

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola

Az Európai Unió Kiválósági Központja
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet

Az RYBP retinsav jelátviteli útvonalra gyakorolt hatásának vizsgálata egér őssejtek *in vitro* neurális differentiációja során

(Investigation the effect of RYBP on the retinoic acid signalig pathway during *in vitro* neural
differentiation of mouse embryonic stem cells)

PhD értekezés

Sutus Enikő

Témavezető: Dr Purity Melinda Katalin
ELKH, SZBK Genetikai Intézet

Szeged
2022

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	3
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1 Össejtek.....	6
2.2 A neurális differenciáció folyamata, az össejtek, mint modellrendszerek	7
2.3 A retinsav jelátviteli útvonal és szerepe a neurális fejlődésben	9
2.4 A PAX6 neurális differenciációban betöltött szerepe	11
2.5 Az RYBP, mint multimerikus komplexek tagja.....	13
2.6 Az RYBP, mint fontos neurális szabályozó faktor	14
2.7 Apoptózis jelátviteli útvonalak.....	16
2.8 Nekrózis jelátviteli útvonalak	19
3. Célkitűzések.....	20
4. Anyagok és módszerek.....	21
4.1 Alkalmazott sejtvonalak és tenyésztési körülmények	21
4.2 Embrionális test képzés retinsav jelenlétében és hiányában, <i>in vitro</i> neurális differenciáció	22
4.3 Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció.....	23
4.4 Immuncitokémia	25
4.5 Apoptózis/nekrózis jelölés	25
4.6 Áramlási citometria	26
4.7 A <i>Pax6</i> gén <i>P1</i> promóter régió klónozása pGL4.20 vektorba	26
4.8 Luciferáz riporter próba.....	27
4.9 Statisztika.....	27
5. Eredmények.....	29
5.1 <i>Rybp</i> hiányában megváltozik az össejtek retinsav jelátviteli útvonal tagjainak génkifejeződése a vad típushoz viszonyítva	29
5.2 A retinsav jelátviteli útvonal tagok génexpressziója az <i>in vitro</i> neurális differenciáció során megemelkedik az <i>Rybp null</i> mutáns sejtekben.....	30
5.3 Retinsav kezelést követően a PAX6 fehérje szintje megemelkedik <i>Rybp</i> hiányában	34
5.4 Az RYBP és PAX6 fehérjék kifejeződése dinamikusan változik az <i>in vitro</i> neurális differenciáció során	36
5.5 Az RYBP represszálja a <i>Pax6</i> expresszióját a <i>P1</i> -es promóterén keresztül.....	37
5.6 Az RYBP Polikomb függő módon represszálja a <i>Pax6</i> kifejeződését	38
5.7 Az ektópikus <i>Rybp</i> menekíti a retinol metabolizmus enzimek génexpresszióját.....	40
5.8 Az ektópikus <i>Rybp</i> részben menekíti a <i>Pax6</i> génexpresszióját.....	42
5.9 A menekített sejtvonalakban a PAX6 fehérje szintje magasabb marad az <i>in vitro</i> neurális differenciáció során	43

5.10 <i>Rybp</i> hiányában megemelkedik az apoptózis mértéke az <i>in vitro</i> neurális differenciáció során	45
5.11 A PAX6 magas szintje a neurális differenciáció során apoptózist eredményez	49
5.12 Retinsav kezelés hatására, az <i>Rybp null</i> mutáns sejtekben megemelkedik az apoptózis mértéke az <i>in vitro</i> neurális differenciáció késő szakaszában	51
5.13 A belső és külső apoptózis jelátviteli útvonal tagok génexpressziója megemelkedik <i>Rybp</i> hiányában	52
5.14 Az <i>Rybp null</i> mutáns sejtekben megnő a nekrosis mértéke	54
5.15 Az apoptózis és nekrosis útvonal tagok Polikomb Represszor Csoportba tartozó fehérjék target génjei	56
5.16 Retinsav kezelés hatására megváltozik a sejtciklus fázisok eloszlása az <i>in vitro</i> neurális differenciáció során	57
6. <i>Eredmények megvitatása</i>	60
7. <i>Köszönetnyilvánítás</i>	68
8. <i>Irodalomjegyzék</i>	69
9. <i>Eredmények összefoglalása</i>	84
10. <i>Summary</i>	87
11. <i>Publikációk listája</i>	90

1. Rövidítések jegyzéke

Adh/ADH – Alcohol Dehydrogenase

Apaf1/APAF1 – Apoptotic Peptidase Activating Factor 1

Auts2/AUTS2 – Autism Susceptibility Candidate 2

Bcl-2 – B-cell lymphoma 2

Bcor/BCOR – BCL-6 Interacting Corepressor

BID – BH3 interacting-domain death agonist

Brg1/BRG1 – Brahma-related gene 1

c-Myc/**c-MYC** – MYC Proto-oncogene, BHLB Transcription Factor

Cbx2/CBX2 (**M33**) – Chromobox Homolog 2

Ck2/CK2 – Casein Kinase 2

CMW – Citomegalovírus promóter

Crabp/CRABP – Cellular Retinoic Acid Binding Protein

Crbp/CRBP – Cellular Retinol Binding Protein

Cyp26/CYP26 – Cytochrome P450, Family 26

Csnk2a2/CSNK2A2 – Casein Kinase 2 Alpha Prime Polypeptide

DAMP – Damage-associated Molecular Pattern

DD – Death Domain

Dedaf/DEDAF – Death Effector Domain (DED)-Associated Factor

DISC – Death Inducing Signaling Complex

DNS – dezoxiribonukleinsav

DR6 – Death Receptor 6

E10.5 – 10.5. embrionális nap (embryonic day 10.5)

E2F – E2 Promoter Binding Factor

E8 – 8. embrionális nap (embryonic day 8)

E9.5 – 9.5. embrionális nap (embryonic day 9.5)

EB – embrionális test (embryoid body)

ES – őssejt (embryonic stem cells)

Fadd/FADD – Fas Associated via Death Domain

FasL/FASL – Fas Ligand

FasR – Fas Receptor

Fbrs/FBRs – Fibrosine

Fbxl10/FBXL10 – F-Box and Leucin -Rich Repeat Protein 10

HD – Homeodomain

Hprt – Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase

IL1 β – Interleukin 1 Beta

IL18 – Interleukin 18

Kdm2b/KDM2B – Lysine (K)-Specific Demethylase 2

Klf4/KLF4 – Kruppel Like Factor 4

Mdm2/MDM2 – Mouse Double Minute 2

MLKL – Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase

ncPRC – non-canonical Polycomb Repressive Complex

Nspc1/NSPC1 – Nervous System Polycomb 1

Oct4/OCT4 – Octamer Binding Protein 4

Olig2/OLIG2 – Olygodendrocyte Transcription Factor 2

PAI/RED – *Pax6* DNS kötő alegységek

PAMP – Pathogene-associated Molecular Pattern

Pax6(Δ PD)/PAX6(Δ PD) – Paired Box 6 Δ PD izoforma

Pax6(5a)/PAX6(5a) – Paired Box 6 5a izoforma

Pax6/PAX6 – Paired Box 6

PCD – programozott sejthalál (programed cell death)

PcG – Polikomb fehérjecsalád (Polycomb Group)

Pcgf/PCGF – Polycomb Group Ring Finger

PD – Paired Domain

Pou5f1/POU5F1 – POU Domain, Class 5 Transcription Factor 1

PRC – canonical Polycomb Repressive Complex

PTPC – Permeability Transition Pore Complex

RA – retinsav (retinoic acid)

RA- – retinsav kezeletlen

RA+ – retinsav kezelt

Raldh/RALDH (Aldh/ALDH) – Aldehyde Dehydrogenase

Rar/RAR – Retinoic Acid Receptor

RARE – retinsav reszponzív elem (retinoic acid responsive element)

Rbp/RBP – Retinol Binding Protein

Rdh/RDH – Retinol Dehydrogenase

Ring1/RING1 (Ring1a/RING1A) – Ring Finger Protein 1

Rip/RIP – Receptor Interacting Protein Kinase

Rnf2/RNF2 (Ring1b/RING1B) – Ring Finger Protein 2

ROS – reaktív oxigéngyök, Reactive Oxygen Species

Rxr/RXR – Retinoid X Receptor

Rybp^{-/-} – *Rybp null* mutáns

Rybp/RYPB – RING1 and YY1 Binding Protein

Rybp^{+/+} – vad típus

Rybp^{res6}/Rybp^{res40} – menekített sejtvonalak (rescue)

Sox2/SOX2 – SRY (Sex Determining Region)-Box 2

Spk1/SPK1 (Usp7/USP7) – S-Phase Kinase Associated Protein 1a

Stra6/STRA6 – Stimulated by Retinoic Acid 6

TF – transzkripció faktor (transcription factor)

TNF α – Tumor Necrosis Factor Alpha

TRADD – TNFR-associated death domain

Ttr – transz-tiretin (trans-thyretin)

VZ – ventrikuláris zóna (ventricular zone)

Yy1/YY1 – Yin and Yang 1

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Össejtek

A pluripotens össejtek olyan még nem specializálódott sejtek, amelyek szimmetrikus osztódással korlátlanul képesek az önmegújításra, valamint aszimmetrikus sejtosztódással prekursor sejtek létrehozására, melyek a szervezet különböző specializált sejttypusaivá képesek differenciálódni. Így össejtekből alakul ki a többsejtű élőlények szervezetét alkotó összes sejttypus (Anthony Atala, 2012).

Differenciálódási potenciáljuk alapján többféle össejtet különböztethetünk meg. A legmagasabb differenciációs potenciállal a totipotens össejtek rendelkeznek, ezen sejtek képesek a szervezet összes embrionális és extraembrionális sejttypusának és szövetének kialakítására. Totipotens össejtnek tekinthető a zigóta, valamint az első néhány osztódás következtében keletkező szedercsíra vagy másnéven morula. Az embrionális össejtek (Embryonic Stem Cells, ES sejtek) származhatnak a szedercsíra stádiumú embrióból vagy a hólyagcsíra (blasztocisza) állapotú embrió belső sejtömegéből. Ezek az össejtek pluripotensek, azaz a test mindhárom csíralemezévé (ekto-, endo- és mezoderma) és annak származékaivá (pl. vérsejt, neuron, kötőszövet) képesek differenciálódni, de extraembrionális irányba nincs potenciáljuk fejlődni (McCulloch and Till 2005). Pluripotens össejtek nem csak a hólyagcsírából származhatnak, megkülönböztetünk úgynevezett indukált pluripotens össejteket is. Az indukált pluripotens össejtek testi sejtek újraprogramozásával hozhatók létre. Az újraprogramozást először az úgynevezett KSOM pluripotencia faktorokkal sikerült megvalósítani: KLF4 (Kruppel Like Factor 4), SOX2 (SRY (Sex Determining Region)-Box 2), OCT4 (Octamer Binding Protein 4, vagy POU5F1, POU Domain, Class5 Transcription Factor 1) és c-MYC (MYC Proto- Oncogene, BHLH Transcription Factor) fehérjéket kódoló géneket juttattak be a differenciálódott sejtekbe (Takahashi and Yamanaka 2006). Ehhez képest korlátozott potenciával rendelkeznek a felnőtt össejtek, amelyek multi-, bi- vagy unipotensek, így már csak néhány (egy-, kettő- vagy többféle) differenciált sejttypust képesek kialakítani. A multipotens össejtek ivarsejtek létrehozására nem képesek és már elköteleződtek egy fejlődési irányba, azonban számos szövettypus kialakítására képesek (pl.: mezenchimális- vagy vérképző- össejtek). E sejteknél alacsonyabb differenciációs potenciállal rendelkeznek a bi- és unipotens össejtek, amelyek már csak néhány vagy egy bizonyos szövet kialakítására képesek, viszont a differenciálódott testi sejtekkel ellentétben képesek az osztódásra és önmegújításra.

