

A polikomb fehérje, Rybp kulcsfontosságú az egér embrionális őssejtek neurális differenciációjához

Ph.D. értekezés tézisei

Kovács Gergő



Témavezető:

Dr. Pirity Melinda

MTA-Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet

Szeged

2016.

BEVEZETÉS

Őssejtek neurális differenciációja

Az embrionális őssejtekből alakul ki egy felnőtt szervezet minden specializált sejt típusa és szövete. A központi idegrendszer kialakulása során, a korai szakaszban a pluripotens embrionális őssejtek először multipotens neurális őssejteké, majd neurális progenitor sejtekké differenciálódnak. A neurális differenciáció késői szakaszában ezek a progenitorok érett neuronokká, asztrocitákká és oligodendrocitákká fejlődnek. Ezen folyamat több, összetett lépésből áll, melyek finoman szabályozottak és zavaruk könnyen idegrendszeri fejlődési rendellenességek kialakulásához vezethet. A neurális differenciáció folyamatának szabályozásában számos transzkripciós regulátor játszik döntő szerepet. Ezek közül a polikomb represszív komplexek jelentős szerepet játszanak a pluripotencia fenntartásában, ugyanakkor részt vesznek a differenciáció elindításában a specializációs faktorok repressziójának feloldásával. Tézisem, egy ilyen polikomb represszív komplex tagja, az Rybp-re (*Ring1 and Y1 binding protein*), valamint annak neurális specializációban betöltött szerepére fókuszál.

Az Rybp esszenciális az embrionális fejlődéshez és a központi idegrendszer kialakulásához

Csoportunk korábban megállapította, hogy az *rybp* homozigóta mutáns egerek beágyazódás kori letális fenotípust mutatnak, a heterozigótákban pedig idegrendszeri fejlődési rendellenességeket (velőcső záródási rendellenesség, exenkefália, stb) figyeltünk meg. Annak vizsgálata, hogy az Rybp fehérje teljes hiánya milyen hatással van az idegsejtek kialakulására, a homozigóta egyedek korai letalitása miatt *in vivo* nem lehetséges, így az Rybp neurális differenciációban betöltött szerepét *in vitro* vizsgáltuk tovább. Vizsgálataim alapját az őssejtek azon egyedülálló sajátága adta, hogy megfelelő feltételek mellett, *in vitro* körülmények között is megtartják pluripotenciájukat és differenciációs képességüket. Az *in vitro* modellrendszer használatával így lehetőségünk nyílt arra, hogy megvizsgáljuk, az Rybp mely differenciációs folyamatokban játszik szerepet az idegi fejlődés során.

CÉLKITŰZÉSEK

Jelen tanulmány célja az Rybp idegi specializációban betöltött szerepének karakterizálása.

Munkánk során a következőkre fordítottunk kiemelt figyelmet:

- megvizsgáltuk, hogy az *rybp* homozigóta mutáns őssejtek képesek-e a fő idegi sejtípusokat (neuronok, oligodendrociták, asztrociták) kialakítani.
- leírtuk az *rybp* homozigóta mutáns őssejtekből differenciálódott neurális prekursor sejtek jellegzetességeit, külön figyelmet fordítva a megújulási és differenciációs képességükre.
- meghatároztuk, hogy mely érett neurális formák képzése zavart az Rybp hiányában.
- célunk volt olyan géneket találni, melyek az Rybp „downstream” célgénjei és expressziójuk megváltozik az Rybp hiányában vagy jelenlétében a neurális differenciáció során.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Őssejtek *in vitro* neurális differenciációja

Vad típusú (*rybp*^{+/+}) és Rybp-t nem expresszáló, homozigóta mutáns (*rybp*^{-/-}) őssejtvonalak fenntartása zselatinnal felületkezelt sejttenyésztő csészében zajlott. A neurális differenciációt Bibel és csoportja, 2004-ben megjelent közleménye alapján végeztük, kisebb módosításokkal. Az őssejtekből szuszpenziós kultúrában három dimenziós aggregátumokat (úgynevezett “embrionális testecskék”) hoztunk létre, a negyedik napon retinsavval indukáltuk a neuroektoderma feldúsulását, majd az embrionális testecskék disszociációját követően, a sejteket azonos számban, felületkezelt sejttenyésztő edényekbe helyeztük. A letapasztott sejteket 6 napon keresztül tenyésztettük. További analízis céljából mintavétel történt a 0., 3., 7., 10. és 14 napokon.

