

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A POLYCOMB PROTEIN RYBP/DEDAF *IN VIVO*
FUNKCIÓINAK VIZSGÁLATA TRANSZGENIKUS
MÓDSZEREKKEL**

Pirity Melinda Katalin

Témavezető:
Dr. Gácsér Attila



Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék

Szeged

2011

Bevezetés

Az elmúlt mintegy tíz évben bebizonyosodott hogy a *rybp* (Ring1- and YY1-Binding Protein; szintén ismert, mint DEDAF (Death Effector Domain Associated Factor), UniGene Mm.321633; MGI:1929059) génnek és termékének, (Rybp/DEDAF fehérje) sokrétű és komplex *in vitro* feladata van. Az úgynevezett “moonlightening” fehérjék családjába tartozik, melyekre jellemző, hogy egynél több, egymástól eltérő funkciót képesek ellátni. Ennek megfelelően, a Rybp/DEDAF protein amellettt hogy maga is transzkripciós regulátor és polycomb protein, *in vitro* kölcsönhatásba lép számos, változatos biológiai funkcióval bíró fehérjével, úgymint DNS kötő (YY1), kromatin modifikáló (Brg1), pro-apoptotikus (procaspase-8), egyéb polycomb (Ring1A, Ring1B, M33, mPC2) vagy például a sejtek proliferációjában és differenciációjában fontos szabályzó funkcióval rendelkező Myc-Mad-Max hálózat tagjaival (Mxi1). Valójában a Rybp fehérje felfedezése és izolálása a Ring1A (Ring1; a *Drosophila* ortológja a dRing/Sce/nek) polycomb szabályzó proteinnel való kölcsönhatása révén vált először lehetővé. Később kimutatták, hogy a Rybp a Ring1B-vel (Ring2/Rnf2; *Drosophila* dRing/Sce ortológ) és a M33-mal (Pc1 *Drosophila* Pc ortológ) is kölcsönhat. Ez a három PcG protein a gének stabil represszált állapotáért felelős, a PRC1 PcG multiprotein komplex tagjaiként is ismertek. A 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. A Yaf2 fehérjéről, ami aminosav szinten 55%-ban homológ a Rybp-vel, szintén kimutatták, hogy kölcsönhatásba lép számos PRC1 komplex taggal és DNS kötő fehérjével.

Ennek ellenére, *in vivo*, embrionális fejlődés során betöltött funkciója ismeretlen maradt. Jelen disszertáció az egér *rybp* génnek és termékének, a Rybp/DEDAF proteinek, *in vivo* funkcióinak felderítésére szolgáló kísérletsorozatot és azok eredményeit tartalmazza. A disszertáció az egérgenetika transzgenikus eszközeinek alkalmazásával, komplementer gén-kiütéssel és túltermeltetéssel vizsgálja a *rybp* gén lehetséges funkcióit az egér embrionális fejlődése folyamán. A tézisben alkalmazott két komplementer stratégia a következő: (1) gén-kiütéses (KO - knock out ; LOF - loss of function, gén veszítéses/hiányos) (2) gén túltermeltetéses (“overexpression” avagy klasszikus transzgenikus; Tg) módszerek, melyek alkalmazásával sikerült rávilágítani a *rybp* gén embrionális fejlődésben játszott esszenciális szerepének különböző aspektusaira.

Célkitűzések

Munkám során célul tűztem ki a következőket:

- Van-e szerepe a *rybp* génnek és géntermékének az embrionális fejlődésben?
- Amennyiben nincs szerepe, úgy a *rybp* géntermék funkciója redundánsnak tekinthető-e, és más fehérjék (pl. homológ YAF2 protein) átvehetik-e a szerepét?
- Amennyiben van szerepe, akkor mi a fenotípusa a géndeléciónak és milyen szerveket érint a *rybp* gén hiánya az embrionális fejlődésben?
- Összefügg-e a fenotípus az expressziós mintázattal, azaz a fenotípus által érintett szervekben lokalizálódik-e a Rybp fehérje és milyen az expressziós mintázata?
- Mi történik, ha túltermeltetjük a fehérjét egérben, mely szervek érintettek az embrionális illetve poszt-natális (születés utáni) fejlődésben?
- Mi lehet a mechanizmus, amivel a Rybp kifejti hatását?