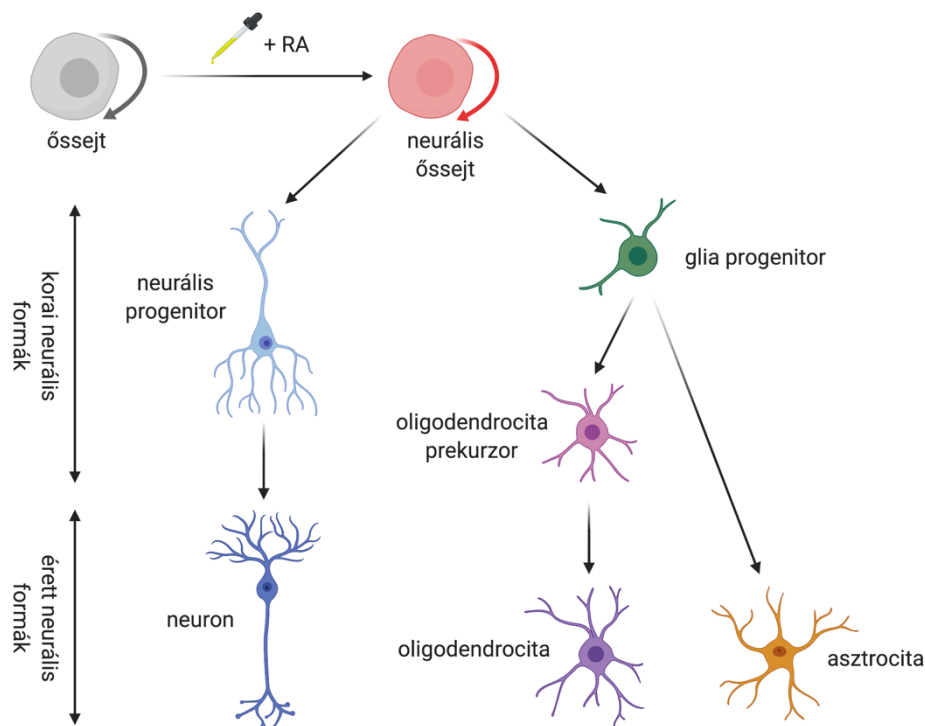
Ilyen sejteknek tekinthetők a különböző szöveti prekursorok vagy úgynevezett elődsejtek is (pl.: oligodendrocita prekursor sejtek).

Az őssejtek kiváló modellrendszerei a differenciáció folyamatának, mivel laboratóriumi körülmények között is fenntarthatók és megőrzik önmegújító képességüket. A tenyésztési feltételeinek módosításával pedig különböző irányba differenciáltathatók (Martello and Smith 2014).

2.2 A neurális differenciáció folyamata, az őssejtek, mint modellrendszerek

Minden emlős idegrendszere az ektodermából fejlődik ki. Az idegrendszer fejlődése két fő szakaszra osztható, a korai és a késői folyamatra. A korai fejlődési folyamatok során az ektodermából kialakul a neuroektoderma, amelyet túlnyomórészt multipotens neurális őssejtek alkotnak (Bergquist 1964). Ezekből a sejtekből képződnek a neuronális progenitor és glia progenitor sejtek, melyek aszimmetrikus osztódások segítségével képesek a központi idegrendszer összes sejtípusának kialakításra, valamint az önmegújításra (Gage 2000). A glia prekursor sejtekből alakulnak ki az oligodendrocita prekursor sejtek. Az idegi differenciálódás ezen szakaszára a különböző progenitor sejtek felszaporodása jellemző. A késői fejlődési folyamatok során további differenciálódás után a prekursor sejtekből terminálisan differenciálódott sejtípusok jönnek létre, melyek már nem képesek az osztódásra, mivel irreverzibilisen kiléptek a sejtciklusból (B. Lu, Jan, and Jan 2000). Ezen folyamat során a neuronális progenitorok neuronokat hoznak létre. A glia progenitorokból asztrociták alakulnak ki, valamint az oligodendrocita prekursorokból oligodendrociták képződnek (1. ábra) (Huang and Saint-Jeannet 2004). A neurális differenciáció során a transzkripciós faktorok expressziós változása különböző sejtípusokat és fejlődési stádiumokat határoz meg. A differenciáció különböző lépései időben jól meghatározottak és szigorúan szabályozottak, melyben jelentős szerepe van a sejt-sejt kapcsolatoknak, transzkripciós regulátoroknak és jelátviteli útvonalaknak (Daniel L. Chao, Le Ma 2009). A különböző transzkripciós faktorok időben változó kifejeződése meghatározza az egyes idegi sejtípusok kialakulását. Az egyik legjelentősebb jelátviteli útvonal a neurális differenciáció során a retinsav (retinoic acid, RA) jelátviteli útvonal. A retinsav koncentráció függő módon szabályozza a differenciációt egész embrionális őssejtekben, befolyásolja az érett neurális formákká való differenciálódást és meghatározza azok pontos helyét a fejlődő idegrendszerben (Hitoshi et al. 2002). A retinsav magas koncentrációja jelentősen megnöveli a neurális differenciáció arányát, míg az alacsony retinsav szint több mezodermális sejt létrejöttét eredményezi (Okada et al. 2004).

Embriionális őssejték segítségével laboratóriumi körülmények között, *in vitro* is vizsgálható a neurális differenciáció folyamatának molekuláris mechanizmusa. Az *in vitro* neurális differenciáció lehetővé teszi a különböző idegrendszeri fejlődési stádiumok részletesebb vizsgálatát, mivel ezzel a módszerrel a központi idegrendszer összes fő idegsejt típusa előállítható. Az így differenciáltatott idegsejtek fizikai, morfológiai és molekuláris tulajdonságai megegyeznek a központi idegrendszer sejtjeivel, mivel beültetve képesek integrálódni és a megfelelő funkciójukat ellátni. Az általunk végzett neurális differenciáltatáshoz az őssejteket szuszpenziós kultúrában embrionális testekké (Embryonic body, EB) aggregáltatjuk (lásd lentebb 4.2 részénél), melyek mindhárom csíralemez kialakítására képesek és a neurális irányú differenciáció indukálására retinsavat adunk a rendszerhez (Bibel et al. 2004).



1. ábra: Az embrionális őssejték neurális differenciációjának sematikus ábrája

A pluripotens őssejtekből származnak a neurális őssejtek, melyek differenciálódhatnak neurális progenitor és glia progenitor irányba, amiből oligodendrocita prekursorok alakulhatnak ki. A progenitor sejtek a differenciáció előrehaladtával érett neurális sejteket alakítanak ki: neuronokat, asztrocitákat és oligodendrocitákat. A differenciáció előrehaladtával a proliferációs képességüket fokozatosan elveszítik. RA: retinsav

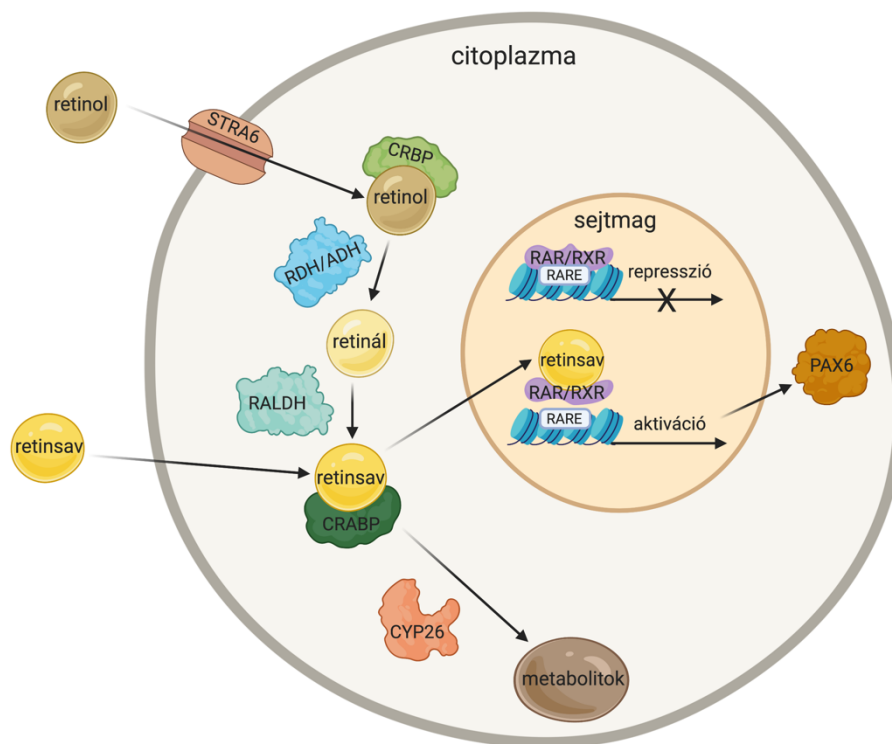
2.3 A retinsav jelátviteli útvonal és szerepe a neurális fejlődésben

A retinsav egy A-vitamin származék, nem peptid típusú, kis lipofil molekula. Az A-vitaminról már régóta köztudott, hogy nélkülözhetetlen a szem működéséhez (Parker and Crouch 2010). Ezen kívül egyik legjelentősebb szerepe az embriogenezis, valamint az apoptózis folyamatában van. A retinsav jelátviteli útvonal központi szabályozó szerepét a velőcsőben zajló korai neurális differenciációs folyamatokban is leírták (Rhinn and Dollé 2012).

A retinsav az embrionális fejlődés során morfogénként viselkedik, az embrió anterior-posterior tengelye mentén egy koncentráció grádiens létrehozva. Fontos szerepe van a dorzo-ventrális identitás meghatározásában, mivel magasabb szintje dorzális fenotípust, míg alacsonyabb szintje ventrálist eredményez (Okada et al. 2004). A retinsav embrionális szöveti szintézise és eloszlása szigorúan szabályozott a retinol és retinaldehid dehidrogenáz, valamint a citokróm P450 alcsaládba tartozó *Cyp26* (Cytochrome P450, Family 26) által (Lara-Ramírez, Zieger, and Schubert 2013). Utóbbi oxidálja a sejt számára felesleges retinsavat 4-hidroxi-retinsavvá, 4-oxo-retinsavvá, 18-hidroxi-retinsavvá, valamint 5,8-epoxi-retinsavvá (Fujii et al. 1997; Moise et al. 2004). Ezek a metabolitok szekréciós folyamatokkal kikerülhetnek a sejtből, majd ezt követően újrahasznosulnak. (Eichele 1999; Maden 2002). A retinsav a nukleáris retinsav receptor ligandjaként működik. Fontos szerepet játszik egyes gének transzkripció repressziójában, ugyanakkor más gének aktivációjában is. A sejtek a retinsavat retinol formájában veszik fel, amely transztiretinhez (Ttr) és retinol kötő fehérjéhez (Retinol binding protein, RBP/CRBP) kapcsolódva kering a vérben. Ez a komplex a sejtek felszínén lévő STRA6 (Stimulated by retinoic acid 6) receptorhoz kötődik, és ezen keresztül jut be a retinol a sejtekbe. A retinol a citoplazmában a citoplazmatikus retinol kötő fehérje komplexhez kötődik (CRBP, Cellular retinol binding protein). A retinolt a sejt belsejében a retinol dehidrogenázok (RDHs, Retinol Dehydrogenases) és az alkohol dehidrogenázok (ADHs, Alcohol Dehydrogenases) egy reverzibilis oxidációs folyamat során alakítják át retinállá. Ebben a folyamatban főleg az ADH1, ADH4, RDH10, valamint az RDH14 enzimek vesznek részt (H. Chen, Namkung, and Juchau 1995; Duester 2000; Lara-Ramírez, Zieger, and Schubert 2013). Az így képződött retinált a retinál dehidrogenáz enzimek (RALDHs/ALDH1s, Aldehyde Dehydrogenases 1) oxidálják tovább retinsavvá. A létrejövő retinsavat a celluláris retinsav kötő fehérje komplex (CRABP, Cellular retinoic acid binding protein) a sejtmagba szállítja. A jelátviteli útvonal szabályozása alá eső gének promóter régiójában található retinsav reszponzív elemekhez (RARE, Retinoic acid response elements) a RAR/RXR (Retinoic acid receptors/Retinoid X receptors) komplex kapcsolódik, ezáltal fenntartva a gének represszált

állapotát (Lara-Ramírez, Zieger, and Schubert 2013) (2. ábra). A RARE elem általános szekvenciája „nnAGGTCAnnnnnAGGTCAnn”, a konszenzus szekvenciákat ebben az esetben általában öt nukleotid választja el egymástól. Több gén promóter régiójában megtalálhatók ilyen elemek, például: a *Stra6*, *Crabp1*, a *Crabp2*, a *Rarα*, *Rarβ*, *Rarγ* és a *Cyp26a1* (Mangelsdorf et al. 1991; Piedrafita and Pfahl 1999). A sejtmagba jutó retinsavat a RAR/RXR komplex képes megkötni, így megszűnik ezen gének repressziója (Lara-Ramírez, Zieger, and Schubert 2013). A RAR komplex az all-transz-retinsavat képes nagy affinitással megkötni, míg az RXR komplex a 9-cisz-retinsavra specifikus.

