kazetta (a háromszögek által határolt NEO az ábrán) szelekciós okokból szintén része a target vektornak. (B) A homológ események kimutatására szolgáló PCR reakció Southern blotja. Az „A” panelen bemutatott PCR primerek homológ rekombináció esetén egy 800 bp terméket eredményeznek. A blot az „A” panelen látható próbával (szürke téglalap) volt hibridizálva. (C) Az ES sejtekből készült teljes sejt-lizátumok immunoblot analízise: próbának anti-DEDAF; Chemicon antitestet használtunk, ami a C terminális 33 aminosavát ismeri fel. Felső panel: A vad típusú sejtekben (rybp^{+/+}) egy 38 kDa méterű fehérje termelődik, mely csökkent mennyiségben termelődik a heterozigótákban (rybp^{+/-}) és hiányzik a homozigóta mutánsokban (rybp^{-/-}). Kontrollként, ugyanabból a mintából, a 21 kDa-os Max protein (anti-Max; Santa Cruz) immunoblottja látható az alsó panelen („loading control”). (D) Az ES sejtekből készült teljes sejt-lizátumok immunoblot analízise anti-GFP antitesttel (Molecular Probes) hibridizálva. Egy 33 kDa Rybp/YFP fúziós termék detektálható a homozigóta nullsejtekben (rybp^{-/-}), ami nincs jelen a vad típusú (rybp^{+/+}) lizátumokban. Stablan transzfektált R1 ES sejtek, mint kontrollok, szintén láthatók a gélen melyekben az EYFP protein helyes mérete 27 kDa (c panel). A

targetáló vektort úgy terveztük meg, hogy egy fluoreszcens riporter fehérjét, EYFP-t, juttasson be az endogén lokuszba a 3-as exon start kódjával megegyező leolvasási keretben (in frame), valamint ezzel egyidőben a helyspecifikus rekombináció segítségével és a PGK-neo kazettát tartalmazó kazetta segítségével eltávolítsuk a 3-as exon nagy részét, illetve a teljes 4-es és 5-ös exont (lásd 1A ábra). Az eltávolított exonok olyan funkcionálisan fontos doméneket kódolnak, amelyekről előzőleg már kimutatták, hogy fontos szerepet játszanak a Rybp összes kulcsfontosságú kölcsönhatásának a közvetítésében. Így ez a régió kölcsönhat például a PRC1 komponensekkel, különböző növekedési faktorokkal, DED domént tartalmazó fehérjékkel [4, 19, 20] valamint a Rybp transzkripció szabályozásában szerepet játszó faktorokkal [4]. Két targetált rybp allélt (homozigóta mutáns) hordozó embrionális őssejt Western blot vizsgálata kimutatta, hogy ezekből a sejtekből teljesen hiányzik a 38 kD-os vad típusú Rybp fehérje, és csak a Rybp/EYFP fúziós fehérje van jelen (lásd 1C és 1D ábra). Mivel a fúziós fehérjéből hiányzik a teljes fehérjét kódoló régió 75%-a, így számos funkcionálisan fontos domén is, ezzel a targetálási lépéssel a vad típusú Rybp fehérje funkcióit megszüntettük.

Három, függetlenül targetált ES sejt vonalból generáltunk egy-egy *rybp* allélt hordozó egér ES sejt vonalat (1B ábra), valamint heterozigóta keresztezéseket (intercrosses) végeztünk. A született heterozigóta utódok külsőleg normálisak voltak, termékenynek bizonyultak és nem látszott rajtuk betegségnek nyilvánvaló jele (ez a következtetés több mint 2 éves megfigyelés eredménye). Megjegyzés: a statisztikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a született *rybp* heterozigóták száma lényegesen eltér a várt mendeli eloszlástól (nem mutatott adat); mert a heterozigóta állatok egy része egy

szemi-penetráns (csak részben átadódó) fenotípus miatt elpusztul a születés után (lásd alább).

Annak meghatározására, hogy a fejlődés mely szakaszában okoz a Rybp hiánya elhalálozást, megvizsgáltuk az egérembriókat az embrionális fejlődés különböző szakaszaiban (E7.5 - E18.5 között) (1. táblázat). Ismételten nem találtunk homozigóta mutánst, ami ismét azt bizonyította, hogy a mutáció valószínűleg még a gasztrulációt megelőzően az embrió elpusztulását okozta. A gasztruláció az embriófejlődés azon kritikus stádiuma, ahol a barázdálódáskor létrejött sejtek végleges helyükre kerülnek, kialakulnak a csíralemezek, amelyekből később megindul a szervképződés. A további vizsgálódások érdekében, heterozigóta keresztezésekből származó E3.5 napos blasztocisztákat izoláltunk, majd egyenként lefénypépeztük és PCR segítségével genotipizáltuk őket. A homozigóta *rybp* nullgenotípus kimutatható volt (1. táblázat, E3.5) és ezek a blasztociszták morfológiailag nem voltak megkülönböztethetőek a vad típusú és heterozigóta blasztocisztáktól.

1. Táblázat. A heterozigóta keresztezésekből származó utódok genotípus analízise.

1	2	3	4	5	6
Kor	Normális	Abnormális	+/+	+/-	-/-
E3.5	41	0	13(33)	22(56)	4(10)
E4.5	19	3	6(27)	13(59)	3(14)
E5.5	38	7	ND	ND	ND
E6.5	65	17 ^c	17(22)	48(62)	12(16)
E7.5	44	9R	16(36)	28(64)	0
E8.5	37	9R	15(41)	22(59)	0

1. oszlop: az embriók kora; 2. oszlop: Morfológia alapján normális kinézetű embriók száma; 3. oszlop: Morfológia alapján abnormális kinézetű embriók száma; 4. oszlop:

Genotipizált vad típusú embriók száma; 5. oszlop: Genotipizált heterozigóta mutáns embriók száma; 6. oszlop: Genotipizált homozigóta mutáns embriók száma. R: Resorbed (felszívódott) embrió. ND: Not Determined (nem meghatározott). Zárójelben a százalékos megoszlás látható. ^C: A 17 morfológiailag abnormális kinézetű embrióból 12 homozigóta, 5 pedig heterozigóta volt.

Miután sikerült kimutatni, hogy ez a mutáció az E3.5 - E7.5 közötti periódusban letális, további vizsgálatainkat erre az időszakra irányítottuk. Morfológiai vizsgálatok kimutatták, hogy az Rybp hiányos E6.5 napos embriók abnormálisak és felszívódnak mielőtt elégnék az E7.5 kort (1. táblázat).

2. ábra. A homozigóta embrionális letális fenotípus jellemzői.

Reprezentatív példák a homozigóta embriók (-/-; alsó panelek) hisztológiai abnormalitásaira és csökkent proliferációjára a kontroll, vad típusúakkal összehasonlítva (+/+; felső panelek). A transzverz szekcionálású embriók hematoxin-eozin (H&E) festése látható az “a, c, e és g” paneleken míg a proliferációs képességet jellemző anti-foszforilált H3 hiszton (p-H3)

immunohisztokémiai festése a “b, d, f és h” paneleken. A nullembriók növekedésben elmaradtak és nem proliferálnak. Az imperfekt deciduális reakció figyelemreméltó a mutáns embriók esetében (e panel; fehér nyilak). A “c” és “g” panel E6.0 napos embriók szagittális szekcióinak a H&E festését mutatja be. Ugyanezen embriók anti-DEDAF (Rybp) immunohisztokémiája a “d” és “h” paneleken látható. A reprezentatív nullembrió (a “h” panelen körberajzolva) megállt a fejlődésben és Rybp festődést ahogy várható, nem mutat.

Az E5.0-E5.5 korú embriók hisztológiai vizsgálata rámutatott arra, hogy a homozigóta mutánsok méretben és mintázatban is visszamaradtak voltak (lásd 2e ábra), amit könnyen lehetett azonosítani a Rybp immunoreaktivitás hiányával (pl. 2h és 2d panelek összehasonlítása). A mutánsokban az embrionális és extraembrionális rétegek megkülönböztethetetlenek voltak és a feltételezett epiblaszt rendezetlen volt., A vad típusú embrióknál hengerszerű, két rétegű sejtes szerkezet volt megfigyelhető az E6.0 napra nyilvánvaló embrionális és extraembrionális komponensekkel, amelyeket klasszikusan oszlopszerű viszcerális (zsigeri; visceral) endoderma vett körül (2c ábra). Ezzel ellentétben ez a hengeres szerkezet a Rybp negatív embrióknál nem volt megfigyelhető és a sejtek a feltételezett viszcerális endoderma felől nagy méretű üregekkel rendelkeztek (2g ábra). A *rybp* nullállatok esetében a poliploid óriás trofoblaszt számának csökkenése is megfigyelhető volt (nem mutatott adat). A morfológiai megfigyelésekkel összhangban, az embriók nem voltak többé megfigyelhetőek az E7.5 korra. Ebben a stádiumban nagy számú deciduális minta megvizsgálása (n<200) nagy felbontás mellett sem mutatott ki embrió maradványokat.

3.2. Proliferációs és apoptotikus defektusok a *rybp* null homozigóta egér embriókban

Hogy betekintést nyerhessünk a *rybp* null embriók fejlődési rendellenességeinek alapjaiba, először a sejtosztódást (proliferáció) és az apoptózist tanulmányoztuk foszforilált hiszton H3 (p-H3) festés és TUNEL vizsgálat segítségével (2. és 3. ábra). A vad típusú embrióktól származó, osztódásra képes, embrionális és extra-embrionális sejtekkel ellentétben, amelyeknél erős p-H3 festődést találtunk, a *rybp* null embriókból származó E5.0 korú embriók esetében p-H3 pozitív sejtek alig detektálhatóak, egy nappal később (E6.0) pedig teljesen eltűnnek (2 f ábra). Feltehetően a lassú sejtosztódás nagyban hozzájárul a fejlődés leállásához ebben a korai, peri-implantációs (beágyazódás körüli) stádiumban.

A programozott sejthalált illetően miközben intenzív, “nyakláncszerű” pozitív TUNEL jel volt detektálható a beágyazódó E6-E6.5 embriók körül, addig ez a jel alig volt észlelhető a null mutáns embrióknál.

3. ábra. Az apoptózis hiánya az *Rybp* deficiens embriókat övező deciduában.

Szagittális szekciók a mutáns (-/-; d, e, f) és kontroll (+/+; a, b, c) embriókból a

méhen belüli fejlődés hatodik napja körül (E6.0-6.5). A metszetek nukleáris marker DAPI-ra (a,d) és TUNEL reakcióval programozott sejthalálra (apoptosis; b, e) lettek megfestve. A két reakció egymásra vetítését a „merge” paneleken (c és f panelek) lehet látni. A TUNEL pozitív sejtek jelenléte nyilvánvaló a kontroll embriót övező deciduában (b) és gyakorlatilag majdnem teljesen hiányzik a mutánsokban (e). em, embrió; de, decidua epitéliuma; ue, uterin (méh) epitéliuma.

A különbség már az E5.5 stádiumban lévő embrióknál is szembetűnő. A vad típusú embrióknál megfigyelt TUNEL jel az apoptózist jelöli, amely normális körülmények között a beágyazódás folyamata alatt bekövetkezik. Először a méh endotéliuma hal el a blasztocisztából származó szignálok hatására, majd a deciduális sejtek visszahúzódása következik be a trofektoderma inváziójának hatására. Az a tény, hogy Evans Blue (Evans Kék) festék beinjektálásával deciduális duzzanatokat, valamint beágyazódási helyeket mutattunk ki, azt sugallja, hogy a mutáns embriók esetében is elkezdődik a beágyazódási folyamat. Azonban a TUNEL jel hiánya ezen embriók beágyazódási helyei körül azt mutatja, hogy a Rybp hiánya veszélyezteti a blasztociszta és/vagy trofoblaszt azon képességét, hogy előidézze a teljes decidualizációt.