Alkalmazott módszerek

Rybp transzgenikus vektor-konstrukció elkészítése

ES sejtek tenyésztése

ES sejtek elektroporálása

Rybp^{+/-} és *Rybp*^{-/-} ES sejtek alapítása

Rybp^{+/-} és *Rybp*^{-/-} és transzgenikus (*Tg*^{ROSA26-RYBP/EGFP/+}) egértörzsek alapítása

Kiméra egér előállítás *rybp*^{-/-} ES sejtvonalból

Southern blot analízis

PCR analízis, Kvantitatív RT-PCR

Elektroforézis és immunoblot

Hisztológia és immunhisztokémia

Apoptózis vizsgálat

Blasztociszta "outgrowth assay"

Elektronmikroszkópia

Eredmények

- Jelen tézis keretében bemutatott kísérletek szolgáltatták az első genetikai bizonyítékot arra, hogy a *Rybp* gén esszenciális szerepet játszik az embriogenezisben, különös tekintettel a központi idegrendszer és szem kialakulására.
- A *rybp* mutáció homozigóta állapotban peri-implantációs letalitáshoz vezet, melynek oka mind embrionális mind extraembrionális rendellenességekben is megnyilvánult.
- A homozigóta mutánsok proliferációs és apoptotikus defektusokat mutattak és inkomplett decidualizációt.
- A statisztikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a született *rybp* heterozigóták száma lényegesen eltér a várt mendeli eloszlástól. A heterozigóta embriók egy része részlegesen átadódó embrionális

letalitást mutatott, melynek oka a velőcső fejlődésének rendellenessége volt.

- A heterozigóta fenotípushoz hasonlóan a kiméra állatokban a Rybp deficiens sejtek jelenléte az elő- és középagy kaotikus túlburjánzását okozta egyéb kaotikus elváltozásokkal egyetemben úgymint különböző fokú velőcső záródási defektusok és a neurális lemezek elülső részének részleges záródása.

- Jelen tanulmányban elsőként mutattuk ki, hogy a Rybp fehérje szerepet játszik a kolobóma kialakulásához vezető jelátviteli folyamatokban. Specifikusan az egér szemlencséiben túltermeltetve a fehérjét a szemlencse (katarakt) és a retina (coloboma) fejlődési rendellenességéhez vezetett.

- A Rybp általános túltermeltetése hasonló defektusokat okozott a lencsében, mint a lencse-specifikusan overexpresszáló mutánsokban, emellett még a szaruhártya neovaszakularizációja is megfigyelhető volt.

- A Rybp/DEDAF protein immunfestéssel történő lokalizációja, az embrionális fejlődés különböző stádiumaiban mindezen megfigyeléseket szintén alátámasztotta: A Rybp/DEDAF protein az embriogenezis során erős jelenlétet mutatott az embrió differenciálódó sejtpopulációiban, az idegrendszer és szem differenciált sejttypusaiban (pl. a poszt-mitotikus neuronokban) és az extraembrionális trofoblaszt óriás sejtrétegben.

- A *rybp* géntermék hiánya más gének által, így például a rokon Yaf2 által nem volt kompenzálható, tehát a Rybp és Yaf2 géncsaládtagok

funkciója nem tekinthető teljesen átfedőnek.

- Eredményeink alapján: egy lehetséges elképzelés arra vonatkozólag, hogy miképp fejti ki hatását a Rybp a PcG transzkripciós reguláció vonatkozásban az, hogy talán mint “master regulátor” egyéb fontos fejlődési regulátor gének expresszióját szabályozza.

Összefoglalás

Ezen megfigyelések valószínűsítik a *rybp* gén szerepét a differenciáció folyamatában, különös tekintettel a központi idegrendszer kialakulására és sejthalál folyamatában (apoptózis) betöltött funkcióira és feltételezhető, hogy a Rybp/DEDAF emberi megfelelőjének elvesztése is súlyos következményekkel, beágyazódási problémákkal (spontán vetélés), velőcső záródási defektusokkal (nyitott velőcső kialakulása) vagy apoptózissal jár. A tézisben ismertetett *rybp* mutánsok szintén hasznos eszközei lehetnek a Rybp pontos molekuláris szerepeinek tisztázásához, és ahhoz, hogy elhelyezzük a gént a transzkripciós 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 a Rybp molekuláris funkcióinak pontosabb megismerése és fejlődésben, illetve betegségekben, öregedésben való szerepének felderítése.

Közlemények

A tézishez közvetlenül kapcsolódó publikációk:

1. He, S., **Pirity ,MK.**, Wang, WL., Wolf, L., Chauhan, BK., Cveklova, K., Tamm, ER., Ashery- Padan, R., Metzger, D., Nakai, A., Chambon, P., Zavadil, J., and Cvekl, A. (2010) Chromatin remodeling enzyme Brg1 is required for mouse lens fiber cell terminal differentiation and its denucleation. *Epigenetics Chromatin*. Nov 30;3(1):21 (IF: 4,67)
2. **Pirity, M.K.**, WeiLin, W., Wolf, L., Tamm, E.R., Schreiber-Agus, N., Cvekl, A. (2007) Rybp, a polycomb group interacting protein required for mouse ocular development. *BMC Dev Biol*. 30;7;39 (IF: 3,29)
3. **Pirity, M.**, Locker, J., Schreiber-Agus, N. (2005) Rybp/DEDAF is required for early post- implantation and for central nervous system development. *Mol. Cell. Biol*. 16:7193-7202 (IF: 6,057)
4. Dugast-Darzacq, C., **Pirity, M.**, Blanck, J.K., Scherl, A., Schreiber-Agus, N. (2004) Mxi1- SRalpha: a novel Mxi1 isoform with enhanced transcriptional repression potential. *Oncogene* 23:8887-8899 (IF: 7,135)