A retinsav metabolizáló enzimek közül RARE elemmel rendelkeznek a *Cyp26a1*. A sejt részben ezzel a negatív visszacsatolási mechanizmussal védekezik a retinsav sejten belüli felhalmozódásával szemben (Eichele 1999).

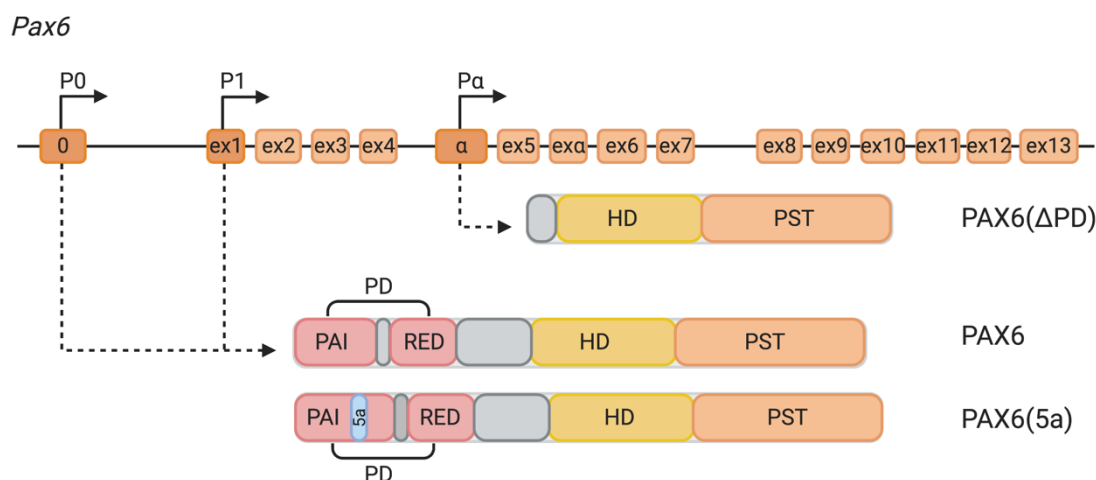


2. ábra: A retinsav jelátviteli útvonala sematikus ábrázolása

A STRA6 transzmembrán receptor képes az extracelluláris retinol megkötésére és citoplazmába juttatására. Az intracelluláris retinolt a CRBP komplex köti meg és az RDH/ADH enzimek alakítják retinállá majd a RALDH enzimek retinsavvá. Az intracelluláris retinsavat a CRABP komplex köti és a sejtmagba vagy a lebontóenzimre szállítja. A sejtmagban a RARE elemekkel rendelkező célgének represszálasát végző RAR/RXR komplexhez kötődve megszünteti a repressziót. A sejtben feleslegben lévő retinsavat a CYP26 enzimrendszer bontja le inaktív metabolitjaivá.

2.4 A PAX6 neurális differenciációban betöltött szerepe

A *Pax6* (Paired box 6) gén eredetileg a *Drosophila paired* gén gerinces homológjaként lett azonosítva (Walther et al. 1991). Gerincesekben erősen konzervált transzkripciós faktor, amely fontos szerepet játszik a központi idegrendszer fejlődési folyamataiban, mint a velőcső záródása, az idegsejtek vándorlása és a megfelelő idegi hálózatok kialakulása (Osumi et al. 2008). A *Pax6* az egér genomában a 2. kromoszómán helyezkedik el. A gén kifejeződését 3 promóter is szabályozza, a P0, P1 és P α . A genomi régióról átíródó fehérje két DNS-kötő doménnel rendelkezik, egy paired domén (PD) és egy paired-típusú homeodomén (HD) (Kim and Lauderdale 2006). Az emlős *Pax6* lókuszt 3 fehérje izoformát kódol: a PAX6-et, a PAX6(5a)-t, melyek mind a P0, mind a P1 promóterről képesek átíródni, valamint a PAX6(Δ PD)-t, mely a P α promóterről képződik. A PAX6(5a) izoforma alternatív átíródással jön létre, ahol az 5-ös exon helyett az 5a exon íródik át, ennek eredményeként egy 15 aminosavas inszerció keletkezik az N-terminális régióban található PD doménben. A PD DNS-kötő domén változása miatt, a PAX6(5a) a PAX6-től eltérő DNS kötési specificitással rendelkezik (Jun and Desplan 1996; Epstein et al. 1994) (3. ábra).



3. ábra: A *Pax6* gén és fehérjék

A *Pax6* gén sematikus ábrázolása, a 3 promóter régióval és a róluk átíródó fehérjékkel. P0: P0 promóter, P1: P1 promóter, P α : P α promóter, PD: paired domén, HD: paired-típusú homeodomén, PST: prolin/szerin/treonin gazdag régió és PAI/RED: DNS kötő alegységek

A neurális fejlődés során legkorábban a P1 promóter mutat aktivitást (E8) a hátsó agyban és a velőcsőben, majd az előagyban (E9.5). A P0 és P α promóterekről csak ezt követően (E10.5) íródnak át a *Pax6* izoformák az előagy területén. A P1 promóterről átíródó transzkriptomok mennyisége magasabb a másik két promóterről átíródó transzkriptomokhoz képest (Anderson, Hedlund, and Carpenter 2002). A *Pax6* és *Pax6(5a)* expressziós mintázata közel azonos az

idegrendszer fejlődése során, eltérés csak az expresszió mértékében figyelhető meg: a *Pax6* magasabb szinten fejeződik ki a korai fejlődési stádiumokban (Pinson et al. 2005). A *Pax6*(ΔPD) izoforma neurális fejlődésben betöltött szerepe még ismeretlen, azonban mutációja szem fejlődési rendellenességet, úgynevezett microphthalmia-t okoz (Kim and Lauderdale 2006). A *Pax6* fontos korai neurális marker gén és kulcsfontosságú transzkripciós faktor, mivel szövetspecifikus módon képes szabályozni a sejtciklusból való kilépést így a proliferáció és a differenciáció folyamatát (Farhy et al. 2013). Az embrionális fejlődés során először a 8. napon kezd el expresszálni, amikor a központi idegrendszer kezdemény még teljes egészében proliferáló neuroepitél sejtekből épül fel. A velőcső záródását követően először az előagy, az utóagy, a feji ektoderma és a gerincvelő területén, majd később a középagyban fejeződik ki (Davis et al. 2008). Az agykéreg fejlődése során a *Pax6* a ventrikuláris zónában (VZ) fejeződik ki (Soriano and Del Río 2005). Koncentráció függő módon képes szabályozni a szem és az idegrendszer fejlődését, mivel a neurális differenciáció során elősegíti a neurális őssejtek érett idegsejteké alakulását (Favor et al., 2009). A *Pax6* magas szintje képes gátolni a neurális fejlődés terminális szakaszát azáltal, hogy a sejteket neurális őssejt állapotban tartja (Bel-Vialar, Medevielle, and Pituello 2007). Továbbá a *Pax6* magas szintjének hatására a differenciáció késői szakaszában gátolt a sejtciklus tovább haladása, valamint az S fázis meghosszabbodik. Ennek következtében a sejtek nem lépnek a mitózis fázisába és végül apoptotizálnak (Beger et al. 2007). A *Pax6* kifejeződése a retinsav jelátviteli útvonal szabályozása alatt is áll, a sejtekbe bejutó retinsav képes aktiválni a *Pax6* expresszióját (Ericson et al. 1997; Gajović et al. 1997). A korai neurális folyamatok során magas *Pax6* expresszió figyelhető meg, majd a differenciáció előrehaladtával szintje folyamatosan csökken (Farhy et al. 2013). A *Pax6* homozigóta *null* mutáns egerek nem sokkal születés után elpusztulnak, a heterozigótáknál pedig a szemlencse hiánya (Sey, Small eye) figyelhető meg (Favor et al. 2009; Kim and Lauderdale 2006). Emberben a *PAX6* gén mutációja aniridiát eredményez, melynek következtében a szem struktúrája rendellenes fejlődést mutat (Glaser, Walton, and Maas 1992; M.Hanson et al. 1993).

Korábban kimutattuk, hogy az *in vitro* neurális differenciáció során a *Pax6* szintje az *Rybp null* mutáns sejtvonalban a késői neurális állapotokban is magas marad, ami hozzájárulhat az *Rybp null* mutáns sejtek neurális differenciációs zavaraihoz (Ujhelly et al. 2015; Kovacs, Szabo, and Pírity 2016). Azt is megfigyeltük, hogy retinsav kezelés hatására az *Rybp null* mutáns sejtekben több neurális rozetta-szerű struktúra figyelhető meg, melyek a fokozottabb neuroektoderma

képződés jelei. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy az *Rybp* hiánya hozzájárul a neurális előalakok feldúsulásához.

2.5 Az RYBP, mint multimerikus komplexek tagja

Az RYBP (RING1 and YY1 Binding Protein, DEDAF= Death Effector Domain (DED)-Associated Factor) fehérje nevét a kölcsönható partnereiről kapta, melyek a RING1 (Ring Finger Protein 1, vagy RING1A) és a YY1 (Yin and Yang 1) (E García 1999). Mind az RYBP, mind pedig az említett kölcsönható partnerei a Polikomb fehérjecsaládba (PcG, Polycomb Group) tartoznak (Di Croce and Helin 2013). Az RYBP számos transzkripcióban fontos fehérjével képes kölcsönhatni. Így pl: az E2 Promoter Binding Factor (E2F) géncsalád tagjaival, melyek kölcsönhatnak más kanonikus és nem kanonikus Polikomb Represszor Komplexek (Polycomb Repressive Complex, PRC és non-canonical Polycomb Repressive Complex, ncPRC1) tagokkal is (E García 1999). Továbbá a DNS-kötő, YY1 fehérjével mely fontos szerepet tölt be a gének repressziójában és aktivációjában. Az RYBP, a YY1 valamint az E2F2 és E2F3 DNS-kötő fehérjék között összekötő fehérjeként működik, ezáltal a már korábban ismert represszor funkcióján kívül aktiváló szerepet is betölthet bizonyos gének szabályozásában (pl.: *Cdc6*) (Schlisio, Halperin, Vidal, Nevins, et al. 2002; E García 1999). Az RYBP más polikomb fehérjékkel is képes kölcsönhatásba lépni pl: Ring Finger Protein 2 (RNF2, vagy RING1B), RING1, Chromobox Homolog 2 (M33, vagy CBX2) (Pirity et al., 2005; Neira et al., 2009; Schlisio et al., 2002). RNF2-vel való kölcsönhatása kiemelkedő jelentőségű, mert az ncPRC1 esszenciális központi alegységeit alkotják. Kimutatták kölcsönhatását a kromatin módosító Brahma-related Gene 1-gyel (BRG1) is. A BRG1 tagja a SWI/SNF kromatin átrendező multiprotein komplexnek (npBAF, nBAF) melyek fontos szerepet játszanak a progenitor és terminálisan differenciált állapot közötti átkapcsolásban a neurális differenciáció során (Manuel et al. 2015). Ezeken felül az RYBP interakcióba lép a DED tartalmú apoptotikus fehérjékkel (FADD, pro-kaspáz 8, pro-kaspáz 10 és a sejtmagi DEDD), ezáltal elősegítve a sejthalálhoz vezető szignáltranszdukciós folyamatokat (Zheng et al. 2001). Továbbá azt is kimutatták, hogy az RYBP képes kapcsolatba lépni a virális apoptózis antagonistá Apoptotinnal. Hasonló profiluknak köszönhetően az RYBP képes indukálni a kaspáz függő apoptózist is. Az RYBP ezeken felül jelentős szerepet játszik az apoptózis indukálásában fontos célgének represszáálásában is. Az itt felsoroltak alapján elmondható, hogy az RYBP fontos szerepet tölt be az apoptózis folyamatának szabályozásában (Danen-van Oorschot et al. 2004). Az E2F család tagjai, melyekkel az RYBP képes kölcsönhatásba lépni,

fontos szerepet töltenek be a sejtciklus szabályozásában (Schlisio, Halperin, Vidal, and Nevins 2002). Az E2F fehérjék aktiválják a sejtciklus S fázisának inicializálásához szükséges Ciklin A és Ciklin E gének transzkripcióját (DeGregori and Johnson 2012). Kimutatták azt is, hogy az RYBP negatívan szabályozza a tumor szupresszor p53 aktivitását, amely a sejtciklus előrehaladásának lassításáért felelős p21 expresszióját indukálja (Novak et al. 2007; Sherr and Roberts 1995). Továbbá az RYBP képes kölcsönhatásba lépni a Mouse Double Minute 2 (MDM2) fehérjével, ezáltal csökkenteni az MDM2 közvetítette p53 ubiquitinálódását. Ez a p53 stabilizálódásához és aktivitás növekedéséhez vezet. Tehát, az RYBP elősegíti a sejtciklus leállítását és a p53 DNS károsodásra adott válaszát (D. Chen et al. 2009).