Hogy még tovább vizsgáljuk a fejlődési rendellenesség természetét, heterozigóta kereszteződésből származó E3.5 blasztocisztákat *in vitro* tenyésztettünk olyan vizsgálat keretében, amely a peri-implantációs fejlődést helyettesítette. A tenyésztés 1-4 napja alatt, a blasztociszták nagy része „kibújt” a zóna pellucidából, és trofektodermális kinövésé (TE outgrowth) és osztódó belső sejtcsomóvá (ICM outgrowth) fejlődött (4. ábra).

4. ábra. Az *Rybp*-deficiens embriók nem képesek *in vitro* trofektoderma sejtvonalat létrehozni.

rybp^{+/+} (bal oldali panelek) és *rybp*^{-/-} (jobb oldali panelek) blasztocisztákat 1-4 napig (24, 48 és 72 órás időpontok láthatók) kultúrában tartottuk annak eldöntésére, hogy képesek-e mind a belső sejtcsoomóból (inner cell mas; ICM) mind pedig az extraembionális régióból (trofektoderm, TE) sejtvonalakat kinöveszteni. A vad típusú embriókkal ellentétben az *rybp*^{-/-} blasztociszták sem proliferáló ICM sem pedig TE sejtvonalat nem voltak képesek fejleszteni.

Ezzel ellentétben a tenyésztett blasztociszták egy része nem élt túl és TE-t sem hozott létre, csak egy néhány szétszórt endodermára emlékeztető sejtkinövés volt megfigyelhető. A vad típusú és mutáns blasztociszták genotípusát PCR-rel határoztuk meg, és az utóbbi csoportról kimutattuk, hogy szoros összefüggésben van a *rybp*^{-/-} genotípussal. Összesítve az *in vitro* és *in vivo* megfigyeléseinket, ezek azt sugallják, hogy az Rybp szükséges a korai beágyazódást követő fejlődéshez és Rybp hiányában a beágyazódás nem megy végbe.

3.3. Az Rybp expressziójának lokalizációja a méhen belüli fejlődés korai stádiumában

Hogy további információkat nyerjünk a Rybp korai embrionális szerepéről, megvizsgáltuk a Rybp fehérje expressziós mintázatát az embriogenezis során a Chemicon által előállított Rybp ellenanyag (anti-DEDAF) segítségével. Először is kimutattuk, hogy az Rybp detektálható a blasztocisztában és annak ES sejt leszármazottaiban (1c ábra). A beágyazódást követő fejlődéstől kezdve (E5.0 - E5.5) elszórt Rybp festődés volt megfigyelhető mind az embrionális, mind az extraembrionális részekben; az utóbbiban a festődés sokkal jellegzetesebb volt. A robosztus extraembrionális Rybp expresszió végig megmaradt a teljes embriogenezis során. Az E6.0 - E6.5 stádiumra Rybp festődés található az ektoplacentális kónuszban (EC; ectoplacental conus), az extraembrionális ektodermában (EEE), a vizcerális (VE) és parietális endodermában (PE) (a későbbi magzati extraembrionális membránok) valamint a trofoblaszt óriássejtekben (TGC) (5a és 5b ábrák, 2d ábra).

5. ábra. Az Rybp expressziós mintázata a vad típusú egér embriók az implantációt követő periódusban.

A metszeteken korai poszt-implantációs embriók Rybp expressziója látható a fejlődés különböző stádiumaiban (a, E6.0; b, E6.5; c és d, E7.5; e-h, E8.5; és i, E13.5). A barna festődés a Rybp immunofestést jelöli anti-DEDAF antitesttel. A lila szín a kontraszt-festődést mutatja, ami a metszeteken való orientációt hivatott elősegíteni (Rybp negatív területek). (a) E6.0 embrió; mozaikos festődés látható minden sejtrétegben. (b) E6.5 embrió; erős expresszió a trofoblaszt sejtekben és gyengébb az epiblasztban és viscerális endodermában. (c) E6.5 embrió; hasonló festődés mint az E6.5 embriónál a "b" panelen, kivéve hogy az újonnan megjelenő mezoderma is Rybp pozitív. (d) E7.5 embrió chorionja erősen festődik (e) E8.5 embrió chorionja és allantoisa erősen festődik (f) a magzatburok endoderma rétege erősen festődik (g) E8.5 embrió feji része erős expressziót mutat a feji mezenhimában és a záródó neuroepitéliumban (h) Intenzíven festődő trofoblaszt sejt az E8.5 napos embriót körülvevő deciduában (i) Erős festődés az E13.5 placentában, különösen annak a belső labirintus rétegében ami az allantois és chorion leszármazottja. ExE, extraembryonic ectoderm; EE, embryonic ectoderm; Tg, trophoblast giant cell; De, decidual epithelium; Ve, visceral endoderm; Me, mesoderm; Epc, ectoplacental cone; Ch, chorion; Al, allantois; Am, amnion; Ne, neuroepithelium; Hm, head (fej) mesenchyme; Fg, foregut; Lb, labyrinth layer

Ez a festési mintázat megfigyelhető volt a későbbi stádiumokban is, az említett struktúrák leszármazottaiban: chorionban (5d és 5e ábra), allantoisban (5e ábra), magzatburokban (5f ábra), és a kifejlett méhlepényben (5i ábra). Megjegyzésképpen: E6.0 naptól kezdve, a legerősebb Rybp expressziós szinttel a posztmitotikus TGC-ek rendelkeztek, amelyek a beágyazódást követően borítják be

az anyaméhet (4, 25: trofoplaszt biológiájára és a méhen belüli fejlődésre vonatkozó összefoglalás). Ami magát az embriót illeti, E6.0-E7.5 közötti időszakban, jellegzetes festődést lehetett megfigyelni néhány sejtnél, de ezeket a sejteket hisztológiailag nem lehetett besorolni egyik kategóriába sem morfológiájuk alapján (5a-5c ábra). Ez a mintázat azt sugallhatja, hogy ebben a stádiumban a Rybp expressziós mintázata sejtciklus függő. A fejlődés és szervképződés előrehaladtával alacsony Rybp szint volt megfigyelhető az embrió szöveteinek egy részében, majd időben előrehaladva, a fejlődés bizonyos szakaszaiban sejt/szövet specifikus Rybp upreguláció figyelhető meg (pl: neuronok, a mezenhimális és endoteliális sejtekben) (pl. 5g ábra, nem közölt adat, [4]). A fent említett genotípussal együtt ez az expressziós mintázat megegyezik azzal az elképzeléssel, hogy a beágyazódási folyamat bekövetkeztének ideje körül a Rybp nélkülözhetetlen az extraembrionális szövetek normális fejlődéséhez/működéséhez és valószínűleg az embrió számára is.

3.4. Rybp szintjének csökkenése befolyásolja a központi idegrendszer normális fejlődését

Annak érdekében, hogy a Rybp hiányos (deficiens) sejtek fejlődési képességét tanulmányozni tudjuk, kiméra állatokat hoztunk létre. A targetált homozigóta sejteket (*rybp*^{-/-}) vad típusú (*rybp*^{+/+}) blasztocisztákba injektáltuk, hogy kiméra embriókat nyerjünk. Ezekben a kimérákban, az epiblasztot heterogén sejtpopuláció alkotja (*rybp*^{+/+} és *rybp*^{-/-} sejtek), míg a primitív endoderma és trofektoderma a vad típusú gazda blasztocisztából származnak [21]. Az embrió saját mutáns sejtjei is megkülönböztethetőek a vad típusúaktól a bevitt EYFP riporter fehérje segítségével, amely sárgán fluoreszkál a mutáns sejtekben.

A kiméra embriókat hordozó nőtényeket a terhesség különböző stádiumában (a terhesség E8.0 napjától az E13.5.) disszekáltuk és mintegy 50 embriót vizsgáltunk meg morfológiailag és fluoreszcens mikroszkóppal.

6. ábra. Az Rybp normális szint alá csökkenése CNS fejlődési rendellenességeket okoz.

(a-h) Rendellenességek a $rybp^{-/-}$ $\leftrightarrow$ $rybp^{+/+}$ kiméra embriókban. Poszterior nézetű fény (a) és fluoreszcens (b) mikroszkópos felvételek E8.5 kiméra embriókról. A „b”

panelen látható fluoreszcens sejtek $rybp^{-/-}$ ES sejtekből erednek. Megjegyzés: a $rybp^{-/-}$ ES sejtek csak kis mértékben képesek hozzájárulni az embriók fejlődéséhez. Nagyobb arányú hozzájárulás letalitást okoz. (c, d) Fénymikroszkópos nézete egy kontroll (c) és egy kiméra (d) E11.5 embriónak. A kiméra agya súlyos morfológiai elváltozásokat és erős túlbujárást mutat. (e-h) Koronális hisztopatológiai metszetek kontroll (e, g) és kiméra (f, h) embriók feji régiójából. Megjegyzés: kaotikus túlnövés, sztenózis, hemorrágia az előagyban és nyitott velőcső részek (nyíl a "h" panelen) jellemzik a kiméra embriókat. (i-p) Rendellenességek a $rybp^{+/-}$ heterozigóta (k, o) embriókban a kontrollokkal (i, m) összehasonlítva: nyitott velőcső fenotípus. (i, k) E16.5 embriók. (m, o) E10.5 embriók. A j, l, n, és p panelek a következő embriók megfelelői: j, embrió i; l, embrió k; n, embrió m; p, embrió o; (j,l), szagittális metszet. (n,p) koronális metszet. Megjegyzés: Struktúrális diszorganizáció, ventrikuláris sztenózis (fekete nyíl "j" és "l" paneleken) és a kisagy teljes hiánya (fehér nyíl "j" és "l" paneleken) látható az agyi régióknál a heterozigótákban. A nyitott velőcső defektus nyilvánvaló fenotípus a „p” panelen látható heterozigótánál (nyilak; összehasonlítva a kontroll „n” embrió metszettel).

A homozigóta mutáns sejtek csak csekély mértékben voltak képesek az embriók fejlődéséhez hozzájárulni, a homozigóta nullsejtek főleg a végtagokon és kötőszövetekben jelentek meg nagyobb számban (6b ábra), amelyet a disszociált embriók áramlásos citométeres és sejtválogatás (FACS) vizsgálatai is alátámasztottak: átlagosan 12% YFP pozitív sejt volt detektálható egy-egy embrióban (nem mutatott adatok). Ezek az adatok és az a tény, hogy egy jelentős számú (körülbelül 50%) korai rezorpció (az embriók korai "felszívódása") volt megfigyelhető a terhes deciduán, azt sugallják, hogy a nagyszámú deficiens ES sejt jelenléte nem összeegyeztethető az embrionális túléléssel.

További érdekes megfigyelés, hogy a terhesség középső szakaszától a kiméra embriók jelentős részénél (E9.5-től amikor is a neurulatio neuroláció (az idegrendszer telepének elkülönülése az ektodermától) befejeződik és kialakul az agy) a központi idegrendszer hibás formációja volt megfigyelhető (6d és 6c összehasonlítása). Az E11.5 - E13.5 kiméra szekciók szövettani vizsgálata feji (cephalic) rendellenességeket mutatott ki, mint pl.: szerkezeti rendezetlenség és konvolúció, masszív hiperplázia, ektopikus neurális szerkezetek. Ezek a rendellenességek a legtöbbször az előagyban találhatók, míg a tel- és dienkefalikus régiók differenciálódása bekövetkezett, noha mindkét régióra jellemző volt a rendezetlen túlnövés és betüremkedés, valamint az összezsugorodott kamrák (ventriculumok) (reprezentatív a 6f és 6e panelek összehasonlítása). Az előagyban és a hídban ugyancsak megfigyelhetőek voltak olyan területek, ahol a velőlemezek velőcsővé nem, vagy részlegesen záródtak. Ez a jelenség szokatlan módon együttjárt a felszint borító ektodermális réteg fúziójával (6h és 6g ábrák). Ennek magyarázatát jelenleg nem tudjuk.