Morfológiai analízis

A mintavételi időpontokban a differenciálódó sejtek morfológiai analízisét a következőképp végeztük: a paraformaldehiddel fixált őssejtekről (0.nap) és embrionális testekről (3. nap, 7. nap), valamint a kristály ibolyával festett, letapasztott neurális kultúrákról (10. nap, 14. nap) Olympus CellR mikroszkóppal készítettünk fénymikroszkópos képeket. A fixált embrionális testekről készült, hematoxilinnal és eozinnal festett szekciókat elemezve vizsgáltuk a bennük kialakuló struktúrákat.

Molekuláris analízis

A minták génexpressziós analízise kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR) segítségével történt. Ennek során pluripotencia faktorok, polikomb represszív komplex tagok, csíralemez markerek és neurális markerek relatív génexpresszióját vizsgáltuk a differenciáció során a két sejtvonalban. A fehérjekifejeződési mintázat analízisét immuncitokémia segítségével végeztük, melynek során neurális markerek fehérje szintű kifejeződését, illetve annak mintázatát tanulmányoztuk letapasztott neurális kultúrákban.

Sejtciklus analízis és apoptózis szintjének mérése áramlási citometriával

A feltüntetett időpontokban a sejteket bromodeoxiuridinnel kezeltük, majd a megfelelő előkészítés után propidium-jodiddal inkubáltuk. A differenciáció során a különböző sejtciklusokban tartózkodó, valamint az apoptózison átesett sejtek számát fluoreszcencia-aktivált áramlási citométer segítségével állapítottuk meg.

Luciferáz riporter assay

COS7 sejtekbe CaPO_4 transzfekcióval juttattunk Rybp-t tartalmazó, valamint a Plagl1 gén promóterét tartalmazó luciferáz riporter konstrukt plazmidokat különböző koncentrációkban. A transzfekció után 48 órával a sejteket lizáltuk, majd luciferáz riporter assay kit használatával, luminométer segítségével, megmértük a sejt-lizátumokban a luciferáz aktivitást.

EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- az *rybp* homozigóta mutáns őssejtek képesek voltak embrionális testeket képezni, de a neurális irányba való differenciációjuk zavart szenvedett. Morfológiai vizsgálatok kimutatták, hogy a mutáns őssejtekből létrehozott embrionális testekben nagyobb számban képződtek „neurális rozettaszerű” struktúrák, a letapasztott kultúrában pedig a mutáns sejtek kevésbé összetett neurális hálózatot alkottak, mint a vad típusú sejtek.
- a differenciálódó *rybp* homozigóta mutáns sejtekben a pluripotencia faktorok ugyanúgy megfelelően lecsengtek, mint a vad típusú differenciálódó sejtekben.
- a neurális differenciáció során egyes polikomb komplex tagok (Ring1a, Ring1b, Ezh1, Ezh2) és egyes szabályozó faktoraik (Yy1, Jmj) expressziójában nem volt jelentős különbség a két sejtvonalat összehasonlítva.
- az *rybp* homozigóta mutáns embrionális testekben mindhárom fő csíralemez (endoderma, mezoderma, ektoderma) megfelelően kifejlődött, csakúgy, mint a vad típusú embrionális testekben.
- a korai neurális folyamatok markerei (Pax6, Nestin, NeuroD1) magasabb expressziót mutattak az *Rybp* hiányában, mint jelenlétében a differenciálódó sejtekben. Az immuncitokémiai analízis eredményei azt mutatták, hogy a mutáns kultúrákban mind az expresszió mértéke, mind az immunpozitivitást mutató sejtek száma magasabb volt.
- a késői neurális markerek (Tubb3, NeuN, Gfap, Olig2), továbbá az axonális és dendritikus markerek (Tau, Map2) csökkent expressziós szintet mutattak a mutáns neurális kultúrákban a vad típusához viszonyítva, valamint a neurális nyúlványok képzésének zavarát is észleltük.