A polikomb fehérjék két fő komplexet alkotnak: az úgynevezett kanonikus PRC1-et (Polycomb Repressive Complex 1, PRC1) és PRC2-t (Polycombe Repressive Complex 2, PRC2), valamint újabban több nem-kanonikus PRC komplexet is leírtak (Gao et al. 2012; Schwartz and Pirrotta 2013; Turner and Bracken 2013). Ezek közül az RYBP fehérje a ncPRC1 komplex központi elemei közé tartozik (Gao et al. 2012; Vidal 2009). A PRC komplexek a fejlődésben szerepet játszó gének represszálásával fontos szerepet töltenek be a pluripotencia fenntartásában, ezáltal magában a differenciációs folyamatok gátlásában is. Újabban pedig aktiváló hatásukat is kimutatták (Monderer-Rothkoff et al. 2021; Schlisio, Halperin, Vidal, and Nevins 2002).

2.6 Az RYBP, mint fontos neurális szabályozó faktor

A polikomb fehérjék kulcsfontosságúak az embrionális őssejtek pluripotenciájának fenntartásában (pl. a differenciációs folyamatok represszálásával) és esszenciálisak a differenciáció elindításában (Joseph Alan Wamstad 2008). Ez utóbbi legtöbbször a represszor funkciójuk megszűnésével egyidejűleg következik be.

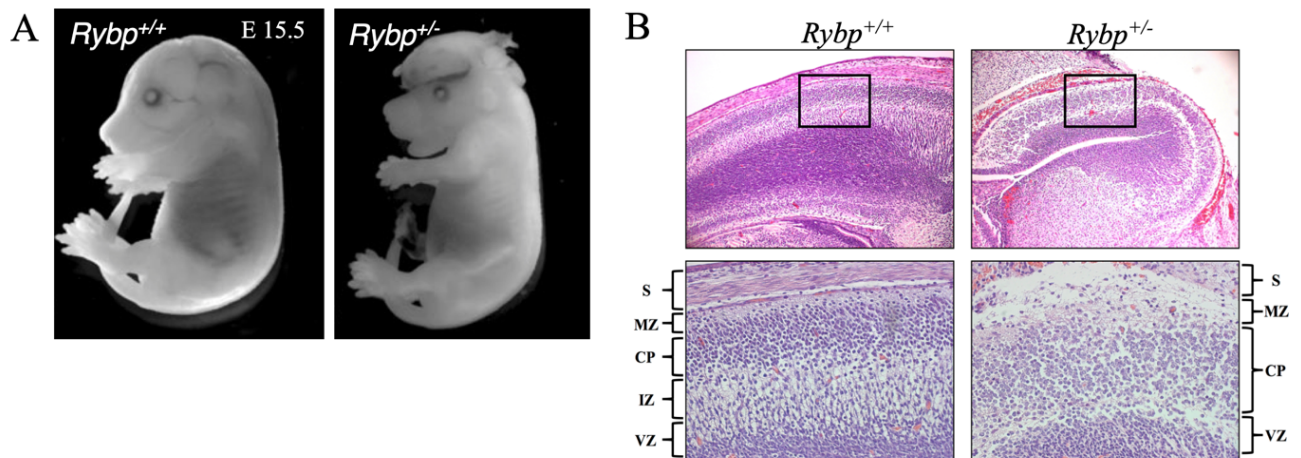
A ncPCR1 komplexek közül a neurális differenciációban kiemelkedő szerepet tölt be az ncPRC1.1 komplex, melynek központi tagja az RYBP mellett a RING1 vagy az RNF2, a Polycomb Group Ring Finger 1 (PCGF1, vagy Nervous System Polycomb 1 (NSPC1)), további tagjai a Lysine (K)-Specific Demethylase 2 (KDM2B, vagy F-Box Leucin-rich Repeat Protein 10 (FBXL10)), a BCL-6 Interacting Corepressor (BCOR) és az S-phase Kinase Associated Protein 1a (SPK1, vagy USP7) (Yan et al. 2017; Gearhart et al. 2006; Sánchez et al. 2007). A komplex tagok mutációi neurális fejlődési rendellenességeket okoznak. A PCGF1-et először a fejlődő perifériás idegrendszerben azonosították. A differenciálódás során elősegíti az ektoderma kialakulását, amelyből az idegrendszer is fejlődik (Yan et al. 2017; Nunes et al. 2001). A BCOR mutációját kimutatták több idegrendszert érintő megbetegedésben, mint a

retinoblasztóma vagy a medulloblasztóma (Temming, Corson, and Lohmann 2012; Pugh et al. 2013). Az egerek *Kdm2b* hiányában közvetlenül születés után elpusztulnak, mivel a velőcső nem záródik megfelelően, valamint változás figyelhető meg a neurális prekursor sejtek sejtciklusában (Fukuda et al. 2011). Az SKP1 RNS interferencia közvetített csendesítése a neurális sejtekben megnöveli az apoptózis mértékét (Mandel, Fishman-Jacob, and Youdim 2009). Delécioja a neurális sejtekben a *Kdm2b*-hez hasonlóan korai letalitást és agyi fejlődési rendellenességeket okoz (Kon et al. 2011). Funkcióvesztéses mutációját pedig összefüggésbe hozták olyan neurális fejlődési rendellenességekkel, mint a szellemi fogyatékoság vagy az autizmus (Hao et al. 2015).

A neurális fejlődésben az ncPRC1.5 komplexnek is jelentős szerepe van, amelyben a központi tagok mellett (RYBP; RING1/RNF2, Polycomb Group Ring Finger 5 (PCGF5), a Fibrosin (FBRs), a Casein Kinase 2 (CK2, vagy Casein Kinase 2 Alpha Prime Polypeptide (CSNK2A2)) valamint az Autism Susceptibility Candidate 2 (AUTS2) (Almeida et al. 2019). A komplex tagok közül az AUTS2-t először a központi idegrendszerben azonosították (Gao et al. 2014). Az idegrendszer fejlődésében betöltött szerepét jól bizonyítja, hogy mutációja egerekben a központi idegrendszer fejlődési rendellenességeit eredményezi, valamint csökkent szintje az őssejtek idő előtti neurális differenciációját váltja ki az agykéreg fejlődése során (Sultana et al. 2002; Oksenberg and Ahituv 2013; Monderer-Rothkoff et al. 2021). A CK2 fehérje két α (α és α') és két β (β és β') alegységgel rendelkezik (Buchou et al. 2003). A CK2 β alegysége képes kötni az Oligodendrocyte Transcription Factor 2-t (OLIG2), mely az oligodendrocita differenciáció egy fontos transzkripciós faktora. Mutációja zavart okoz az oligodendrocita képződésben (Huillard et al. 2010). A CK2 α alegységének hiánya embrionális letalitást (E9.5-E10.5) és velőcső záródási rendellenességeket okoz (Lou et al. 2008; Bajusz, Kovács, and Pírity 2018).

Csoportunk korábban kimutatta, hogy az *Rybp* kifejeződése esszenciális az egér embriogenezisben, mivel az *Rybp null* mutáns embriók beágyazódáskor elpusztultak. Az *Rybp* heterozigóta egerek egy részében pedig a fehérje csökkent szintje a központi idegrendszer fejlődési zavarait okozta: ilyen volt az előagy túlzott növekedése (4. ábra A), a kisagy hiánya, a velőcső záródásának elmaradása, valamint az agykéreg megfelelő rétegződésének zavara (4. ábra B) (Pírity, Locker, and Schreiber-Agus 2005). Csoportunk nemrég kimutatta, hogy az *Rybp null* mutáns sejt kultúrák *in vitro* neurális differenciációja is zavart szenved *Rybp* hiányában: az őssejtek képesek ugyan neurális őssejteket és neurális progenitor sejteket létrehozni, belőlük azonban kevesebb érett neuron, oligodendrocita és asztrocita képződött.

Szintén megfigyeltük, hogy a *Pax6* gén expressziója megemelkedett *Rybp* hiányában (Kovacs et al. 2016).



4. ábra: Az *Rybp* csökkent dózisának következtében megfigyelhető idegrendszeri rendellenességek egér embriókban (Pirity, Locker, and Schreiber-Agus 2005)

(A) Az *Rybp* heterozigóta egerek egy részénél az előagy túlzott növekedése figyelhető meg.

E 15.5: 15 és fél napos egér embriók, *Rybp*^{+/+}: vad típusú egér embrió, *Rybp*^{+/-}: *Rybp* heterozigóta egér embrió.

(B) Az *Rybp* heterozigóta egerek agykérge rendezetlen szerkezetet mutat.

Az agykéreg (neocortex) szerveződése *Rybp* heterozigóta (*Rybp*^{+/-}) egerekben eltérést mutat a vad típusúhoz (*Rybp*^{+/+}) képest. *Rybp* heterozigóta egerekben a kortikális lemez kiterjedtebb és az intermediér zóna hiányzik.

S: alap lemez, MZ: marginális zóna, CP: kortikális lemez, IZ: intermediér zóna, VZ: ventrikuláris zóna

2.7 Apoptózis jelátviteli útvonalak

Az apoptózisnak, vagy másnéven sejthalálnak több formája is ismert, melyek hozzájárulnak, hogy a többsejtű élőlények megszabaduljanak a szervezet számára már szükségtelen sejtektől, pl. amik feleslegben képződtek, nem rendelkeznek élettani funkcióval, fejlődésük során hiba keletkezett bennük, már betöltötték a szerepüket vagy a szervezetre veszélyessé váltak (Ameisen, Groux, and Capron 1992; Andrew G. Renahan, Catherin Booth 2001). Az egyik ilyen folyamat az úgynevezett „programozott sejthalál” vagy apoptózis (PCD, programmed cell death). Ezen folyamat során a többsejtű élőlényekben feleslegessé vált vagy károsodott sejtek genetikailag meghatározott módon elpusztulnak (J. F.R. Kerr, Wyllie, and Currie 1972). Az apoptózis normális, fiziológias válaszreakció a sejtekben jelentkező specifikus „öngyilkos” szignálokra vagy a „túlélő” szignálok hiányára. A folyamat szigorúan szabályozott, melyek során a sejtek elveszítik kapcsolatukat az extracelluláris mátrixszal és elkezdenek zsugorodni.

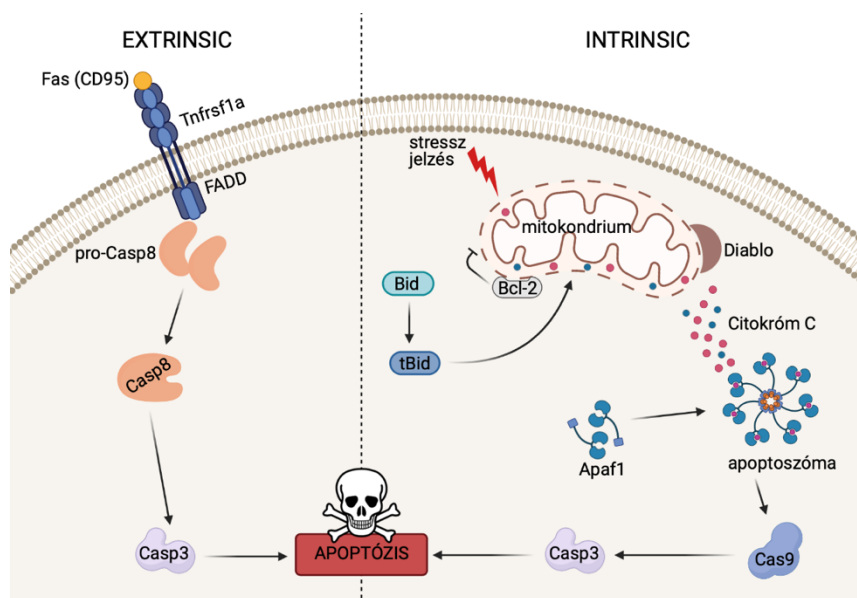
A sejtmag kondenzálódik, majd a DNS (Dezoxiribonukleinsav) tartalom és a sejtalkotók feldarabolódnak, a sejtmembrán szabálytalan alakot vesz fel (Pjaweletz et al. 2001; John F.R. Kerr 2002; Fujii et al. 1997; Nagata 2005). A folyamat végén a sejtek sejtmembránnal körülhatárolt citoplazma részleteket tartalmazó úgynevezett apoptotikus testekre esnek szét, melyeket a makrofágok és más fagocitózisra képes sejtek bekebeleznek. Ennek köszönhetően nem keletkezik gyulladás a szervezetben, mivel ezeknek az apoptotikus testek a tartalma nem kerül ki az extracelluláris mátrixba. Az apoptózisnak fontos szerepe van az embriogenezis során a szervek kialakításában, így fontos folyamata az egyedfejlődés mechanizmusának (Kiraz et al. 2016). Két külön apoptózis szignalizációs útvonalat különböztethetünk meg, a külső vagy sejthalál receptorokon keresztüli apoptózis jelátviteli útvonalat (Extrinsic apoptosis pathway) és a belső vagy mitokondriális apoptózis jelátviteli útvonalat (Intrinsic apoptosis pathway).