Az a megfigyelés, hogy a kiméra állatokban a központi idegrendszer károsult, azt tükrözi, hogy a központi idegrendszer normális fejlődéséhez szükség van a Rybp expressziós mintázatának térbeni és időbeni összehangolására. Ezt az elméletet látszik alátámasztani az a megfigyelés is, hogy a Rybp heterozigótáknak egy része (körülbelül 15%) elpusztul NTD (neural tube defect) következtében a születes környékén (perinatal) mindhárom független sejvonalon (6k és j ábrák összehasonlítása). A heterozigóták korábbi fejlődési stádiumokból való analízise (E9.5-10.5) kimutatta, hogy az enkefália a velőcső („neural tube”) inkorrekt záródása következtében és nem egyéb okokból, mint pl. a koponyacsont helytelen záródása miatt alakul ki (6o és p panelek összehasonlítása 6m és n panelekkel). A velőcső záródása normál esetben (vad típusú állatban) az embrionális fejlődés 8.5 napjánál az

előagy hátsó, kaudális részénél kezdődik (E8.5) majd fokozatosan terjed át az elülső (anterior) agyi régiókra és egy napon belül befejeződik (E9.5) (3,12). Az, hogy a Rybp heterozigóták egy részében ez a folyamat inkomplett és még a tizedik napon (E10.5) is nyitva van a velőcső azt sugallja, hogy a velőcsőzáródás folyamata érzékeny a Rybp mennyiségére (Rybp dóziszfüggő).

3.5. A Rybp fehérje immunolokalizációja a fejlődő CNS-ben

Annak vizsgálatára, hogy betekintést nyerjünk a Rybp CNS fejlődésben betöltött szerepére elsőként annak expresszióját vizsgáltuk meg immunohisztokémiai módszerekkel egér embriókban (7. ábra).

7. ábra. A Rybp expressziós mintázata a vad típusú egér embriók központi idegrendszerében.

Reprezentatív metszetek az erős Rybp festődést mutató agyi régiókból különböző embrionális fejlődési stádiumokból. A barna festődés a Rybp expressziót jelöli. A metszetek "a-d és "j" paneleken hematoxilin-eozinnal (H&E) is kontraszt-festettek. (a) Nagy nagyítású felvétel egy E8.5 napos kontroll embrió neuroepitéliumáról. A jobb alsó sarokban (és az 5. ábrán is) ugyanazon embrió kis nagyítású képe látható. A nyíl a „median hinge point”-ra mutat (a) ami az összezáródó velőcső közepén található) és Rybp expressziót is jelöl egyben. (b) E10.5 embrió neopalliuma. A nyilak az erős Rybp expresszió helyét jelölik a legkülső sejtrétegekben. (c) E10.0 embrió ventrális diencephalonja (köztiagy) (nyíl), alatta a Rathke's pouch (Rathke-tasak) (d) E10.0 embrió rhombencephalon-hólyag isthmusa (e-i) Sztratifikált Rybp festődés a fejlődő neocortex rétegeiben. (e,f) Hematoxilin-eozin (H&E) és anti-DEDAF festése az E11.5 neocortexnek. Megjegyzés: a ventrikuláris régió (V) negatív, a preplate (PP) pedig pozitív Rybp-re. (g-i) H&E és anti-DEDAF festése az E16.5 neocortexnek. Megjegyzés: a ventrikuláris régió (V) negatív, a preplateból származó cortical plate (Cp) és marginal zóna (M) pedig pozitív Rybp-re. A külső ventrikuláris/szubventrikuláris zóna határa szintén pozitív. V, ventricular zone; Sv, subventricular zone; I, intermediate zone; PP, preplate; Cp, cortical plate; M, marginal layer; S, skin. (j) Erős specifikus festődés újszülött egér gyrus dentatus-ában (a hippocampus része). (k) E16.5 embrió gerincvelejéből származó neuroblastok pozitívan festődnek Rybp-re. (l) E11.5 embrió szaglóhámja: erőteljes Rybp festődés az epitéliumban.

E8.5 időpontnál a pszeudosztratifikált neuroepiteliális sejtekben mérsékelt Rybp festődés látható. Különösen a neurális plate bizonyos régióiban, az úgynevezett

„median hinge point” sejtjeiben mutat specifikusan erősebb festődést (7a és 5g ábrák). E10.5 napra az előági régió (di-és telenkefalon) neuroblasztjaiban, az isthmusban (a középagy és rhombencephalon közötti rész melyből később a hidak, medulla oblongata és kisagy fejlődnek ki) és a dorzális hídi régiókban (7d panel) is kifejezett festődést mutat. Ez összhangban van egy, már korábbi tanulmányban megfigyelttel [4], mi szerint Rybp mRNS-t mutattak ki a CNS bizonyos régióiban. E11.5-től kezdődően a kialakuló nagykéreg (cerebral cortex; előbb „preplate”) külső, posztmitotikus neuronokat tartalmazó rétegét jelöli, míg a ventrikuláris, proliferatív zóna sejtjei konzekvensen negatívan festődnek (7e panel). Ez a tendencia E16.5-nál is fennáll, ahol a külső, marginális zóna neuronjai (a preplate derivatívjai) mutatják a legerősebb festődést. Ezzel egyidőben a belsőbb rétegben egy vékony sávban közvetlenül a ventrikuláris zóna felett is látható egy halványabb festődés (7g-i panelek) [22]. Erős és specifikus festődést mutattak továbbá a gyrus dentatus (dentate gyrus) sejtjei a hippocampusnál (7i panel), a periferiális és kraniális ideg gangliumai, a feji régió mezenchimális szövetei, a gerincvelő (7k panel) és a szaglóhám sejtjei (7l panel). Összességében ezek az adatok azt támasztják alá, hogy a Rybp gén specifikus, disztinktív upregulációt mutat a CNS specifikus régióiban, illetve sejttypusaiban és a nagykéreg fejlődése folyamán az érett neuronok kialakításában. Fontos megemlíteni hogy a rokon Yaf2, legalábbis részben, átfedő expressziós mintázatot mutat [10]. Ez a részben átfedő expressziós mintázat a Rybp és Yaf2 között azonban nyilvánvalóan nem elégséges a heterozigóta és kiméra állatokban Rybp hiány következtében kialakult defektusok kompenzálására (6. ábra).

Az eredmények azt mutatták, hogy a Rybp gén megnyilvánulása fontos az egér központi idegrendszerének kialakításában. A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy vajon egyéb szervek is érintettek-e a Rybp mutáció által, különös tekintettel a közös

fejlődési eredettel bíró, primitív ektodermából kialakult szervekre. Mivel nemcsak az agy, hanem a szemlencse és retina is ektodermális eredetű, így elsőként megvizsgáltuk a Rybp expresszióját a szem embrionális fejlődése folyamán (8. ábra).

8. ábra: A Rybp expressziós mintázata a szemben vad típusú egér embriók pre-natális fejlődése során.

(A-H) Szagittális metszetek Rybp festődése (barna) E10.5 (A), E11.5 (B) és E16.5 (C-H) időintervallumokban. A metszetek hematoxilinnal is kontraszt-festettek az “a-h” panelekben. Nagyobb felbontású felvételek a “C” panel megfelelő régióiról az “E-H” paneleken láthatók. (I-L) A Rybp festődés felerősödését mutatják a neuroretináról készült felvételek E10.5 (I), E11.5 (J), E13.5 (K) és E18.5 (L). C; szaruhártya, E;

embrionális, GCL; ganglion sejtréteg, INL; inner nuclear layer, L; lencse, NR; neuroretina, ON; látóideg, PM; periocularis mezenhima, SE; surface ectoderm (felszíni ektoderma), OC; optic cup. Nagyítások: A (×460); B(×320); C(×250); D(×800); E-H(×400); I(×630); J(×460), K(×320); L(×250).

A szem úgy fejlődik, hogy az agyból mindkét oldalt egy-egy “hólyag” (“vesicle”) nő ki. A hólyagból lesz a szem ideghártyája, míg a szemhólyagot az aggyal összekötő kocsány látóideggé alakul át. A szemlencse a bőrhám átalakulása útján keletkezik és így kerül a betüremlett szemhólyag legkülsőbb része belülré. Egerekben a szem fejlődése embrionális korban a kilencedik napon kezdődik (E9.0). Erős Rybp festődést először E10.5-nél láttunk, amikor is Rybp festődés a betüremkedő lencseplacodot (lens placode) körülvevő felszíni hámréteget („surface ectoderm”; SE) jelöli (8A panel). Szintén festődés volt látható közvetlenül a SE alatt a szem körüli mezenhimában (periocular mesenchyme; POME) és a kialakuló szemkehelyben vagy szemserlegben (optic cup; OC, 8A panel). Az E11.5 naptól látható volt mind a szemhólyagok (lens vesicle; Lv) elülső részének sejtjeiben, mind a meghosszabbodó elsődleges szemrostok (elongating primary lens fiber; PLF) sejtmagjában és a hyaloid plexusban (8B panel), ami később a szem vérellátását adja. A fejlődés előrehaladtával az Rybp fehérje végig perzisztens festődést mutatott a hyaloid üreg sejtjeiben és a SE-ban (8C panel). E14.5 és E16.5 napok között erős festődés látható a másodlagos lencse rostok sejtmagjában (secondary lens fiber; SLF (E16.5 8C, E panelek)) és a a neuroretina ventrális részében (E16.5 8C, F panelek). E16.5 napnál szintén detektálható a lencse epitéliumban (1C, G panelek).

A szaruhártyában is erősen festődő részek voltak kivehetőek, amely a korneális epitélium és néhány sejt a sztómában (8G panelek) voltak. Nem egyenletes

gyenge festődés volt látható a szemideg rostjaiban (optic nerve; ON) és erősebb a szemet körülvevő mezenhimális szövetekben (8H panel). A legmarkánsabb változás, hogy a korai stádiumokban a még differenciálatlan sejtekben gyenge festődés, míg az embriogenezis és a differenciáció előrehaladtával egyre erősebb festődés detektálható. Ez különösen szembetűnő a retina esetében, ahol időben és térben egyre több réteg alakul ki differenciálódott sejtekkel, mint például a ganglion (GGL) vagy a belső nukleáris (inner nuclear; INL) és fotoreceptor réteg (8I-L).

A szem embrionális expressziós mintázatának analízise után meghatároztuk a születés utáni szem expressziós mintázatát is.

9. ábra: A *Rybp* expressziós mintázata a szemben vad típusú egér embriók poszt-natális fejlődése során.

A szemről készült szagittális metszetek a látóideg (optic nerve; ON) magasságában készültek a születés utáni második (P2; A, C, E, G, H), és huszonegyedik (P21 B, D, és F) napokon. (A, B) retina, (C, D) lencse, cornea (E, F), connectiva (G) and optic nerve (H). C; cornea, Ep; corneal epitélium, GCL; ganglion cell layer, INL; inner

nuclear layer, L; lencse, LE; lencse epitélium, ON; látóideg (optic nerve), PLF primary lens fiber cells, T; tranzíciós zóna P; postnatal day (születés utáni).
Nagyítás: (320×)

Kettő (Postnatal; P2 2A, C, E, G panelek) és huszonegy (P21; P2 2B, D panelek) nappal a születést követően intenzív festődés látható a GGL és differenciálódó INL-ekben, specifikusan annak dorzális részén, ahol a bipoláris és horizontális sejtek képződnek (9B panel). Kifejezett festődés volt megfigyelhető a korai PLF fejlődés stádiumában (9B panel). A már érettebb lencsében a festődés nem volt többé látható sem a PLF-ben sem pedig a lencse epitéliumában (9C, D panelek). Ezzel szemben erős Rybp expressziót észleltünk a tranzíciós zónában, ahol a SLF sejtek fejlődése megy végbe (9C, D panelek). P2 napon gyakorlatilag az összes Ep sejt pozitivitást mutatott és sporadikus festődés volt megfigyelhető az Ep-ban, sztrómában és bazális membránban (9E panel). A huszonegyedik napra (P21) már nem volt megfigyelhető festődés, noha az Ep-ban még gyengén expresszáldott (9F panel). Végezetül erős expresszió volt megfigyelhető a születés utáni stádiumokban a kötőszövetekben (connectiva) és egyenletes festődést mutatott az ON környezetében (9H panel). A Rybp dinamikus sejt-típus függő expressziós mintázata felveti annak a lehetőségét, hogy a génnek meghatározott és specifikus funkciói vannak bizonyos sejttypusok kialakulásában és fenntartásában a szem fejlődése során.