- a génexpressziós eredmények azt mutatták, hogy a Plagl1 transzkripció faktor nem expresszálódott az Rybp hiányában a neurális differenciáció teljes folyamata során.
- a neurális differenciáció során a különböző sejtciklusokban található sejtek eloszlásában nem volt különbség a két sejtvonal között, tehát az Rybp hiánya nem okozott változást a sejtciklusban.
- az Rybp hiányában több sejt vett részt az apoptózis folyamatában a neurális differenciáció során.
- a luciferáz riporter assay eredményei arra utalnak, hogy az Rybp képes volt aktiválni a Plagl1 gént a promóterén keresztül.

KONKLÚZIÓ

Munkám során az Rybp neurális differenciációs folyamatokban betöltött szerepét vizsgáltam. Ennek során vad típusú és *rybp* homozigóta mutáns őssejtek *in vitro* neurális indukcióját alkalmaztam. Bár a mutáns őssejtek képesek voltak embrionális testeket képezni, azon belül csíralemezeket formálni, majd neurális őssejteket és neurális prekurzorokat képezni; az érett neuronok, asztrociták és oligodendrociták képzése zavart szenvedett. Eredményeink rámutatnak arra, hogy az *rybp* homozigóta mutáns neurális progenitorokból kisebb mértékben képződnek érett neurális formák, a defektus a neuronokat, az asztrocitákat és az oligodendrocitákat is érinti. Megfigyeltük még a Plagl1 teljes hiányát az *rybp* homozigóta mutáns sejtekben, amely arra mutat rá, hogy a Plagl1 az Rybp egyik „downstream” célgénje, valamint feltételezhető, hogy az Rybp, a Plagl1 és más transzkripciós faktorok egy közös szabályozó útvonal tagjaiként fejtik ki hatásukat. Ezek alapján elmondható, hogy az Rybp esszenciális szerepet játszik a neurális specializáció folyamatában.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

Az értekezés alapját képező közlemények:

- I. **Kovács, G.**, Szabó, V., Purity, M.K., **Absence of Rybp Compromises Neural Differentiation of Embryonic Stem Cells.** *Stem Cells Int.* (2015)
doi: 10.1155/2016/4034620

(2.813 impakt faktor)
- II. Ujhelly, O., Szabo, V., **Kovacs, G.**, Vajda, F., Mallok, S., Prorok, J., Acsai, K., Hegedus, Z., Krebs, S., Dinnyes, A., Purity, M.K. **Lack of Rybp in Mouse Embryonic Stem Cells Impairs Cardiac Differentiation.** *Stem Cells Dev.* 24(18):2193-205. (2015)
doi: 10.1089/scd.2014.0569

(3.727 impakt faktor)

Összesített impakt faktor: 6.54

Egyéb, ismeretterjesztő közlemény:

Kovács, G. Az élet forrása: Néhány tény az őssejtekről
Élet és Tudomány 68:(34) pp. 1075-1077. (2013)

TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Hozzájárulok ahhoz, hogy Kovács Gergő, doktorjelölt az alább jelölt közös publikációban foglalt eredményeket a védési eljárásban felhasználja.

Ujhelly, O., Szabo, V., **Kovacs, G.**, Vajda, F., Mallok, S., Prorok, J., Acsai, K., Hegedus, Z., Krebs, S., Dinnyes, A., Purity, M.K. **Lack of Rybp in Mouse Embryonic Stem Cells Impairs Cardiac Differentiation.** *Stem Cells Dev.* 24(18):2193-205. (2015)
doi: 10.1089/scd.2014.0569

Kijelentem, hogy a felsorolt közleményből az alábbi eredményeket más PhD-eljárásban nem használtuk és a jövőben sem használjuk fel:

- *őssejtek következő generációs szekvenálásán alapuló, teljes genomot lefedő génexpressziós analízise.*

Szeged, 2016. február 22.

.....
Dr. Purity Melinda
tudományos főmunkatárs
MTA-SZBK, Genetikai Intézet