Az apoptózis külső szignál útvonalát az extracelluláris térből származó ligand molekulák aktiválják a sejtfelszínen található halálreceptor komplexeken keresztül (Gibert and Mehlen 2015), ilyenek pl. a Fas receptor (FasR) és a TNF receptor 1 (TNFR1), melyek intracelluláris régiója halál domén (DD, death domain) motívumokat tartalmaz. A receptorokat aktiváló halál ligandok, mint a Fas ligand (FasL) vagy a tumor nekrosis faktor (TNF α) hatására konformáció változás megy végbe a receptor intracelluláris halál domént is tartalmazó régiójában, ezzel lehetővé téve a FADD (Fas Associated via Death Domain) és TRADD (TNFR-associated death domain) adaptor molekulák receptor halál doménjéhez való kötődését (Chinnaiyan et al. 1995; Brenner, Blaser, and Mak 2015). A ligand-receptor kölcsönhatás a DISC (Death Inducing Signaling Complex) fehérje komplex kialakulásához vezet (Nagata 1997). A cisztein proteáz családba tartozó pro-kaspáz 8, vagy ritka esetekben a pro-kaspáz 10 kapcsolódik a DISC komplexhez, és autoproteolitikus aktiválódást követően további effektor kaspázokat pl.: kaspáz 3, 7 aktivál, melyek a kaspáz kaskád effektoraként különböző target fehérjék hasításán keresztül elindítják az apoptózis degradációs szakaszát (S. L. Chan and Mattson 1999; Kallenberger et al. 2015). Egyes esetekben az apoptózis folyamatának lezajlásához szükség van a BH3 kölcsönható domén halál agonista (BID, BH3 interacting-domain death agonist) kaspáz-8 általi aktiválására, mely aktiválja a kaspáz-9 függő apoptózist (Gross et al. 1999; Barnhart, Alappat, and Peter 2003).

Az apoptózis belső útvonalat citotoxikus vegyületek, stressz (hipoxia, reaktív oxigén gyökök (ROS) magas szintje) vagy más DNS károsító faktorok (ionizáló sugárzás) is képesek aktiválni (Tait and Green 2010). A mitokondrium által közvetített sejthalál esetén ezek a szignál

molekulák a B-sejtes limfóma 2 (Bcl-2) fehérjecsald pro- és anti-apoptotikus tagjai által szabályozva megnyitják a mitokondrium membránjában található magcsatornákat (PTPC, Permeability Transition Pore Complex), így különböző mitokondriális fehérjék jutnak a citoplazmába (Gzabotar et al., 2014; Moldovenau et al., 2014). Ezen fehérjék közé tartozik a Citokróm-C is, mely a citoplazmában komplexet képez az APAF1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1) fehérjével. Az így kialakult apoptoszóma képes aktiválni a pro-kaspáz 9-et (Li et al., 1997). Az aktív kaspáz 9 aktiválja a kaspáz kaszkádot a pro-kaspáz 3 és 7 hasítása révén, így elindítja a degradációs szakaszt (Harvey and Kumar 1998; Julien and Wells 2017). A lebontó szakaszban a sejtek további sorsát számos tumor szupresszor és protoonkogén szabályozza (Schorr et al. 1999).

Korábban kimutattuk, hogy retinsav kezelés hatására az *Rybp null* mutáns őssejtekből képzett EB-k morfológiája megváltozik, a retinsav kezeletlen EB-k nagyobb cisztákat képeztek melyek a differenciáció folyamatára utalnak. Továbbá azt is megfigyeltük, hogy a retinsav kezelésen átesett EB-k kisebbek és sötétebbek voltak, ami fokozottabb sejthalálra, illetve kavitációra utal. A kavitáció folyamata során az EB-k belsejében lévő sejtek apoptotizálnak és egy belső üreget hoznak létre. Feltételezzük, hogy *Rybp* hiányában az apoptózis folyamata felerősödik. Továbbá a retinsav kezelés hiánya befolyásolja az EB-k differenciációját.



5. ábra: Az apoptózis külső és belső jelátviteli útvonalának sematikus ábrázolása

Fas(CD95): Fas Cell Surface Death Receptor, Tnfrsf1a: TNF Receptor Superfamily Member 1A, FADD: Fas Associated Via Death Domain, pro-Casp8: pro-Caspase8, Casp8: Caspase8, Casp3: Caspase3, Cas9: Caspase9, Bid: BH3 Interacting Domain Death Agonist, Bcl-2: BCL2 Apoptosis Regulator, Apaf1: Apoptotic Peptidase Activating Factor 1

2.8 Nekrózis jelátviteli útvonalak

A nekrózis folyamata vagy másnéven nem programozott sejthalál (non-apoptotic cell death) nem jár kaspáz aktiválódással és nem része a normál egyedfejlődésnek. Abban az esetben következik be, amikor a sejteket olyan erős külső sejtkárosító hatás éri, hogy nem képesek az apoptózis folyamatának elindítására. Ilyen károsító tényezők lehetnek: a hipertermia, ozmotikus hatások és fizikai vagy kémiai trauma (Buja, Eigenbrodt, and Eigenbrodt 1993). Ebben az esetben a sejtek membránjai károsodnak és a sejtek tartalma az extracelluláris térbe kerül, ezzel gyulladásos folyamatot indukálva (Adameova et al. 2016; Leist and Jäättelä 2001). Az elmúlt években ennek ellenére felfedezték, hogy a nekrotikus sejthalálnak vannak programozott változatai is. Az egyik ilyen folyamat a nekroptózis, mely *in vivo* gyakori nem csak fizikai traumák következtében, de a neurodegeneráció különböző formáiban, valamint ischemia és fertőzés esetén is (Levine and Kroemer 2008). Ebben a programozott sejthalál típusban egy specifikus jelátviteli útvonal aktiválódik. A nekroptotizáló sejtekben az apoptózisban is szerepet játszó TNFR1 receptoron vagy halál receptor 6-on (DR6, Death receptor 6) keresztül történő kaspáz független szignalizáció hatására a receptor-kölcsönható protein kináz 1 és 3 (RIP1, 3; Receptor interacting protein kinase 1, 3) úgynevezett nekroptoszómát alkotnak. Az így kialakult komplex foszforillálja a kevert vonalú kináz domén szerű pszeudokinázt (MLKL; Mixed-lineage kinase domain-like pseudokinase) (Shan et al. 2018; Degterev et al. 2005; Alexei Degterev, Junichu Hitomi, Megan Gernscheid, Irene L Ch'en, Olga Korkina, Xin Teng, Derek Abbott, Gregory D Cuny, Chengy Yuan, Gerhard Wagner, Stephen M Hendrick, Scott A Gerber, Alexey Lugovskoy 2008). A MLKL ezt követően oligomerizálódik és pórust képez a plazmamembránban, amelyen keresztül sérülés-asszociált molekuláris mintázatokhoz tartozó molekulák (DAMP, Damage-associated molecular pattern) kerülnek az extracelluláris térbe, gyulladásos környezetet alakítva ki (Dillon et al. 2012; Holler et al. 2000; Bonnet et al. 2011; Lin et al. 1999; Shan et al. 2018).

Egy másik programozott nekrózis forma az úgynevezett piroptózis. Piroptózis során a sejteket elárasztó patogének hatására gyulladásos kaspáz aktiváció jön létre. A sejtekben a patogén-asszociált molekuláris mintázatok (PAMPs, Patogen-associated molecular patterns) felismerését követően inflammaszóma fehérje komplex alakul ki, amely a kaspáz 1 aktiválásán keresztül pórusképződéshez vezet, interleukin 1 β (IL1 β) és interleukin 18 (IL18) pro-inflammatorikus citokinek felszabadulását eredményezi (Shen and Codogno 2012; Iyer et al. 2009; Irrinki et al. 2011).

3. Célkitűzések

PhD dolgozatomban a RYBP és a retinsav jelátviteli útvonal kapcsolatát vizsgáltam egér embrionális őssejtek *in vitro* neurális differenciációja során. Az RYBP a Polikomb Represszor Fehérjék családjába tartozik, központi molekulája az ncPRC1 komplexeknek, ezáltal fontos szerepet tölt be a differenciáció folyamatában, a sejtciklusban és az apoptózisban. A retinsav szinten fontos szerepet játszik az embriogenezis folyamatában, mivel a fejlődő embrió anterion-poszterior tengelye mentén koncentráció grádiens létrehozva meghatározza a különböző sejttypusok kialakulását transzkripciós faktorok aktiválása révén. Előzetes kísérleti eredményeink arra utaltak, hogy az *Rybp* a retinsav indukálható gének, így a *Pax6* expressziójára is hatással lehet (2.4., 2.6).

Munkám során a következőket tűztem ki célul:

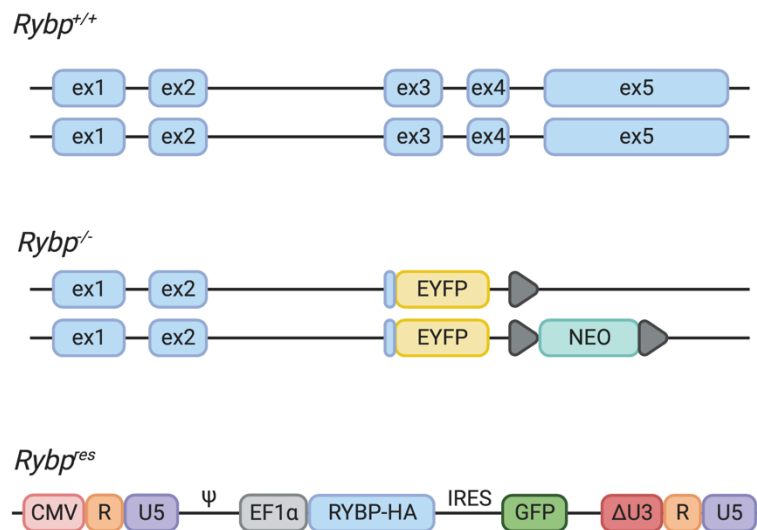
- Összehasonlítani, hogy a retinsav jelátviteli útvonal tagok expressziója hogyan változik vad típusú és *Rybp null* mutáns őssejtek *in vitro* neurális differenciációja során.
- Meghatározni, hogy az *Rybp null* mutáns sejt kultúrában megfigyelt emelkedett *Pax6* expresszió összefügg-e a retinsav kezeléssel.
- Meghatározni azt, hogy az *Rybp* képes-e a *Pax6* gént szabályozni és amennyiben igen akkor az Polikomb mediált úton történik-e.
- Megvizsgálni, hogy az *Rybp null* mutáns sejtekbe lentivirális módszerrel visszavitt, ektópikusan kifejeződő *Rybp* képes-e a retinsav jelátviteli útvonal, valamint annak target génje, a *Pax6* expressziójának menekítésére.
- Vizsgálni annak a lehetőségét, hogy a megváltozott retinsav jelátviteli útvonal hatással van-e az apoptózis és nekrosis folyamatára, valamint a sejtciklusra.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Alkalmazott sejtvonalak és tenyésztési körülmények

A kísérletekben egér ES vonalakat használtunk: R1 (*Rybp*^{+/+}, vad típus) (Nagy et al. 1993) és D11 (*Rybp*^{-/-}, *Rybp null* mutáns) (Pirity, Locker, and Schreiber-Agus 2005). Továbbá a laboratóriumunkban korábban létrehozott, az *Rybp*-t ektópikusan expresszáló, úgynevezett menekített (Res: Rescued) őssejtvonalakat (*Rybp*^{res6}, *Rybp*^{res40}) is alkalmaztunk. Ezek az őssejtvonalak az *Rybp null* mutáns sejtekből az *Rybp* cDNS lentivirális transzdukciójával lettek létrehozva (Ujhelly et al. 2015). Ebben a konstrukcióban az *Rybp* expresszióját egy erős virális promóter (EF1 α) biztosítja egy HA-taggal fuzionáltatva, valamint a vektor tartalmaz egy zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) is (6. ábra). A HA-tagek az ektópikus RYBP fehérje kimutatását tették lehetővé a sejtvonalak izolálásakor (Ujhelly et al. 2015).