3.6. Az *rybp*^{+/-} embriók egy része szem fejlődési rendellenességeket mutat

Az *rybp*^{+/-} embriók egy csoportja kolobómában (coloboma) szenved: Előzőleg már kimutattuk, hogy a *rybp* heterozigóta nullembrióknak egy része agyi fejlődési rendellenességben szenved, mely magába foglalja az előagy megnövekedését és enkefáliát [23]. Mivel a retina az előagyból fejlődik ki, a következőkben azt

vizsgáltuk, hogy ezeknél az állatoknál milyen valószínűséggel jelenik meg abnormalitás a szemfejlődésben. Az exencephaly-ban szenvedő *rybp*^{+/-} egerek különböző fejlődési szakaszokban (E12.5-től születésük utánig) történő vizsgálata során azt kaptuk, hogy az egerek 32%-nál (19-ből 6) figyelhető meg retina/latóideg kolobóma (10A és 11B ábrák összehasonlítása).

10. ábra: Kolobóma az *rybp*^{+/-} egér embriókban.

(A,B) Vad típusú (A) és *rybp*^{+/-} heterozigóta (B) szemek hematoxylin és eozin festett koronális szekciója E1.5 napos korban. A mutáns szem neuroretinája erősen megvastagodott és nem záródott össze, ami kolobóma kialakulásához vezetett (B; nyílfej). (C,D) Pax6 immunofestés a vad típusú (C) és mutáns (D) szemeken. Normális esetben a Pax6 a neuroretina ventrális oldalán expresszálódik. Azon kívül, hogy a mutánsokban expressziója a ventrális oldalra korlátozódik, a lencse tranzíciós zónájában is eltolódik posterior irányba (C és D összehasonlítása). (E, F) Pax2 immunofestés a vad típusú (E) és mutáns (G) szemben. L; lens, NR; neuroretina, ON; optic nerve, V; ventral, T; transi- tional zone. HE; hematoxylin és eozin. Nagyítások: A- D(×320); E-F(×460)

Az ilyen kolobómákat az esetek nagy többségében az optic fissure inkomplett bezáródása okozza, ez a folyamat normál körülmények között az E13.5 korra bekövetkezik [24]. Mind egyoldali, mind kétoldali *rybp*^{+/-} kolobómák megfigyelhetők voltak. Ráadásul a *rybp*^{+/-} szemek megvastagodott neuroretinával rendelkeztek a szemlencse ventrálsan rotált és a szemlencsében rosszul helyezkedett el (10B ábra összehasonlítva a 10A-val). A látóideg szintén gyakran visszafejlődött (10F). A kolobómák kifejlődésének egyik lehetséges magyarázata az, hogy a mutáns retinákban az alacsony Rybp fehérje szint a különböző reguláló fehérjék, mint Pax6 [25] és Pax2 [24, 26] normális eloszlását is befolyásolja. Mindkét fehérjéről, a Pax6-ról és a Pax2-ről is kimutatták, hogy nélkülözhetetlenek az szemserlegnyél-hasadék (optic fissure) megfelelő bezáródásához (“master-regulátor”). Ennek megfelelően vizsgáltuk, hogy az *rybp* mutáns szemekben megváltozott-e a Pax6 és Pax2 immunolokalizációja. Normális körülmények között a Pax6 fehérje a retina ventrális felében helyezkedik el és a vad típusú állatok esetében az E12.0 korra teljesen eltűnik

a fejlődő látóidegből [27]. Az *rybp* mutáns embriókban azonban a Pax6 festődés szétterjedt a retina teljes vastagságában (10C, D). Ezzel ellentétben a másik “master-regulátor” Pax2 transzkripciós faktor szintje nem változott a mutáns szemekben (10E és 10F ábrák összehasonlítása).

A neuroprogenitor és a postmitotikus neuronális sejtek közötti megfelelő arány fontos a helyes retina-fejlődéshez és ennek a morfogenezis folyamatnak a felborulása okozhatja a kolobómák kialakulását [28]. Ennek megfelelően vizsgáltuk, hogy vajon a mutáns retinákban (amelyben a kolobóma fenotípus megjelenik) változik-e a korai és késői neuronok aránya. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a prenatális mutáns retinában, a specifikus neuronális sejtmarkerek expressziós mintázata azonos volt a kontroll egerek retinájában megfigyelt markerekével.

11. ábra: A progenitor előalakok sorsa nem változott a *rybp*^{+/-} mutáns szemekben.

Vad típusú (A, C, E) és rybp heterozigóta (B, D, F) szemekből készült koronális szekciók. A mutáns szemek (B, D, F) kolobóma fenotípust mutatnak. (A,B) TUJ1 festés; (C,D) NeuN festés; (E,F) nestin festés. A korai neurális sejteket (precursor) jelölő nestin, a későbbi de már érettebb neuronokat jelölő TUJ1 (pl. GGL) és a poszt-mitotikus neuronokat jelölő NeuN markerek hasonló mintázatot mutatnak a mutáns és vad típusú neuroretinában. L; lens, NR; neuroretina, Nagyítás: (×460)

Ezek a markerek: Tuj1 (a korai neurális sejteket jellemzi; 11A, 11B ábrák), NeuN (postmitotikus, kései neuronokra jellemző, 11C, 11D ábrák) és nestin (neurális progenitor sejtekre jellemző; 11E, 11F ábrák). A neurális markerek látszólagos normális eloszlása arra enged következtetni, az rybp mutáns retinában a neurális sejt differenciáció nem érintett, és nem is az optic fissure bezáródás elmaradásának egyenes oka.

3.7. A $rybp^{-/-}$ <-> $rybp^{+/+}$ kiméra embriók változatos szemfejlődési rendellenességeket mutatnak

Az $rybp^{-/-}$ egerek korai embrionális letalitása megakadályozza a gén organogenezisben, így a szem fejlődésében betöltött szerepének vizsgálatát is. Mivel lehetőség volt kiméra embriók (n=90) létrehozására (anyag és módszer fejezet), ezért módunkban állt a szem hisztopatológiai analízisének elvégzése kiméra állatokon. Mint fentebb részletesen leírtuk a kiméra embriók 20%-a mutatott fejlődési rendellenességeket, melyek túlnyomó többsége az előagyi régiókra korlátozódott.

12. ábra: Változatos defektusok figyelhetők meg a $rybp^{-/-} \leftrightarrow rybp^{+/+}$ kimerá embriók szemében.

(A,B) E13.5 napos whole-mount vad típusú (A) és $rybp^{-/-} \leftrightarrow rybp^{+/+}$ kimerikus szemek (B) általános morfológiája. A vad típusú szem szimmetrikus, míg a kimerá állatok szemében a chorioid fissure (chorioid hasadék) nyitott (kolobóma) (B; nyílfej).

(C, F) E13.5 napos vad típusú (C, E) és kimerikus (D, F) embriók koronális szekciói. Nagyobb felbontású felvételek a “C, D” panelek megfelelő régióiról az “E-F” paneleken láthatók. A kimerikus embriókban a szemek rendellenesen rotáltak, a lencse fejlődése elmaradott és a retina asszimmetrikusan megvastagodott (F; nyílfej). (G, H) E13.5 napos embriónál a mutánsokban (H) hiányzik egy sejtréteg a SE és a LE között, ami a vad típusú szemekben (G) jelen van. A mutánsokban a LE keverve van a SE-vel és mezenhimával (H; fekete nyílfej). H; hyaloid cavity, L; lencse, LE; lencse epitélium, NR; neuroretina, SE; surface ectoderm. Nagyítások: A-B (×120); C-D (×60); E-F (160×); G-H (×400)

Ezen embriók hisztopatológiai analízise kimutatta, hogy 50%-uk szemfejlődési rendelleneségeket is mutat, köztük renitális kolobómát (12A, B ábrák) és különböző defektusokat a szemlencse formálásában (12D ábra összehasonlítása 5C-vel; 5F ábra összehasonlítása 12E-vel). Ezen felül egy E13.5 napos embrióban az Ep és SE közötti szeparáció imkomplett volt (12H ábra összehasonlítása 12G-vel). Ezek a megfigyelések szintén alátámasztják, hogy a normális lencse és retina kialakulása a Rybp dózistól függő fejlődési folyamat.

3.8. Az Rybp túltermeltetése szemlencse, retina és szaruhártya fejlődési rendellenességekhez vezet

Az Rybp overexpressziója szemlencse, retina és szaruhártya károsodást okoz. A következő lépésben egy kondicionált ektopikus overexpressziós stratégiát [16] alkalmaztunk annak érdekében, hogy tanulmányozni tudjuk a Rybp túltermelésének hatását a szemlencsében. Első lépésben bevittünk egy indukálható EGFP fúziós fehérje gént az egér genomba ($Tg^{ROSA26-RYBP/EGFP/+}$ egér; 13A ábra).

13. ábra: Szemlencse specifikus vagy általános módon expresszáldó RYBP/EGFP fúziós fehérje.

(A) Vázlat, amely bemutatja a Cre rekombinázt-mediált kondicionált ektopikus Rybp allélek létrehozásához használt stratégiát, amelyben a ROSA26 lókuszt targetáltuk. A Southern blot-hoz használt hibridizációs próba és a használt EcoRV restrikciós enzim (nyíl) is fel van tüntetve, amelyet a homológ integránsok detektálásának kimutatására használtunk. A használt 5' próba egy 11 kb vad típusú és egy 3,8 kb targetált fragmentumot detektál egy többlet EcoRV felismerő hely létezése miatt a targetált allélekben. Az exonokat a nem satírozott kockák jelölik: Cre: Cre rekombinázt; EGFP enhanced green fluorescens protein; Neo: neomicin foszfotransferáz. (B) A Cre rekombinázzal kezelt sejtek lizátumának Western blot analízise, amely a Rybp/EGFP fúziós fehérje expresszióját mutatja. I-es oszlop: ROSA26 knock -in ES sejt vonal lizátum, Cre kezelés előtt (-Cre); II-es oszlop: ROSA26 knock -in ES sejt vonal lizátum, Cre kezelés után (+Cre); III-as oszlop: Rybp-Flag konstrukcióval transzfektált ES sejtekből nyert lizátum, mint pozitív kontroll. A membránokat Rybp

ellenanyaggal jelöltük. (c) Ektopikusan kifejezett Rybp kötődik a Ring1A fehérjéhez. I-II oszlop transzfektált ES sejt-lizátumok, amelyeket Flag ellenanyaggal blottoltunk ami azt mutatja, hogy mind a Ring1A-Flag (I. oszlop) mind a MafI-Flag (II. oszlop) erősen expresszálódnak a transzfektált sejtekben; I. oszlop: Ring1A-flag konstrukcióval transzfektált sejtek; II.: oszlop MafI-Flag konstrukcióval transzfektált sejtek. III-IV oszlopok: Sejtek Ring1A-Flag-gel (III. oszlop) vagy MafI-Flag-gel transzfektált sejtek lizátumai, amiket aztán Rybp ellenanyaggal immunoprecipitáltunk, majd Flag ellenanyaggal blottoltunk. A III. oszlop mutatja, hogy az 57 kDa méretű Ring1A-Flag fúziós fehérje a Rybp/EGFP fehérjéhez kapcsolódik. MafI nem kötődik a Rybp-hez (IV. oszlop). (D) P1 szemek, amiket a dupla transzgénekből (ROSA26-RYBP/EGFP; alphaA-crystallin/Cre egere) valamint a vad típusú egerekből izoláltunk fluoreszcens mikroszkópos vizsgálattal. (E) Szemlencse specifikus overexpresszált RYBP/EGFP újszülött (P2) egerek szemlencséjében. GFP immunohisztokémiai festés mutatja a TG túltermelését.