5. Nagy, A., Moens, C., Ivanyi, E., Pawling, J., Gertsenstein, M., Hadjantonakis, A-K., **Pirity, M.**, Rossant, J. (1998) Multipurpose gene alterations from a single targeting vector: dissecting the role of *N-myc* in development. *Current Biol.* 8: 661-664 (IF: 10,992)

A tézishhez közvetlenül nem kapcsolódó publikációk:

6. **Pirity, MK.**, Dinnyés, A. (2010) Tbx3: another important piece fitted into the pluripotent stem cell puzzle. *Stem Cell Research & Therapy* 1:12.

7. Carstea, AC., **Pirity, MK.**, and Dinnyés, A. (2009) Germline competence of Mouse ES and iPS cell lines: chimera technologie and genetic background. *World Journal of Stem Cells* 1(1):22-29 (IF: new journal impact factor will be known in 2011)

8. Rungarunlert, S., Techakumphu, M., **Pirity, MK.**, and Dinnyés, A. (2009) Embryoid body formation from embryonic and induced stem cells: benefits of bioreactor. *World Journal of Stem Cells* 1(1):11-21. (IF: new journal impact factor will be known in 2011)

9. Kobolak, J., Kiss, K., Polgar, Z., Mamo, S., Roger-Gaillard, C., Tancos, Z., Bock, I., Baji, AG., Tar, K., Pirity, MK., Dinnyes, A. (2009) Promoter analysis of the rabbit *POU5F1* gene and its

expression in preimplantation stage embryos. *BMC Mol Biol.* Sep. 4;10:88 (IF: 2,85)

10. *Rhee, J.M., ***Pirity, M.K.**, *Lackan, C.S., Long, J.Z., Kondoh, G., Takeda J., Hadjantonakis, A.-K. (2006) In vivo imaging and differential localization of lipid-modified GFP-variant fluorescent fusion proteins in embryonic stem cells and mice. *Genesis* 44:202-218 (IF: 2,223)

11. Cole, M.J., **Pirity, M.**, Hadjantonakis, A-K. (2003) Shedding light on Bioscience. *EMBO Rep.* 4:838-843 (IF: 6,97)

12. Hever-Szabo, A., **Pirity, M.**, Szathmari, M., Venetianer, A. (1998) P-glycoprotein is overexpressed and functional in severely heat-shocked hepatoma cells. *Anticancer Res.* 18: 3045-3048 (IF: 1,65)

13. **Pirity, M.**, Hever-Szabo, A., Venetianer, A. (1996) Overexpression of P-glycoprotein in heat- and/or drug-resistant hepatoma variants. *Cytotechnology* 19: 207-214 (IF: 1,297)

14. Venetianer, A., **Pirity, M.**, Hever-Szabo, A. (1994) The function of heat-shock proteins in stress tolerance. *Cell Biol. Int.* 18: 605-615 (IF: 1,9)

15. **Pirity, M.**, Nguyen, V.T., Dubois, M.F., Bensaude, O., Hever-Szabo, A., Venetianer, A. (1991) Decreased stress inducibility of the hsp68 protein in a rat hepatoma variant clone. *Eur. J. Biochem.* 210: 793-800 (IF: 3,042)

Könyv fejezetek:

16. Hadjantonakis AK, **Pirity M.**, Nagy A. (2008) Cre recombinase mediated alterations of the mouse genome using embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* 461:111-32.

17. **Pirity, M.**, Blanck, J.K., Schreiber-Agus, N. (2006) Lessons learned from Myc-Max-Mad knockout mice. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 302:205-234 (IF: 4,16)

18. Hadjantonakis, A-K., **Pirity, M.**, Nagy, A. (1999) Cre recombinase mediated changes of the mouse genome using ES cells. *Molecular Embryology: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology* P.T. Sharpe and I. Mason Eds. 97: 101-138

19. **Pirity, M.**, Hadjantonakis, A-K., Nagy, A. (1998) Embryonic stem cells: creating transgenic animals. *Animal Cell Culture Methods. Methods in Cell Biology.* J.P. Mather and D. Barnes Eds. 57: 279-293 (IF: 3.5)

* Közös első szerzős cikkek