Az embrionális őssejteket felhasználásig folyékony nitrogénben tároltuk. A sejteket mitomycin C-vel inaktivált egér embrionális fibroblaszt (MEF) rétegre olvasztottuk és 0.1% zselatinnal (Sigma, CatNo. 48723) bevont szövettenyésztő csészékben növesztettük. Az őssejteket őssejtes médiumban tartottuk fent, amely DMEM-et (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, CatNo.: 31966-021), 15% szérumot (FBS, Fetal Bovine Serum Gemini Stasis Stem Cell Qualified, West Sacramento, CA, USA, CatNo.: 100-125), 0,1 mM nem-eszenciális aminosavat (100x, PAA, CatNo.: M11-003), 0,1 mM β -merkaptotetanolt (Gibco, REF 31350-010), 1% nátrium-piruvátot (100mM, Gibco, CatNo.: 11360-070), 50 U/ml penicillin/sztreptomycin antibiotikumot (100x, PAA, CatNo.: P11-010) és leukémia-gátló faktort (LIF, Leukemia Inhibitory Factor, ESGRO, Chemicon/Millipore, Billerica, MA, USA) tartalmazott. A sejteket megközelítőleg 70%-os konfluenciáig növesztettük, majd passzáltuk. A passzálás során a sejteket 1x DPBS-sel (Phosphate Buffered Saline, Dulbecco's PBS (-Ca, -Mg) (1x); PAA; CatNo.: H15-002) mostuk, majd 2-5 percig 37°C-on tripszinben inkubáltuk. A tripszines (Trypsin-EDTA (1x) 0,05% / 0,02% in D-PBS, PAA, CatNo.: L15-004) kezelés hatására a sejtek leváltak a tenyésztőedény aljáról és egysejtes szuszpenziót alkottak. A sejteket ezt követően Bürker-kamra segítségével megszámoltuk és 100 mm átmérőjű Petri-csészében (LSP, CatNo.: LS6800) $2,2 \times 10^6$ sejtszámmal kultúrát indítottunk. A sejtenyészeteket inkubátorban (Contherm Mitre Series 4000) tartottuk fent, amely párás környezetet, 5% CO₂-t és állandó 37°C-os hőmérsékletet biztosít. Az őssejtes médiumot naponta cseréltük az őssejtkultúrákon.



6. ábra: Alkalmazott sejtvonalak

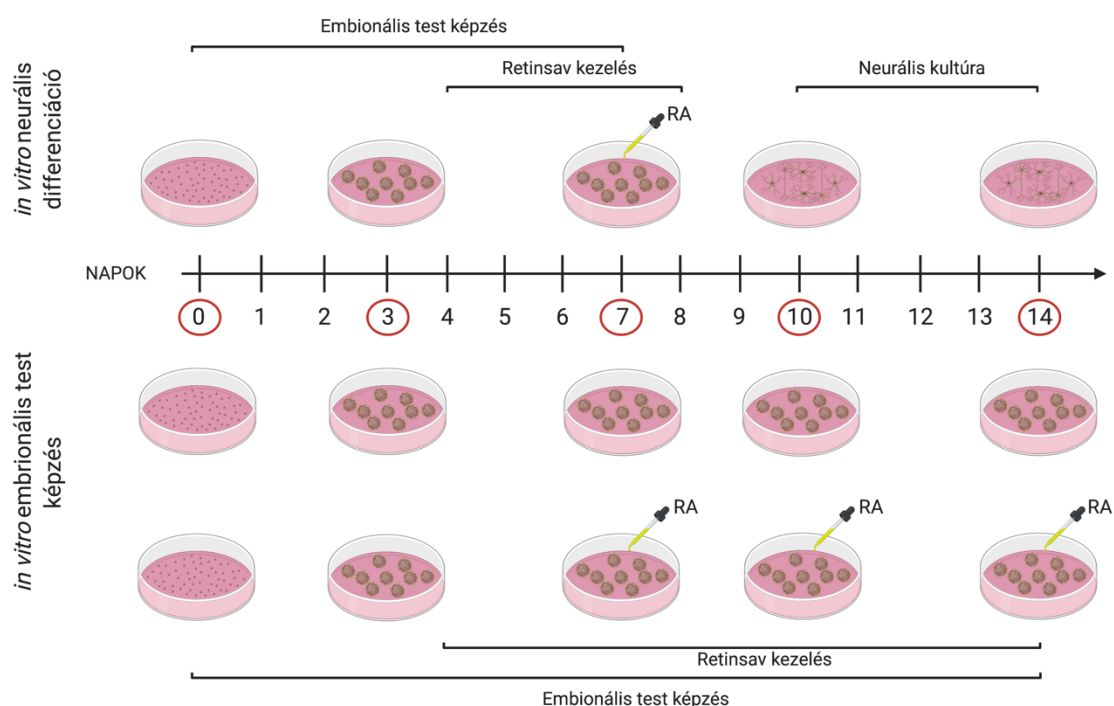
A vad típusú (*Rybp*^{+/+}) sejtek genomi lókusza 5 exonból áll. Az *Rybp* null mutáns (*Rybp*^{-/-}) sejtvonal a 3. exontól egy EYFP-t (Enhanced Yellow Fluorescent Protein – sárga fluoreszcens fehérje) és egy neomycin-foszfotranszferáz génkazettát tartalmaz. Az *Rybp* ektópikus expresszióját biztosító konstrukciókban (*Rybp*^{res6}/*Rybp*^{res40}) az *Rybp* expresszióját az EF1α erős virális promóter biztosítja. Az *Rybp* cDNS egy HA-taggel van fúzionáltatva, valamint bicisztronikusan átíródva egy GFP-t (Green Fluorescent Protein – zöld fluoreszcens fehérje) is tartalmaz. IRES: Internat Ribosomal Entry Site. CMW: Citomegalovírus promóter

4.2 Embrionális test képzés retinsav jelenlétében és hiányában, *in vitro* neurális differenciáció

Az *in vitro* neurális differenciáció módszerét Bibel és munkatársai által leírt módszer alapján végeztük, kisebb módosításokkal (Bibel et al. 2004). Az őssejteket 100 mm átmérőjű bakteriális csészébe helyeztük 4,5x10⁵ sejt/ml sejtsűrűségben, 10 ml LIF-et nem tartalmazó őssejtes médiumban. A bakteriális csészében a sejtek letapadása gátolt, ezáltal szuszpenziós sejtkultúrát tudtunk létrehozni, így a sejtek képesek voltak aggregálódni és EB-ket képezni. A tápoldatot a nyolcadik napig két naponta cseréltük. A negyedik napon neuroektodermális indukció céljából 5 μM retinsavat adtunk a kultúrához és további 4 napig retinsav jelenlétében tenyésztettük őket. Ezt követően a neurális differenciációhoz a 8 napos EB-ket tripszin segítségével disszociáltattuk és poli-L-ornitinnel (0.01%, Sigma, CatNo.: P4957) és lamininnel (Sigma, CatNo.: L2020-1MG) felületkezelt sejtenyésztő csészében 3x10⁵ sejt/cm² sűrűségben letapasztva tovább növesztettük két féle neurális médiumban (neurális A és neurális B médium). A neurális A médium DMEM/F-12 médiumot, 3 mg/ml D-(+)-glükózt, 3 mg/ml AlbuMax I-t, 50 U/ml penicillint és sztreptomocint, 1% N-2 supplement-et (100x, Gibco,

CatNo.: 17502-048) és 10 ng/ml rekombináns humán bFGF-et (Fibroblast Growth Factor Basic, human, Sigma, CatNo.: F0291-25UG) tartalmazott. A neurális B médium DMEM/F-12 és Neuronal Base Medium (PAA, CatNo.: U15-023) 1:1 arányú keverékét, 1 mM GlutaMax-ot, 3 mg/ml AlbuMax I-t, 50 U/ml penicillint és sztreptomicint, 0,5 % N-2 supplement-et és 1% B-27 supplement-et (50x, Gibco, CatNo.: 17504-044) tartalmazott. A letapasztás után egy nappal a neurális A médiumot cseréltük. A tizedik napon váltottunk neurális B médiumra, amelyet két nap múlva cseréltük a sejteken (7. ábra, *in vitro* neurális differenciáció).

Az általunk alkalmazott másik módszernél a 4. napon az EB-k egy részét retinsavval kezeltük, a másik részüket pedig retinsav kezelés nélkül tartottuk fent. Mindkét esetben az EB-k szuszpenziós kultúrában való fenntartása a 14. napig zajlott (7. ábra, *in vitro* embrionális test képzés). További vizsgálatok céljából mintákat vettünk az *in vitro* neurális differenciáció 0., 3., 7., 10., valamint 14. napjain (ábra jelöléseken: d0, d3, d7, d10, d14).



7. ábra: *in vitro* neurális differenciáció és embrionális test képzés

Az általunk alkalmazott neurális differenciáltatás sematikus ábrázolása. Az EB-k növesztése szuszpenziós kultúrában retinsav kezelés (RA) mellett és hiányában történt.

4.3 Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció

A relatív génexpresszió vizsgálatára kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakciót (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction; qRT-PCR) alkalmaztunk.

A sejtkultúrákból az *in vitro* neurális differenciáció 0, 3, 7, 10, és 14. napján mintát vettünk és a sejtekből RNS-t preparáltunk RNS izoláló kit (Qiagen RNeasy Plus Mini Kit; CatNo.:74134) használatával, a gyártó által mellékelte leírás alapján.

Az RNS koncentrációját WPA Photometer UV 110 spektrofotométerrel mértük meg. Reverz transzkripció PCR-rel cDNS-sé írtuk át az izolált RNS-t a gyártó által mellékelte leírás szerint (Applied Biosystems; High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; PN 43688/ LN 1304185). Az írtás eredményességét hagyományos PCR reakcióval ellenőriztük (a PCR mix a templáton és a primereken kívül a következőket tartalmazta: 10mM Taq DNS polimeráz (Thermo Scientific, CatNo.: EP0282) +10x Taq puffer, 10 mM dNTP mix, 25 mM MgCl₂, 11,3 µl dH₂O). Az RT-PCR és a PCR reakciók futtatása MJ Research PTC-200 P típusú PCR gépben történt. A kiértékelés során a génexpressziós változásokat a *Hprt* (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase), háztartási gén kifejeződéséhez normalizáltuk. Az alkalmazott primerek nevét és szekvenciáját az 1. táblázat tartalmazza.

Gén név	Forward primer	Reverse primer
<i>Apaf1</i>	5' ACTATTACACAGACCTTTCCATCC 3'	5' TTCCGTTTCCAAGTCCCAGA 3'
<i>Bcl2</i>	5' TGAGTACCTGAACCGGCAT 3'	5' AGAAATCAAACAGAGGTCGCA 3'
<i>Casp8</i>	5' TGCTGGCAGAAAATAACTTGG 3'	5' GTGGCAACTCTTCCCTTCC 3'
<i>Casp9</i>	5' GAAGATCAGGGGACATGCAG 3'	5' TGTGATGATGAGGCAGTGG 3'
<i>Crabp1</i>	5' CAGCAGCGAGAATTTTCGACGA 3'	5' CGCACAGTAGTGGATGTCTTGA 3'
<i>Crabp2</i>	5' ATGCCTAACTTTTCTGGCAACT 3'	5' CCTGTTTGATCTCGACTGCTG 3'
<i>Crbp1</i>	5' GACTTCAACGGGTACTGGAA 3'	5' CTTCAAGCAAGTTGGCGATTT 3'
<i>Crbp2</i>	5' AGGGAGACAAGCTGTACCTG 3'	5' CCGTGCCCATCACTTCTTTT 3'
<i>Cyp26a1</i>	5' TCCAACCTGCACGATTCCTC 3'	5' TGACTTCCTCAGCGATCACG 3'
<i>Cyp26b1</i>	5' AGAGAAGGCTATCCGTGAGA 3'	5' CATGGTCATCTCCTTGCCAT 3'
<i>Diablo</i>	5' ACTGGATTGTCATGACACTG 3'	5' TCGTACTGAGAGACTGAGGC 3'
<i>Fadd</i>	5' ACTTCGAGGCGGGGAC 3'	5' CACAATGTCAAATGCCACCTG 3'
<i>Fas</i>	5' CCAGTCGTGAAACCATACCA 3'	5' TTCAGCAATTCTCGGGATGT 3'
<i>Hprt</i>	5' AGTCCCAGCGTCGTGATTAG 3'	5' GCAAGTCTTTCAGTCTGTCC 3'
<i>Pax6</i>	5' CTTGGGAAATCCGAGACAGA 3'	5' CTAGCCAGGTTGCGAAGAAC 3'
<i>Raldh1</i>	5' GCTCTTCACCTGGCATCTTTA 3'	5' AGGGACAATGTTTACCACGC 3'
<i>Raldh2</i>	5' GAGGTATTATGCAGGCTGGG 3'	5' GGGCTCGTGTCTTGTA 3'
<i>Rarα</i>	5' CCAGCTTCCAGTCAGTGGTT 3'	5' AGGGAGGGCTGGGTACTATC 3'
<i>Rarβ</i>	5' ACAAGGTCAGTAGGAACCGA 3'	5' CCGCTGTCATCTCATAGCTC 3'
<i>Rdh10</i>	5' TACCTTGAGACACGGGCAT 3'	5' GCTTCACACAGTAATCAGGCT 3'
<i>Rdh14</i>	5' AGAACTGCTACAGGAGGAGC 3'	5' GTGGAAAACCCCGCATTAT 3'
<i>Rip1</i>	5' ACAAGGACCTGAAGCCTGA 3'	5' CTTCTTAGTGGTGCTGCTCA 3'
<i>Rxrα</i>	5' TGCCCATCCCTCAGGAAATA 3'	5' TCTTGAAGAAGCCCTTGCA 3'
<i>Rxrβ</i>	5' GATGGGCGACAGCGG 3'	5' GAGAAAGGGGATTTGGGGAG 3'
<i>Stra6</i>	5' CTGGTACATCGAGGAACCTCT 3'	5' CCAGGAACGACAGTGAAGCC 3'
<i>Tnf-RI</i>	5' CTGAGAGAAAGTGAGTGCGTC 3'	5' GGAGGTAGGCACAACCTCATAC 3'