Fehérjét vontunk ki a targetált ES sejt vonalakból ($Tg^{ROSA26-RYBP/EGFP/+}$ sejt vonal) Cre indukció előtt és után ($Tg^{ROSA26-RYBP/EGFP/+;Cre}$ sejt vonal) és a várt 66 kD molekulásúlyú Rybp/EGFP fúziós fehérjét detektáltuk (13B ábra). Ahhoz, hogy bebizonyítsuk, hogy a fúziós fehérje működőképes, és hogy kötődik a már korábban kimutatott Ring1A fehérjéhez [4], a kivágott sejt vonalakat (ROSA26-RYBP/EGFP, Cre sejt vonalak) tranziensen transzfektáltuk Flag taggal Ring1A fehérjével, majd a sejt-lizátumot RYBP vagy GFP ellenanyaggal immunoprecipitáltuk és Flag ellenanyaggal blottoltuk. Ahogy vártuk, a RYBP/EGFP fúziós fehérje a Ring1A fehérjével *in vivo* detektálható (13C ábra).

A $Tg^{ROSA26-RYBP/EGFP/+}$ egereket két különböző riporter egér vonallal

kereszteltük, és a fúziós fehérje expresszióját fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Szemlencse-specifikus expresszió volt látható a ROSA26-RYBP/EGFP; alphaA crystallin/cre dupla transzgenéknél (13D ábra) és egy általános expresszió a ROSA26+RYBP/EGFP; betaActin/Cre dupla transzgenéknél (13F ábra). A $Tg^{ROSA26-RYBP/EGFP; \alpha A \text{ crystallin/cre}}$ egerek aberrált lencse morfológiáját a 14. ábra mutatja. Noha a P2 embrionális szemlencse csak nagyon finom elváltozásokat mutat a rost sejtek morfológiájában (14A-B ábrák), az idősebb egerek szemlencséjében komoly opacitás fejlődött ki, amely a szemlencse rostok tömegének összeomlásához vezetett (14C-D ábra).

$Tg^{ROSA26-RYBP/EGFP; \beta \text{Actin/cre}}$ egerek szemeit vizsgáltuk embrionális korban (E16.5; E18.5), születés után (P1-P4, P7, P14 és P21) valamint felnőtt korban (2, 3 és 6 hónapos korban) (8. ábra és nem mutatott adat). Az állatok minden sejtjében expresszáldó RYBP/EGFP számos szemszövet károsodásának a kifejlődését eredményezte.

14. ábra. Rendellenes szemlencsefejlődés a szemlencse-specifikus rybp transzgenikus egérben.

(A-D) Hisztológiai kép a vad típusú (A, C) és a $Tg^{ROSA26-RYBP/EGFP;\alpha A \text{ crystallin}/cre}$ (B, D) egerek szemlencsájéről, korai (P2) (A, B) és késői (3 hónap) (B, D) fejlődési stádiumban. A transzgenikus szemek kortikális inhomogenitást mutatnak, ami szürkehályog képződésnek és rendellenes szemlencsefejlődésnek a jele. A felnőtt (3 hónap) transzgenikus egerek szeme előrehaladott szürkehályog morfológiát mutat. (D). CA; cataract/szürkehályog, L; lencse, LE; lencse epithelium, T; tranzíciós zóna, TG; transzgenikus, Vt; vad típus; P; postnatal. Nagyítás: A-B ($\times 160$); C-D ($\times 250$); E-F ($\times 120$)

A leggyakoribb fenotípus a szaruhártya neovaszkuarizációja (az egerek 35%-a) (15C-D ábrák összehasonlítása 8A-B) volt.

15. ábra. Rybp transzgenikus egerekben a szaruhártya neovaszkuarizációja és a retina rendellenes fejlődése figyelhető meg.

(A-F) Felnőtt (2 hónapos) $Tg^{ROSA26-RYBP/EGFP;\beta Actin}/cre$ egerek szaruhártyáján megfigyelhető neovaszkuarizáció. Vad típusú (A, B) és transzgenikus (C, D) egerek szemének szagittális irányú metszetei, hematoxylinnal és eozinnal festve; a panel B és D a panel A és C téglalappal jelölt, kinagyított részeit ábrázolják. A transzgenikus egér sztrómájában megjelenő erek (nyíl a panel D-ben) jelzik a szaruhártya

neovaszkularizációját. A transzgenikus egerek epitéliuma is rendezetlen (D, üres nyíl). (E-F) elektronmikroszkópiás felvétel, mely 3 hetes transzgenikus (Tg) és vad típusú (Vt) állatokban mutatja a szaruhártya sztrómát a szaruhártya epitélium mellett. Míg a Vt egér sztrómája nem tartalmaz ereket, egy kapillárist látunk a Tg egér szaruhártya epitéliuma közelében. (G, H) Az újszülött Tg^{ROSA26-RYBP/EGFP;betaActin/cre} egér retinája rendellenes fejlődést és coloboma képződést mutat (H) összehasonlítva a Vt kontrollal (G). C; cornea/szaruhártya, Col; coloboma, E; epithelium, Ep; corneal epithelium; L; lencse, NR; neuroretina, vt; vad típus, S; sztróma, TG; Transzgenikus. Nagyítás: A, C (×200); B, D (×460); G-H (×160)

Ezek a szerkezeti változások születés után (P7-21) láthatóak voltak, és a sztrómális rétegek vastagodásával a fenotípus fokozatosan súlyosbodott. Amikor hemizigóta egereket párosítottunk annak érdekében, hogy az RYBP/EGFP transzgénre homozigóta állatokat nyerjünk (erősebb Tg overexpresszió), a fenotípus penetrációja 80%-ra nőtt. Ez alátámasztja, hogy a Rybp dózisa fontos a szem fejlődése folyamán is. A születés utáni első 3 hétben (P1-P21) kis véredényeket lehetett megfigyelni a szaruhátyán fénymikroszkóppal, ami 2-4 hónappal a születés után már a szaruhártya nagymértékű neovaszkularizációjához vezetett. Elektronmikroszkópikus vizsgálatok kimutatták, hogy a kapillárisok már jelen vannak a születés pillanatában is a transzgenikus szaruhártyákban (15E, F). Ezt a megfigyelést még inkább alátámasztották a CD34 ellenanyaggal végzett immunfestések. A CD34 ellenanyag az újonnan kialakult véredényeket jelöli (nem mutatott adat). A neovaszkularizáció mellett más szem fenotípusok is előfordultak. Ezek a retina részleges záródása (kolobóma), elülső szem fejlődésének defektusa (az üvegtest és az elülső csarnok hiánya) és a szemlencse elhomályosodásai (szürkehályog) voltak, amely a felnőttkor

későbbi időszakaszaiban alakul ki (15G, H). Összefoglalva, kifejlesztettünk transzgenikus egér modelleket, amelyekben a Rybp gén termékének fiziológias szint feletti (patológias) jelenléte a szemlencsében a szemlencse izomrostok differenciációját meggátolta, általános expressziója pedig a szaruhártya neovaszkuarizációját okozta, valamint az elülső szem fejlődésének a meghibásodásához vezetett. Ezek a modellek azt sugallják, hogy a normális szemfejlődés érzékeny a megfelelő mennyiségű Rybp mennyiségre és hogy a nem megfelelő Rybp dózis többfajta egyéb szem rendellenességet is okoz.

3.9. Az rybp transzgenikus lencsékben bizonyos gének expressziója megváltozott

Az abnormális lencse rostok differenciációjának molekuláris vizsgálatára a $Tg^{ROSA26-RYBP/EGFP;alphaA\ crystallin/cre}$ egerek (15, 16. ábrák) mRNS szintű expressziós analízisét kvantitatív RT-PCR segítségével végeztük el (16. ábra; anyag és módszer fejezet).

16. ábra. Rybp transzgenikus szemlencsék kvantitatív RT-PCR analízise.

Rybp, sox2, ap-2 α , β A4-crystallin és α 6-integrin expressziós szintjének relatív változása P1 szemlencsékben. Az expressziós szintek b2m szintjére vannak normalizálva.

A P1 kontroll (*rybp*^{+/+}) és transzgenikus (*Tg*^{ROSA26-RYBP/EGFP;alphaA crystallin/cre}) lencsék analízise kimutatta, hogy mind a Rybp mind pedig az EGFP gén transzkriptjeinek mennyisége 16x-ra nőtt a transzgenikus egerek szemlencséjében a kontrollokhöz képest. A fő lencsealkotó strukturális proteinek közül a *Cryba4* 7x-es redukción mutatott a transzgenikus lencsékben, míg a többi krisztallin és filenzin mennyisége nem változott. A tesztelt sejtadhéziós molekulák közül az α 6-integrin mRNS szint ötödére csökkent, míg a többi integrin ((α 5- and β 1-integrins) mennyisége változatlan maradt. A tesztelt transzkripciós faktorok közül az AP-2 α szint 30x-ra a Sox2 12x-ra emelkedett. A Pax6, Prox1, MafA, MafB and c-Maf transzkripciós faktorok mennyisége nem változott számottevően. Ezek az eredmények megerősítik, hogy a normális szemlencsefejlődés a Rybp dózistól függ.

DNS microarray tanulmányok és egyéb kondicionális mutánsokon végzett tanulmányok valószínűsíthetően további hasznos információkkal szolgálnak a jövőben arra vonatkozóan, hogy a Rybp dózis vajon melyik membrán protein, gap junction fehérje és egyéb β /gammakrisztallin expressziójára van hatással?

4. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Jelen tézis keretében bemutatott kísérletek szolgáltatották az első genetikai bizonyítékot arra, hogy a Rybp gén esszenciális szerepet játszik az embriogenezisben, különös tekintettel a központi idegrendszer kialakulására. Esszenciális az organogenezisben is, hiszen a heterozigóták egy részében és a kiméra állatokban a Rybp gén működésének felfüggesztése az előagy és szem fejlődési rendellenességeit okozza. A fenotípusban megfigyelt elváltozások összhangban állnak a Rybp embrionális fejlődés során detektált expressziós mintázatával.

Az rybp nullhomozigóta embriók a korai barázdálódást még túlélnek, majd belépnek a beágyazódás stádiumába, ahol már nem képesek tovább fejlődni és elpusztulnak. A letalitás időpontja méhen belül 5.5 – 6.5 nap közé tehető (E5.5 - E6.5) amikor mind proliferációs mind apoptotikus defektusok mutatkoznak. A korai fejlődési stádium túlélése azt mutatja, hogy a Rybp szerepét ebben a korai fejlődési szakaszban vagy az anyai Rybp helyettesíti, vagy az egyéb redundáns funkciójú fehérjék, így esetleg ez a fehérje nélkülözhető ebben a korai fejlődési szakaszban. Ezt sugallja az is, hogy ES sejtekben a Rybp hiánya nem sejtletális, hiszen a homozigóta deléciós sejtek létrehozhatók, ezek a sejtek osztódásra képesek hasonlóan a parentális sejtvonalhoz és elektronmikroszkópiás szinten sem detektálhatók különbségek. Lehetséges egy bizonyos mértékű ellensúlyozás, amelyet feltehetőleg a Rybp családjába tartozó Yaf2 fehérje biztosít. A Yaf2-ről kimutatták, hogy már a blasztocisztában is kifejeződik (valamint a korai embrióban és placentában is) [10]. Azonban úgy tűnik, hogy a beágyazódás ideje körül az embrionális proliferációnak/túlélésnek a zigóta-eredetű Rybp korlátozó tényezője. Ezt a szerepet támasztják alá az általunk végzett *in vitro* kísérletek eredményei is, amelyek azt

mutatják, hogy az *rybp*^{-/-} blasztociszták képtelenek életképes epiblaszt/belső sejtsomó létrehozására. Fontos megjegyezni hogy az *in vitro* tenyésztett homozigóta null blasztociszták szintén képtelenek voltak felismerhető trofektodermális (TE) struktúrák létre hozására, ami érdekes megfigyelés annak fényében, hogy a trofoblaszt sejtekben és azok leszármazottaiban, a chorionban és a kifejlett placentában, drámaian magas szintű az Rybp expresszió. Közismert, hogy a trofoblaszt sejtek fontos szerepet játszanak a beágyazódási folyamatban, mivel ők azok, amelyek beborítják a méh szövetet és létrehozzák az átmenetet az anyai és a magzati keringési rendszer alkotóelemei között és fontos szerepük van a terhes méhnyálkahártya (decidua, decidualizáció) kialakításában is. Csábító azt feltételezni, a Rybp hiánya befolyásolja a korai trofoblaszt biológia egyes elemeit (proliferáció, differenciáció, migráció, funkció) ahogy erre már mások is rámutattak más „knock out” egerek esetében [29-31]. A hiányos trofoblaszt magyarázhatja azt, hogy miért képtelenek előidézni az *rybp*^{-/-} embriók a teljes decidualizációt *in vivo*, amelyet a beágyazódás kezdeményezését követő apoptózis hiánya magyaráz. A decidualizáció megghiúsulása azonban a fejlődés leállásához vezethet, noha azt sem zárhatjuk ki, hogy ezt az epiblasztban rejlő rendellenesség okozza. További vizsgálatok magyarázatot adhatnak arra is, hogy vajon a korai hibák elsősorban extraembrionális természetűek-e, és ha igen, akkor a trofoblaszt milyen mértékben érintett. Néhány PcG protein TE sejtvonalban betöltött represszív szerepe ismert az irodalomból, ahogy az X-inaktivációban és imprintingben betöltött funkciójuk is, ami részben a TE sejt vonalhoz és leszármazottaihoz (extraembrionális szövetek) köthető [29, 32-34]. Ezek közé a fehérjék közé tartozik a Ring 1B PcG fehérje, amely bizonyítottan kötődik a Rybp-hez is illetve a Yaf2-hoz is [4, 10].

Az Rybp beágyazódásban betöltött szerepén felül jelen tanulmány elsőként írja le a központi idegrendszer és szem fejlődésében betöltött szerepét is. Erre a kiméra tanulmányok és a szemipenetráns heterozigóta egerekben észlelt fenotípusok adtak elsősorban lehetőséget. A kiméra módszer lényege, hogy a korai embrionális letális fenotípusok részben áthidalhatók és vizsgálhatók, ha a defektív sejteket egy olyan kontextusba helyezzük, ahol túlélésük a környező vad típusú sejtek segítségével elősegítődik. Így gyakorlatilag egy kimerikus állatot hozunk létre, amelynek a sejtjei kétféle (vagy akár többféle) genotípusból tevődnek össze, jelen esetben a null homozigóta és vad típusúból. Ezen tanulmányok valamint az a tény, hogy a heterozigóták egy része (15-25%) szintén defektust mutat a központi idegrendszer és a szem fejlődésében arra utalt, hogy a Rybp hatása dózis-függő. Ezt szintén alátámasztja, hogy az észlelt fenotípus a genetikai háttértől is függött: az előfordulás a 129Sv/J aránnyal nőtt míg CD1-el csökkent. Fontos megfigyelésünk még, hogy a heterozigótákban észlelt „exencephaly” (nyitott koponya/fej) gyakran közölt fenotípus genetikailag módosított egerekben [35, 36], különösen homozigótákban és gyakran a „haldokló” (moribund) vagy kompromittált embriók jellegzetessége. Esetünkben azonban az a tény, hogy a központi idegrendszer és szem szelektíven azok a szervek, amik a Rybp hiányától szenvednek, vagyis a fenotípus specifikusan ezekben a szervekben mutatkozik meg, azt bizonyítja, hogy ez a hatás specifikus és specifikusan a Rybp hiányából fakad.

A kiméra tanulmányokban észlelt fenotipikus elváltozások is egy specifikusabb funkciót sejtetnek, mint pusztán szerep a sejtek proliferációjában vagy pluripotenciájuk kialakításában. A kiméra állatokban a Rybp deficiens sejtek jelenléte az elő- és középagy kaotikus túlburjánzását okozta egyéb kaotikus elváltozásokkal egyetemben (úgy mint különböző fokú velőcső záródási defektusok és a neurális

lemezek elülső részének részleges záródása). Hogy vajon mi a kiváltója a túlburjánzásnak és a velőcső záródási rendellenességnek, egyelőre csak találgatásokra ad lehetőséget. Valószínűleg az expressziós profil analízise a mutáns vs. vad típusú embrionális cortexnek, ahol a Rybp elsődlegesen poszt-mitotikus neuronokban expresszálódik, segíthet ezen kérdés megválaszolásában. Ez a kísérlet valószínűleg a Rybp sejtciklus szabályozásban és differenciációban betöltött potenciális szerepére is fényt vethet. Ezt a hipotézist támogatja az a megfigyelésünk is, hogy a Rybp fehérje elsődlegesen poszt-mitotikus neuronokban, a szemlencse poszt-mitotikus SLF-jeiben és a retina terminálisan differenciált sejttypusaiban (GGL, INL, fotoreceptorok) van dominánsan jelen. A szemben észlelt fejlődési rendellenességek közül a szem colobomája, mely a retina hibás összezáródása ("hasadék a szemben") következtében alakul ki fejlődésbiológiailag a legjelentősebb és legtöbbet tanulmányozott. Az agyi fejlődési rendellenességeket mutató heterozigóták 32%-a és a kimérák 50%-a szintén mutáns volt colobomára is, de olyan egerek is hordozták a coloboma fenotípust, akik egyéb szembetűnő fenotipikus elváltozást nem mutattak. Transzkripciós faktorok egész sora (BCOR, CBP, Chx10, Cited2, c-Maf, Foxg1, Pax2, Pax6, Ptch, Six3, Ski, Vax1 and Vax2), jelátvivő molekulák (Jnk1, Jnk2 and Shh) vagy a reninsav jelátvivő útvonal tagjai között is számos kolobóma fenotípust hordozó mutációt írtak le (5 bmc). Jelen tanulmányban elsőként mutattuk ki, hogy a Rybp fehérje szerepet játszik a kolobóma kialakulásához vezető jelátviteli folyamatokban.

A kolobóma kialakulásához vezető molekuláris változások nem tisztázottak de valószínűsíthető hogy a sejtadhézió, a sejtek alakjának és proliferációjának valamint a programozott sejthalálnak és extracelluláris mátrixnak szerepe van a kialakulásában. A kolobóma mellett jó néhány lencsefejlődési rendellenességet is

megfigyelhettünk a mutánsokban úgy, mint a szemlencse ventrális rotációja. Ezt az aberrációt korábban leírták az Otx2 mutáció kapcsán [37]. Az Otx2 transzkripciós faktor a retinában expresszálódik és fontos szerepe van például a fotoreceptorok hosszú távú túlélésében és fennmaradásában. A gén mutációja szintén kolobóma kialakulását okozza. A Rybp kiméra embriók szemlencségei a lencse hólyagok abnormális szeparációját is mutatták a SE-től ami a Pax6 heterozigóta [38] és Foxe3 homozigóta [39] mutáns egerekben előforduló fenotípus. Így meglehet, hogy a szemben a Rybp és Otx2, Pax6 vagy Foxe3 gének ugyanazon jelátvivő útvonalakon keresztül fejtik ki hatásukat. Transzgenikus lencsék, amelyek túltermelik a Rybp-et abnormálisan differenciálódtak már közvetlenül a születés után (P2), ami az öregedéssel tovább romlik s végül a lencse összeomlásához vezet. Hasonló fenotípus figyelhető meg az AP-2alpha és néhány E2F transzkripciós faktor [38, 40] lencse-specifikus kondicionális transzgenikus mutánsainál is. Az hogy vajon a túl sok Rybp fehérje jelenléte interferál-e a SFC-ek sejtdhéziójával, migrációjával (mint az AP-2 alpha transzkripciós faktor esetében), sejtciklusával (mint az E2F transzkripciós faktorok esetében), terminális differenciációjával (mint a TGFbeta ligand esetében) vagy egy teljesen más útvonalon hat, további tanulmányokat igényel. Tény hogy a Rybp-ről korábban leírták, hogy sejt kultúrák rendszereiben az E2F transzkripciós faktorok funkcionális specifikációjában fontos szerepet játszhat [7] noha ezidáig *in vivo* ezt még nem tanulmányozták.

Az Rybp általános túltermeltetése hasonló defektusokat okozott a lencsében, mint a lencse-specifikusan overexpresszáló mutánsokban, emellett még a szaruhártya neovaszkularizációja is megfigyelhető volt. Olyan géneket mint VEGF, FGF2 és MMP-2 szintén a korneális neovaszkularizáció fenotípusával hoztak összefüggésbe korábbi tanulmányokban [41, 42]. Az Rybp és angiogenezis kapcsolatának vizsgálata

további tanulmányokat igényel, amit az expressziós mintázat analízise során megfigyeltek is indokolnak, mint pl. a hyaloid erek és a szemet körülvevő erek endotéliumaiban történő magas Rybp expresszió.

Egy lehetséges elképzelés arra vonatkozólag, hogy miképp fejti ki hatását az Rybp a PcG transzkripciós reguláció vonatkozásában [4] az, hogy talán mint “master regulátor” egyéb fontos fejlődési regulátor gének expresszióját szabályozza. A PcG-ek multimerikus komplexek formájában szabályoznak kulcsfontosságú “fejlődési” és homeobox géneket [43]. Figyelemreméltó, hogy a már a mi általunk elvégzett kisléptékű gén expresszió analízis is kimutatta, hogy több kulcsfontosságú regulátor gén (Sox2, AP-2a) illetve a lencse fejlődésében kruciális krisztallin [17] expressziós szintje a traszgenikus, Rybp-et túltermelő lencsékben jelentősen megváltozott. Sőt, a szem fejlődésében “master-regulátor”-nak számító Pax6 lokalizációja is megváltozott a heterozigóta egerekben. Mindezek a megfigyelések azt sugallják, hogy a Rybp más egyéb, fontos fejlődésbiológiai szereppel bíró gént regulál és hogy a regulált gének megváltozott szintje az észlelt fenotípusok előidézője a Rybp mutánsokban. Annak eldöntése, hogy ez közvetlen, vagy közvetett úton történik-e, további vizsgálatokat igényel. Így annak eldöntése is, hogy vajon mindez az Rybp és a PcG represszorok kölcsönhatásai által szabályozódik-e. Érdekes, hogy szintén abnormális elülső szemfejlődés figyelhető meg a Ring1 deficiens egerekben, hasonló, mint amit mi megfigyeltünk a Rybp mutáns egerekben [44], sőt, az YY1^{+/-}; Ring1^{-/-} összetételű egerekben ez a fenotípus felerősödik. Mivel mind a Ring1, mind pedig az YY1 kölcsönhat a Rybp-vel és egyéb Class II PcG-el, lehetséges hogy ezek a proteinek funkcionálisan kölcsönhatnak annak érdekében, hogy a gerinces szem fejlődését irányítsák.