Táblázat 1 – qRT-PCR reakciókhoz használt primerek listája

4.4 Immuncitokémia

Az immuncitokémiához (Immunocytochemistry, ICC) az EB-ket 100 mm átmérőjű bakteriális csészében növesztettük, majd 2 ml PBS-sel mostuk. Permeabilizálás céljából 1 ml permeabilizáló oldatot (0,2%-os Triton X-et (Sigma Triton X-100, CatNo.: T8787-250ML) + 1x PBS (-Ca; -Mg)) használtunk és szobahőmérsékleten inkubáltuk vele az EB-ket 20 percig. Ezt követően a blokkolást szobahőmérsékleten végeztük, 2 ml PBS-ben feloldott; 5%-os BSA tartalmú blokkoló oldattal (Albumin from Bovine Serum; Sigma; CatNo.: B2518) 1 órán keresztül. Az elsődleges antitesttel (PAX6, Hybridoma Bank, Iowa, USA, hígítás: 1:100 arányban; RYBP/DEDAF, Merck-Millipore, CatNo.: AB3637, hígítás: 1:1000; cIcASP3, Cell Signaling Technology, CatNo.: 9661, hígítás: 1:1000) 4°C-on, egy éjszakán keresztül inkubáltuk a mintákat. Az inkubálás során, az EB-ken a folyadék folyamatos keverését lassú himbálással biztosítottuk. Ezt követően a mintákat 2 ml PBS-sel 5x10 percen keresztül mostuk, majd blokkoló oldatban 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az EB-ket a másodlagos antitesttel (Alexa Fluor 647 Donkey anti Mouse IgG (H+L), Invitrogen, CatNo.: A-31571, hígítás: 1:1000; Alexa Fluor 488 Donkey anti Rabbit IgG (H+L), Invitrogen, CatNo.: A-21206, hígítás: 1:1000), 1 órán keresztül, 4°C-on inkubáltuk sötétben. Ezt követően 2 ml PBS-sel mosást végeztünk 3x10 percen keresztül, majd 2 ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, Vector Laboratories, CatNo.: H-1200) oldattal 20 percig szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk a mintákat. Végül 2-2 ml PBS-sel mosást végeztünk 2x10 percen keresztül szobahőmérsékleten. Az EB-ket 50%-os glicerol oldatban (50% glycerol (Sigma, CatNo.: G5516), 50% steril víz (Millipore)) fixáltuk tárgylemezen, majd fedőlemezzel fedtük le. Az így készített mintákat Olympus LSM konfokális mikroszkóp segítségével analizáltuk. A mikroszkópos felvételeken a jelintenzitás mértékét ImageJ program (Rasband, W.S., National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) alkalmazásával mértük meg.

4.5 Apoptózis/nekrózis jelölés

Az apoptotizáló, nekrotizáló és élő sejteket Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit (Promega, CatNo.: PK-CA707-30018) segítségével vizsgáltuk, a gyártó által mellékelt leírás alapján. Az apoptotikus sejteket fluoreszcein (FITC, $\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 492/514$ nm) jelölt Annexin V-tel azonosítottuk, mely egy 35 kDa-os kalcium-függő foszfolipid, amely specifikusan kötődik az apoptotikus sejtek külső membránján található foszfatidilszerinhez. A nekrotizáló sejteket ugyancsak fluoreszcensen ($\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 528/617$ nm) jelölt Ethidium Homodimer III-

mal (EthD-III) tettük láthatóvá, amely egy erősen pozitív töltésű nukleinsav próba, mely nem képes bejutni az élő vagy apoptotizáló sejtekbe, azonban a nekrotizáló sejteket intenzíven jelöli. Az élő sejteket Hoechst 33342-vel jelöltük, mely a DNS kis árkába kötődve kék fluoreszcens fényt bocsát ki.

4.6 Áramlási citometria

A retinsav kezelt és kezeletlen EB-ket (lásd 4.2 résznél) 10 μ M BrdU-val 37°C (5-bróm-2'-dezoxyuridin, Sigma, CatNo.: B9285-250MG) inkubáltuk 1 órán keresztül. Ezt követően tripszin segítségével az EB-kből egysejtes szuszpenziót képeztünk, majd kalcium és magnézium sóktól mentes 1x DBPS (-Ca, -Mg)-sel mostuk. A sejteket 20 percig fixáltuk jéghideg 70%-os etanolban, majd 2M-os sósav segítségével 20 percig denaturáltuk és 0,1 M-os nátrium borát ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, Molar Chemicals, CatNo.: 07470-101-190, pH 8,5) oldattal semlegesítettük. A sejteket 10 perces mosópufferrel (PBS-ben hígított 0,5% BSA) végzett mosás után elsődleges monoklonális anti-BrdU antitestet (BD Pharmagen CatNo.: 555627, hígítás: 1: 100) 0,5% BSA-t és 0,5% Tween20-t (Sigma Tween® 20, CatNo.: P5927-500M) tartalmazó oldattal jelöltük 30 percen keresztül szobahőmérsékleten. Mosópufferrel való 10 perces mosást követően a sejteket 30 percig szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk a megfelelő másodlagos antitesttel – Alexa Fluor® 647 (Invitrogen, CatNo.: A-31571, Donkey-Anti-Mouse, hígítás: 1: 1000). A sejteket újabb 10 perces mosás után felszuszpendátuk propidium jodidban (PI, Propidium-jodid, Sigma, CatNo.: P-4170; 10 μ g / ml 1x DPBS (-Ca, -Mg)-ben és 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezt követően Becton-Dickson FACS Calibur áramlási citométerrel (Palo Alto, Temecula, CA, USA) analizáltuk a mintákat. A méréseket 3 napos (d3), 7 napos retinsav kezelt és kezeletlen (d7 RA+/RA-), 10 napos retinsav kezelt és kezeletlen (d10 RA+/RA-) valamint 14 napos retinsav kezelt és kezeletlen (d14 RA+/RA-) EB-ken végeztük.

4.7 A Pax6 gén P1 promóter régió klónozása pGL4.20 vektorba

A Pax6 P1 promóterét PCR segítségével amplifikáltuk vad típusú (*Rybp*^{+/+}) R1 egér őssejtekből származó genomi DNS-ből génspecifikus 5'-ATATGGTACCTTTATTGTCAATCTCTGTCTT - 3' primerrel, amely tartalmazza a KpnI hasító helyet az 5' végén és 5' - ACGTGCTAGCCATATCTAATTACCTAAGTA - 3' primerrel, amely az NheI hasító helyet tartalmazza az 3' végén. Az így felamplifikált promóter

régiót 1%-os agaróz (Sigma, CatNo.: A4718-100G) gélen megfuttattuk és QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, CatNo.: 28706) gélizoláló kit segítségével tisztítottuk, a gyártó által megadott protokoll alapján. A tisztított PCR terméket KpnI (New England BioLabs, CatNo.: R0142S) és NheI (New England BioLabs, CatNo.: R3131S) restriktációs enzimekkel emésztettük, és a pGL4.20 luciferáz gént tartalmazó vektor ugyanazon helyére irányítottan klónoztuk.

4.8 Luciferáz riporter próba

HEK293 sejteket 4×10^4 sejt sűrűséggel 6 cm-es sejtenyésző csészékbe növesztettünk és különböző koncentrációban kalcium foszfát ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) transzfekciós módszer segítségével (Wigler et al. 1992; Kingston, Chen, and Rose 2003) kotranszfektáltuk a következő vektor kombinációkkal: pGL4-*Pax6*-Luc: 5 µg, pcDNA3.1-*Rybp*-HA: 1 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg (Arrighi et al. 2006) és pcDNA3.1-*Ring1*-FLAG: 1 µg, 10 µg. A kalcium-foszfát mediált transzfekciót az alábbiak szerint hajtottuk végre: 8 órával a transzfekció előtt a sejtenyésző médiumot lecseréltük, a transzfektálandó vektorokat TE (Tris-EDTA buffer solution, Sigma, CatNo.: T9285-100ML) pufferben hígítottuk, majd 2,5 M CaCl_2 -t és 2x HBS-t (Hepes pufferelt sóoldat, Hepes buffer solution, Sigma, CatNo.: 7365-45-9) csepegtettünk az oldathoz, miközben pasteur pipetta segítségével levegőt juttatunk az oldatba, majd az így előállított transzfektáló oldatból 250 µl-t a sejtek tenyésztőmédiumához adtunk. A transzfekció után 16 órával a sejtenyésző médiumot lecseréltük, majd 48 órával a transzfekció után a sejteket 1x DPBS (-Ca, -Mg)-sel mostuk és a luciferáz riporter próba kit-ben (Dual Luciferase Reporter Próbák System, Promega, CatNo.: E1500) található 1x passzív lízis pufferrel lizáltuk. Mindegyik mérési pontból 20 µg lizátumhoz 100 µl luciferáz teszt II reagenst adunk és Perkin Elmer TopCount NXT luminométer segítségével megmértük a luciferáz aktivitást. Minden mintát 3 technikai párhuzamossal mértünk.