Népszerű álláspont az, hogy nyitott velőcső rendellenességet mutató fenotípusért a neuroepiteliális sejtproliferáció/differenciáció egyensúlyának a megbomlása a felelős. Egyéb velőcső záródásban szerepet játszó folyamatok, úgymint a koponyacsont mezenchymális sejtjeinek a proliferációja és expansziója, citoskeletális újrendeződés, velőcső (neurális crest) sejtek vándorlása, neuroepiteliális sejthalál [35, 36] szintén felelőssé tehetők. Noha a NTD-ek szabályozásában már számos transzkripció regulátor fehérje szerepét már leírták, a PcG proteinek szerepe tisztázatlan, kivéve a YY1 (ying yang 1) DNS kötő PcG komplex tagot [45]. Egy másik tanulmány kimutatta, hogy a valporsav, ami egyben potenciális teratogén is, és egérben, emberben egyaránt NTD-t okoz, egyúttal PcG expressziós szint változást is okoz, legalábbis axio-szkeletális kontextusban [46]. A Rybp mutáns egerekben észlelt NTD-ok egyben arra is utalnak, hogy az Rybp szerepet játszhat a neurális szabályozásban fontos PcG protein-mediált csendesítésben (silencing).

Fontos megemlíteni, hogy a Rybp heterozigóta egerekben észlelt fenotípusok (NTD) a pro-apoptotikus génekre (caspase 9, caspase 3, apaf1; [47]) jellemző fenotípusok is egyben. Ezen nullmutáns embriók NTD-je apoptózis és sejthalál, valamint az éretlen előagyi neuronok és prekursor sejtek megzavart szabályozása miatt alakulnak ki [47]. A jövőben az *rybp* null embriók központi idegrendszere (mind a heterozigótáké, mind pedig a kiméráké) és a pro-apoptotikus kaszkád tagok fenotípusának hasonlósága további vizsgálatokat igényel, hiszen tudjuk hogy (i) a Rybp fehérje kölcsönhat az apoptotikus gének egy részével (death receptor pathway tagokkal; [20]) és (ii) az Rybp deficiens egér embriók hiányos apoptotikus választ mutatnak a beágyazódás során.

Végül meg kell említsük, hogy néhány egyéb gén szintén hasonló fenotípust mutat az általunk leírt Rybp mutáns fenotípusokkal, nevezetesen a homozigóta embrionális letális és a heterozigóta enkefalikus fenotípusokkal, így pl. a YY1 transzkripció faktor [45], a kromatin re-modellező Brg1 [48] és Srg3 [49]. Érdekes sajátága mindezen géneknek az, hogy képesek downstream gének egész sorát szabályozni, ami talán közös vonás a génmodifikált egerek komplex fenotípusaiban. A tézisben ismertetett *rybp* mutáció és fenotípusának leírása, jellemzése lehetővé teszi a Rybp fehérje potenciális szabályozási útvonalakon való elhelyezését. Az *rybp* mutánsok szintén hasznos eszközei lehetnek az Rybp pontos molekuláris szerepeinek tisztázásához, és ahhoz, hogy elhelyezzük a gént a transzkripció reguláció, apoptózis vagy még fel nem térképezett egyéb molekuláris útvonalak egyikén. A jövőben kondicionális mutánsok generálásával, amelynek középpontjában a központi idegrendszer fejlődésében fontos folyamatok állnak, lehetővé válhat az Rybp molekuláris funkcióinak pontosabb megismerése és fejlődésben illetve betegségekben, öregedésben való szerepének felderítése.

5. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Kísérleteink során a *rybp* gén és génterméke, a Rybp fehérje biológiai funkcióit vizsgáltuk transzgenikus módszerek alkalmazásával, egérben. A *rybp* gén funkcióit mind génkiütéses mind pedig túltermeltetési rendszerekben analizáltuk. A funkcióvesztéses homozigóta mutánsokat homológ rekombinációval hoztuk létre heterozigóta mutánsokon keresztül. A funkcióvesztéses mutánsban a Rybp gén termékének, ami egy 227 aminosavas fehérje, csak az első 53 aminosava íródott át, amely a funkciókért felelős domének hiányát jelentette, és ezért olyan utód egereket hoztunk létre, melyek a Rybp fehérje termelésére nem voltak alkalmasak, tehát lehetőségünk nyílt a gén hiányában fellépő fenotípusok részletes elemzésére. A túltermeltetési mutánsokat is egy speciális homológ rekombinációt igénylő gén célba-juttatásos, state-of-the-art módszerrel hoztuk létre. Így elértük, hogy a bevitt transzgén kontrollált módon, csak egy, illetve két kópiában expresszáldjon. Ennek jelentősége abban rejlik, hogy kiküszöbölődik a „pozíció effektus variegáció” hiszen minden egyes targetált sejtvonal ugyanazon homológ módon, a *Rosa26* lokuszban targetált. Így kísérleteinkben olyan párhuzamos, egymástól független sejtvonalakat tudtunk létre hozni, amelyekben a Rybp transzgén expressziója nem függött az integráció helyétől. A két komplementer módszer alkalmazásával (funkcióvesztéses és funkciónyerési genetikai mutációk) egy speciális, érzékenyített rendszerben vizsgálhattuk a RYBP élettani szerepét térben és időben. Kísérleti rendszerünk hatékonyságát bizonyítja, hogy a gén-dózis-hatást is vizsgálni tudtuk. Ennek eredményeképp sikerült kimutatnunk hogy:

- (1) A Rybp gén homozigóta állapotban letális fenotípust eredményez, tehát a gén létfontosságú.

(2) Az *rybp* gén heterozigóta állapotban szemi-penetránsan letális fenotípust eredményez.

(3) Az Rybp fehérje túlermelletése szemlencse-specifikus módon a szem fejlődési rendellenességeit okozza (coloboma, a szaruhártya fokozott vaszkularizációja és katarakta). Kimutattuk, hogy Rybp szükséges a normál retina, a szemlencse és valószínűleg az elülső szemszegment fejlődéshez.

(4) Az *rybp* mutáció homozigóta állapotban peri-implantációs letalitáshoz vezet, melynek oka mind embrionális, mind pedig extraembrionális rendellenességekben is megnyilvánult.

(5) A heterozigóta embriók egy részének letalítását a velőcső fejlődésének rendellenessége okozta.

(6) Az Rybp protein immunfestéssel történő lokalizációja, az embrionális fejlődés különböző stádiumaiban ezen megfigyeléseket szintén alátámasztotta: az Rybp protein az embriogenezis során erős jelenlétet mutatott az embrió differenciálódó sejtpopulációiban, az idegrendszer differenciált sejttypusaiban és az extraembrionális trofoblaszt óriás sejtrétegben (trofoblast giant cell; TGC).

(7) A Rybp géntermék hiánya más gének által, így például a rokon Yaf2 által nem kompenzálható, tehát a *rybp* és *yaf2* géncsaládtagok funkciója nem tekinthető redundánsnak.

Ezen megfigyelések valószínűsítik a *rybp* gén szerepét a differenciáció folyamatában, különös tekintettel a központi idegrendszer kialakulására, és a sejthalál folyamatában (apoptózis). Feltételezhető továbbá, hogy a RYBP/DEDAF emberi megfelelőjének elvesztése is súlyos következményekkel, beágyazódási problémákkal (spontán vetélés), velőcső záródási defektusokkal (nyitott velőcső kialakulása) vagy apoptózissal jár.

6. SUMMARY

Present work summarizes findings on the *in vivo* function of the mouse *rybp*/Rybp (Ring1 and YY1-Binding Protein; also known as DEDAF, YEAF1; UniGene Mm.321633; MGI:1929059) gene/protein. Several *in vitro* functions (transcriptional regulator, mediator of apoptosis) have been implied from Rybp's protein interaction profile that includes DNA binding proteins (YY1), polycomb group proteins (Ring1A, Ring1B, M33 and mPC2), and members of the pro-apoptotic caspase pathways but the precise cellular and *in vivo* role of Rybp currently was not well understood.

This thesis describes complementary strategies of (i) targeted mutagenesis and (ii) conditional ectopic transgenic alleles to achieve loss- and gain-of-function, respectively in order to reveal *in vivo* functions of *rybp* in the developing mouse. As a result of these studies, exciting phenotypes have emerged in these models, and present ongoing and future efforts to pursue them further. Firstly, the expression pattern of Rybp during mouse development was analysed and mice bearing a null mutation by gene targeting in embryonic stem cells was generated. Rybp was broadly expressed during embryogenesis, being particularly abundant in extraembryonic tissues including trophoblast giant cells. Consistent with this, *rybp* homozygous null animals exhibited embryonic lethality at peri-implantation stages - suggesting that Rybp was essential for survival of the embryo, for the establishment of functional extraembryonic structures, and for the execution of full decidualization.

This thesis also describes that through the use of a chimeric approach, the embryonic lethal phenotype was circumvented and a role for Rybp in neural

development was uncovered. Specifically, the presence of Rybp-deficient cells in the developing central nervous system resulted in forebrain overgrowth and in localized regions of disrupted neural tube closure. Functions for Rybp in the brain were further supported by the finding of exencephaly in about 15% of *rybp* heterozygous mutant embryos, and by Rybp's distinct neural expression pattern. Together these data supported critical roles for Rybp at multiple stages of mouse embryogenesis and differentiation. Furthermore, however there is a possible overlap between Rybp and Yaf2 expression, obviously was not sufficient to prevent aberrant neurulation/neurogenesis and eye development resulting from reduced Rybp levels in our affected heterozygous and chimeric animals.

With a second, complementary approach, a conditional ectopic allele for Cre-mediated misexpression of Rybp was generated. To do this the non-essential and ubiquitous *ROSA26* locus was targeted with a floxed neo cassette followed by a functional RYBP-EGFP fusion cDNA. In this mice a silent mutation was introduced where the Rosa26 locus was targeted homologous manner in ES cells. The mutation was introduced to the mouse germ line and the silent mutation could be induced by crossing these mice with cre reporter lines. Applying this strategy two different mice were generated: one expressing Rybp ubiquitously and the other expressing it tissue specific manner (under the control of AlphaA-Crystallin promoter) in the mouse lenses. The strategy was also designed that after induction all mice expressed Rybp in a fusion with enhanced green fluorescent protein (EGFP) allowing easy monitoring of the expression pattern. These studies established *rybp* as a novel gene that has been associated with coloboma, a developmental disease of the eye.

These findings are likely to place Rybp in processes of differentiation,

especially CNS and eye development, apoptosis and have implications for the understanding of neural tube defects, and neurodegenerative diseases. The cells and mice we have generated may allow us to assess the potential relationships between Rybp and these proteins and to place Rybp within known genetic networks. These tools also will provide opportunities for the elucidation of the precise molecular roles of Rybp as they relate to transcriptional regulation, apoptosis, and/or yet-to-be-identified cellular processes. In the future, the generation of conditional or tissue-specific knockout mice, with the CNS being an attractive focus, will allow us to understand more about Rybp's biological roles during development and in the context of aging and disease.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Lefstin JA, Yamamoto KR: **Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators.** *Nature* 1998, **392**(6679):885-888.
2. McKenna NJ, O'Malley BW: **Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators.** *Cell* 2002, **108**(4):465-474.
3. Ogata K, Sato K, Tahirov TH: **Eukaryotic transcriptional regulatory complexes: cooperativity from near and afar.** *Current opinion in structural biology* 2003, **13**(1):40-48.
4. Garcia E, Marcos-Gutierrez C, del Mar Lorente M, Moreno JC, Vidal M: **RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian Polycomb complex, and with the transcription factor YY1.** *The EMBO journal* 1999, **18**(12):3404-3418.
5. Neira JL, Roman-Trufero M, Contreras LM, Prieto J, Singh G, Barrera FN, Renart ML, Vidal M: **The transcriptional repressor RYBP is a natively unfolded protein which folds upon binding to DNA.** *Biochemistry* 2009, **48**(6):1348-1360.
6. Sawa C, Yoshikawa T, Matsuda-Suzuki F, Delehouzee S, Goto M, Watanabe H, Sawada J, Kataoka K, Handa H: **YEAF1/RYPB and YAF-2 are functionally distinct members of a cofactor family for the YY1 and E4TF1/hGABP transcription factors.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(25):22484-22490.
7. Schlisio S, Halperin T, Vidal M, Nevins JR: **Interaction of YY1 with E2Fs, mediated by RYPB, provides a mechanism for specificity of E2F function.** *The EMBO journal* 2002, **21**(21):5775-5786.
8. Ogawa H, Ishiguro K, Gaubatz S, Livingston DM, Nakatani Y: **A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells.** *Science (New York, NY)* 2002, **296**(5570):1132-1136.
9. Kalenik JL, Chen D, Bradley ME, Chen SJ, Lee TC: **Yeast two-hybrid cloning of a novel zinc finger protein that interacts with the multifunctional transcription factor YY1.** *Nucleic acids research* 1997, **25**(4):843-849.
10. Kaneko T, Miyagishima H, Hasegawa T, Mizutani-Koseki Y, Isono K, Koseki H: **The mouse YAF2 gene generates two distinct transcripts and is expressed in pre-and postimplantation embryos.** *Gene* 2003, **315**:183-192.
11. Madge B, Geisen C, Moroy T, Schwab M: **Yaf2 inhibits Myc biological function.** *Cancer letters* 2003, **193**(2):171-176.
12. Holdeman R, Nehrt S, Strome S: **MES-2, a maternal protein essential for viability of the germline in *Caenorhabditis elegans*, is homologous to a *Drosophila* Polycomb group protein.** *Development (Cambridge, England)* 1998, **125**(13):2457-2467.
13. Agherbi H, Gaussmann-Wenger A, Verthuy C, Chasson L, Serrano M, Djabali M: **Polycomb mediated epigenetic silencing and replication timing at the INK4a/ARF locus during senescence.** *PloS one* 2009, **4**(5):e5622.
14. Surface LE, Thornton SR, Boyer LA: **Polycomb group proteins set the stage for early lineage commitment.** *Cell stem cell*, **7**(3):288-298.

15. Soriano P: **Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain.** *Nature genetics* 1999, **21**(1):70-71.
16. Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, William CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F: **Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus.** *BMC developmental biology* 2001, **1**:4.
17. Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC: **Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, **90**(18):8424-8428.
18. Sauer B, Henderson N: **Targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic genome by the Cre recombinase.** *The New biologist* 1990, **2**(5):441-449.
19. Trimarchi JM, Fairchild B, Wen J, Lees JA: **The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(4):1519-1524.
20. Zheng L, Schickling O, Peter ME, Lenardo MJ: **The death effector domain-associated factor plays distinct regulatory roles in the nucleus and cytoplasm.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(34):31945-31952.
21. Tam PP, Rossant J: **Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development.** *Development (Cambridge, England)* 2003, **130**(25):6155-6163.
22. Hatten ME: **Central nervous system neuronal migration.** *Annual review of neuroscience* 1999, **22**:511-539.
23. Pirity MK, Locker J, Schreiber-Agus N: **Rybp/DEDAF is required for early postimplantation and for central nervous system development.** *Molecular and cellular biology* 2005, **25**(16):7193-7202.
24. Torres M, Gomez-Pardo E, Gruss P: **Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory.** *Development (Cambridge, England)* 1996, **122**(11):3381-3391.
25. Grindley JC, Davidson DR, Hill RE: **The role of Pax-6 in eye and nasal development.** *Development (Cambridge, England)* 1995, **121**(5):1433-1442.
26. Sanyanusin P, McNoe LA, Sullivan MJ, Weaver RG, Eccles MR: **Mutation of PAX2 in two siblings with renal-coloboma syndrome.** *Human molecular genetics* 1995, **4**(11):2183-2184.
27. Schwarz M, Cecconi F, Bernier G, Andrejewski N, Kammandel B, Wagner M, Gruss P: **Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6.** *Development (Cambridge, England)* 2000, **127**(20):4325-4334.
28. Livesey FJ, Young TL, Cepko CL: **An analysis of the gene expression program of mammalian neural progenitor cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(5):1374-1379.
29. de Napoles M, Mermoud JE, Wakao R, Tang YA, Endoh M, Appanah R, Nesterova TB, Silva J, Otte AP, Vidal M *et al*: **Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation.** *Developmental cell* 2004, **7**(5):663-676.
30. Rossant J, Cross JC: **Placental development: lessons from mouse mutants.** *Nature reviews* 2001, **2**(7):538-548.

31. Cross JC: **Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis.** *Seminars in cell & developmental biology* 2000, **11**(2):105-113.
32. Fang J, Chen T, Chadwick B, Li E, Zhang Y: **Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation.** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(51):52812-52815.
33. Mak W, Baxter J, Silva J, Newall AE, Otte AP, Brockdorff N: **Mitotically stable association of polycomb group proteins eed and enx1 with the inactive x chromosome in trophoblast stem cells.** *Curr Biol* 2002, **12**(12):1016-1020.
34. Wang J, Mager J, Chen Y, Schneider E, Cross JC, Nagy A, Magnuson T: **Imprinted X inactivation maintained by a mouse Polycomb group gene.** *Nature genetics* 2001, **28**(4):371-375.
35. Copp AJ, Greene ND, Murdoch JN: **The genetic basis of mammalian neurulation.** *Nature reviews* 2003, **4**(10):784-793.
36. Juriloff DM, Harris MJ: **Mouse models for neural tube closure defects.** *Human molecular genetics* 2000, **9**(6):993-1000.
37. Martinez-Morales JR, Signore M, Acampora D, Simeone A, Bovolenta P: **Otx genes are required for tissue specification in the developing eye.** *Development (Cambridge, England)* 2001, **128**(11):2019-2030.
38. Baulmann DC, Ohlmann A, Flugel-Koch C, Goswami S, Cvekl A, Tamm ER: **Pax6 heterozygous eyes show defects in chamber angle differentiation that are associated with a wide spectrum of other anterior eye segment abnormalities.** *Mechanisms of development* 2002, **118**(1-2):3-17.
39. Medina-Martinez O, Brownell I, Amaya-Manzanares F, Hu Q, Behringer RR, Jamrich M: **Severe defects in proliferation and differentiation of lens cells in Foxe3 null mice.** *Molecular and cellular biology* 2005, **25**(20):8854-8863.
40. West-Mays JA, Zhang J, Nottoli T, Hagopian-Donaldson S, Libby D, Strissel KJ, Williams T: **AP-2alpha transcription factor is required for early morphogenesis of the lens vesicle.** *Developmental biology* 1999, **206**(1):46-62.
41. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM: **VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells.** *The EMBO journal* 1999, **18**(14):3964-3972.
42. Kato T, Kure T, Chang JH, Gabison EE, Itoh T, Itohara S, Azar DT: **Diminished corneal angiogenesis in gelatinase A-deficient mice.** *FEBS letters* 2001, **508**(2):187-190.
43. Pirrotta V, van Lohuizen M: **Differentiation and gene regulation. Genomic programs and differentiation: editorial overview.** *Current opinion in genetics & development* 2006, **16**(5):443-446.
44. Lorente M, Perez C, Sanchez C, Donohoe M, Shi Y, Vidal M: **Homeotic transformations of the axial skeleton of YY1 mutant mice and genetic interaction with the Polycomb group gene Ring1/Ring1A.** *Mechanisms of development* 2006, **123**(4):312-320.
45. Donohoe ME, Zhang X, McGinnis L, Biggers J, Li E, Shi Y: **Targeted disruption of mouse Yin Yang 1 transcription factor results in peri-implantation lethality.** *Molecular and cellular biology* 1999, **19**(10):7237-7244.

46. Okada A, Aoki Y, Kushima K, Kurihara H, Bialer M, Fujiwara M: **Polycomb homologs are involved in teratogenicity of valproic acid in mice.** *Birth defects research* 2004, **70**(11):870-879.
47. Lossi L, Merighi A: **In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS.** *Progress in neurobiology* 2003, **69**(5):287-312.
48. Bultman S, Gebuhr T, Yee D, La Mantia C, Nicholson J, Gilliam A, Randazzo F, Metzger D, Chambon P, Crabtree G *et al*: **A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes.** *Molecular cell* 2000, **6**(6):1287-1295.
49. Kim JK, Huh SO, Choi H, Lee KS, Shin D, Lee C, Nam JS, Kim H, Chung H, Lee HW *et al*: **Srg3, a mouse homolog of yeast SWI3, is essential for early embryogenesis and involved in brain development.** *Molecular and cellular biology* 2001, **21**(22):7787-7795.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Doktori dolgozatom befejezésekor hálásan mondok köszönetet mindazoknak, akik segítettek, bátorítottak, bíztak bennem és megteremtették a feltételeket ahhoz, hogy elkészülhessem ez a tézis.

Örökké adósa maradok témavezetőmnek, Dr. Gácsér Attilának, aki nagy odaadással segítette munkámat és folyamatosan bátorított.

Köszönöm a Dr. Nicole Scheiber-Agus vezette laboratórium minden volt tagjának szakmai megbeszélésekben nyújtott segítőkészségüket és vitaindító ötleteiket, amelyek mind hozzájárultak ahhoz, hogy ez a dolgozat elkészülhessem.

Elsőként szeretnék külön köszönetet mondani Dr. Joseph Lockernek, akiben nemcsak egy kiváló patológust volt szerencsém megismerni, de egyben a “mesteremnek” is tekintek. Szerencsésnek érzem magam, hogy tanulhattam tőle, nemcsak hisztopatológiát hanem életszemléletet is és hogy utamat végig, a new yorki tartózkodásom alatt sőt mind a mai napig egyengeti.

Köszönöm Dr. Radma Mahmod-nak, az Albert Einstein College of Medicine Histopatologia labor vezetőjének a végzett immunohisztokémiai kísérleteim során nyújtott készséges segítségét és hihetetlen szakmai hozzáértését.

Külön szeretnék köszönetet mondani Dr. Nagy Andrásnak akinek a laborjában a transzgénikus technológiának csaknem összes csínját-bínját elsajátítottam. Itt ismerkedtem meg az őssejtbiológia alapjaival és jutottam el egy magasabb szintre nemcsak az őssejtekkel kapcsolatos technológiák művelésében, hanem a target vektorok tervezésében is.

Köszönöm kollegáimnak, Dr Ujhelly Olgának és Dr Nemes Csillának, a tézis elkészítésében nyújtott professzionális segítségét és szakmai véleményezését.

Köszönöm minden new yorki barátomnak és kollégámnak, elsősorban Dr. Rachel Arrigoninak (Rakéleee!) (Rybp ubiquitinálásban és sumoylálásban betöltött szerepének felderítése), Dr. Jennifer Blancknak (az *rybp* genomi lókuszt szkrínelésére általam használt egér Rybp cDNS klónozásáért), Dr. Lucy Firthnek (“auntie Lulu”), Dr. Dave Tylernek (“UKdemonic”), Dr. Dennis Madridnak (“Dottore”), Mr. Richard Trippettnak (“uncle Rich”), Mrs. Chantal Lackamnak (“DoubleSec”) és Dr. Mary Tsikitisnek (“oh Mary-Mary”), hogy szakmai hozzáértésükkel, szeretetükkel és társaságukkal emelték a fényét a minden szempontból felejthetetlen new york-i éveknek. ☺

Köszönöm a házvédésem opponenseinek, Dr. Pfeiffer Ilonának és Dr. Hamari Zsuzsannának hogy alapos bírálatukkal és konstruktív javaslataikkal hozzájárultak, hogy ez a dolgozat jobbra válhasson.

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Gácsér Attilának és kollégámnak, barátomnak Dr. Ujhelly Olgának, hogy mellettem álltak a nehezebb napokban is, bátorítottak és hittek bennem. Tumbs up, you guys ROCK!

Végezetül, köszönet Emmának... ☺