4.9 Statisztika

A kísérletek eredményei minden alkalommal 3 különböző biológiai mintából származnak, a qRT-PCR, FACS és luciferáz riporter próba esetén minden biológiai mintából 3 technikai párhuzamost alakítottunk. Immuncitokémiai és fluoreszcensen jelölt minták esetében minden biológiai mintáról legalább 5 konfokális mikroszkóppal készült képet használtunk az ImageJ kiértékelés során. A kísérleteket EXCEL-ben t-próbával értékeltük ki, szórás a kísérletek

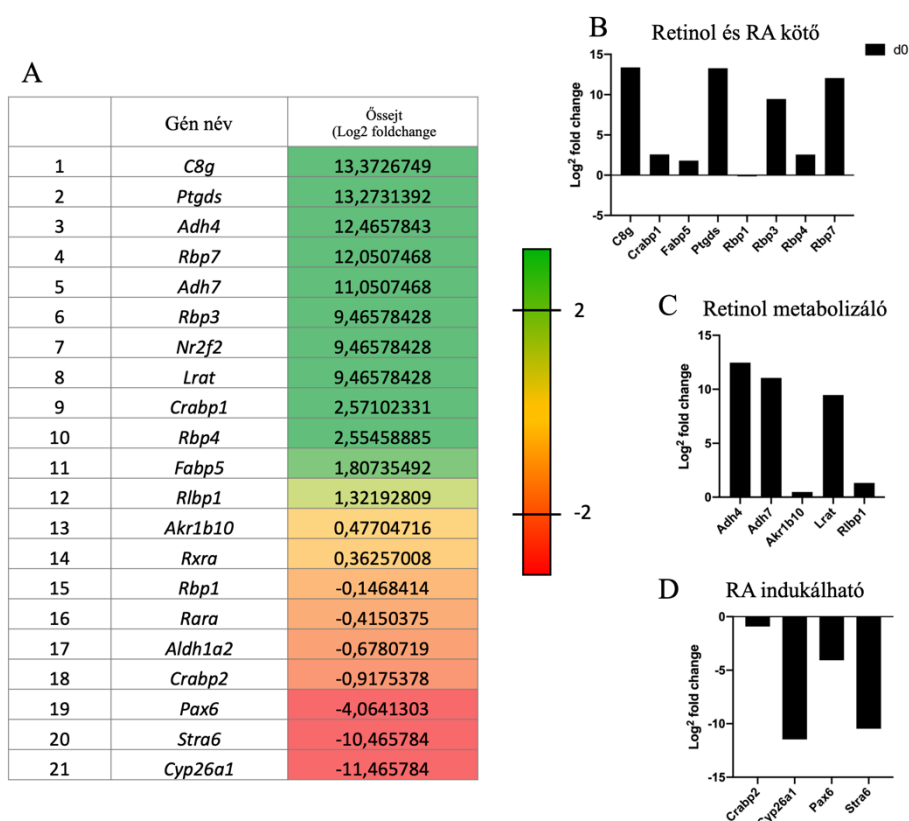
átlagaiból számoltunk. Szignifikánsnak a következő eredményeket tekintettük: $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

5. Eredmények

5.1 *Rybp* hiányában megváltozik az őssejtek retinsav jelátviteli útvonal tagjainak génkifejeződése a vad típushoz viszonyítva

Laboratóriumunkban korábban már kimutatták, hogy számos gén expressziója megváltozik az őssejtekben *Rybp* hiányában (Ujhelly et al. 2015; Bajusz et al. 2019). Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk vajon eltér-e az egyes retinsav jelátviteli útvonal tagok és az általuk szabályozott neurális transzkripció faktorok, így pl. a *Pax6* génexpressziója az *Rybp null* mutánsban a vad típushoz képest, a korábban a laboratóriumunk által publikált vad típusú és *Rybp null* mutáns őssejtekből származó transzkriptom adatok (Ujhelly et al. 2015) újra elemeztük. A génkifejeződés mértékének hierarchikus csoportosítását a vad típusú és *Rybp null* mutáns sejtek közötti különbségek (\log_2 fold change ≥ 2) alapján végeztük XLSTAT módszer segítségével (8. ábra A). Analízisünk során a retinsav jelátviteli útvonalban szerepet játszó géneket vizsgáltuk meg részletesebben. A csoport analízis alapján a retinol és a retinsav citoplazmatikus megkötésért felelős fehérjék génexpressziós szintje megemelkedik *Rybp* hiányában. A retinol sejten belüli kötéséért felelős *Rbp3* (Retinol Binding Protein 3), *Rbp7* (Retinol Binding Protein 7), *C8g* (Complement C8 Gamma Chain) és *Ptgsd* (Prostaglandin D2 Synthetase) jelentősen magasabb szinten fejeződik ki az *Rybp null* mutáns őssejtekben. Ezzel szemben az *Rbp1* esetén alacsonyabb mRNS szint volt megfigyelhető *Rybp* hiányában a vad típushoz képest. A *Crbp1* és az *Fabp5* (Fatty Acid Binding Protein 5) mRNS szintje, melyek a retinsav citoplazmában való megkötéséért és magi transzportjáért felelősek, magasabb volt az *Rybp null* mutáns sejtek esetében (8. ábra B). A retinol átalakításáért felelős enzimek, mint az *Adh4* (Alcohol Dehydrogenase 4), *Adh7* (Alcohol Dehydrogenase 7), *Akr1b10* (Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B10), *Lrat* (Lecithin Retinol Acyltransferase) valamint az *Rlbp1* (Retinaldehyde Binding Protein 1) ugyancsak magasabb génexpressziót mutattak *Rybp* hiányában (8. ábra C). Továbbá, azon gének esetében, melyek a retinsav jelátviteli útvonal szabályozása alá esnek jelentősen alacsonyabb génexpressziós szint volt megfigyelhető az *Rybp null* mutáns sejtekben. Ezek közé a gének közé tartozik a citoplazmatikus retinsav kötéséért felelős *Crabp2*, a felesleges retinsav lebontását végző *Cyp26a1*, a retinol felvételét biztosító transzmembrán receptor *Stra6* és a már említett neurális transzkripció faktor *Pax6* is (8. ábra D). Eredményeink alapján elmondható, hogy a retinol és a retinsav megkötéséért és metabolizmusáért felelős gének expressziós szintje megemelkedik, míg a lebontásért felelős gének szintje lecsökken *Rybp null* mutáns őssejtekben a vad típushoz képest. Ezen eredmények

arra utalnak, hogy a retinsav jelátvitelben fontos szerepet játszó gének expressziója már őssejtes állapotban jelentősen megváltozik *Rybp* hiányában.



8. ábra: A RA jelátviteli útvonal tagok génkifejeződése megváltozik *Rybp* hiányában az őssejtekben

(A) – RA jelátviteli útvonal tagok génexpressziós változása *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}) és vad típusú (*Rybp*^{+/+}) őssejtekben. (B) – Retinol és RA kötő fehérjék génkifejeződésének mértéke. (C) – Retinol metabolizáló enzimek génkifejeződésének mértéke. (D) – RA jelátviteli útvonal által indukált gének kifejeződésének mértéke.

Rövidítések: RA-retinsav

5.2 A retinsav jelátviteli útvonal tagok génexpressziója az *in vitro* neurális differenciáció során megemelkedik az *Rybp null* mutáns sejtekben

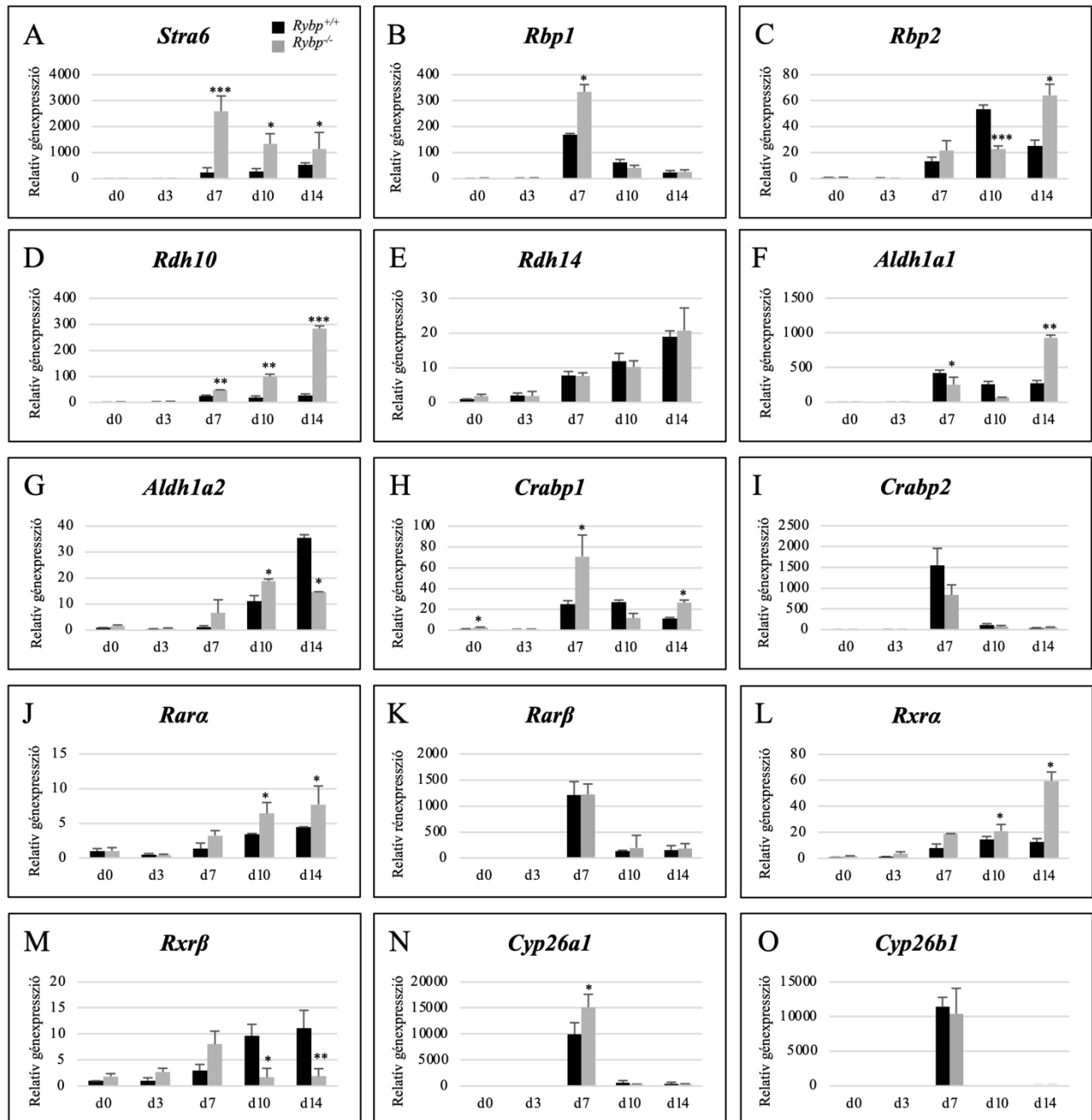
Ezen eredményeink alapján feltételeztük, hogy az *Rybp* jelenléte, illetve hiánya nemcsak az őssejtek retinsav jelátviteli útvonal tagjainak expressziójára, de magára a neurális differenciáció folyamatára is hatással van és befolyásolja a retinsav jelátviteli útvonalat az *in vitro* neurális differenciáció során. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az *Rybp* hiányának retinsav jelátviteli útvonalra gyakorolt hatását kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakciót végeztünk, ezzel megfigyelve a retinsav jelátviteli útvonal tagok relatív génexpressziójának változásait (lásd fentebb 4.3 résznél) az őssejtek *in vitro* neurális differenciációja során (lásd

fentebb 4.2 részénél). Ehhez az összejteket szuszpenziós kultúrában EB-kké aggregáltattuk és a 4.-8. napig retinsavval kezeltük, majd a 8. napon megfelelően felületkezelt szövettenyésztő csészékben egy sejtrétegben növesztettük tovább neurális kultúra képzés céljából. A génexpressziós vizsgálathoz RNS mintát vettünk a 0. napon (d0), mely az összejtes állapotnak felel meg, a 3. napon (d3), mely a retinsav kezeletlen EB állapotot jelöli, a 7. napon (d7), mely a retinsav kezelt EB állapotot reprezentálja, valamint a 10. napon (d10), ami egy korai neurális kultúrának felel meg és a 14. napon (d14), amely az érett neurális kultúrát jelöli. Az *in vitro* neurális differenciáció különböző időpontjaiban vett RNS mintákat reverz transzkripció segítségével cDNS-sé írtuk át.

Mivel a tenyésztőmédiumban található retinol a *Stra6* receptoron keresztül lép be a sejtekbe (2. ábra), elsőként a *Stra6* membrán receptor génexpressziós változásait vizsgáltuk. A vártak megfelelően mindkét sejtvonalban a retinsav kezelést követően (d7) megnő a szintje, ugyanakkor szignifikánsan magasabb expresszió volt megfigyelhető az *Rybp null* mutáns sejtvonalban a vad típushoz képest (9. ábra A). Ezt követően a citoplazmában található retinol megkötéséért felelős fehérje komplex tagjainak génexpresszióját vizsgáltuk. A *Crbp1* mRNS szintje a 7. napon (d7) volt a legmagasabb mindkét sejtvonalban, azonban az expresszió mértéke ezen időpontban *Rybp* hiányában kétszer akkora volt a vad típushoz képest (9. ábra B). Ezzel szemben a komplex másik tagjának, a *Crbp2*-nek az expressziója a vad típusban a 10. napon (d10) még az *Rybp null* mutáns sejtekben a 14-en (d14) érte el a legmagasabb szintet (9. ábra C). A továbbiakban megvizsgáltuk a retinolt retinállá (*Rdh*) és retinsavvá (*Raldh*) átalakító enzimek génexpressziós változásait is. Ezen enzimek mRNS szintje jelentősen megemelkedik a retinsav indukciót követően (d7). Az *Rdh10* expressziója a 10. napon ötször (18 vad típus/ 99 *Rybp null* mutáns), míg a 14-en már több mint tízszer (27 vad típus/ 284 *Rybp null* mutáns) magasabb szinten volt jelen az *Rybp null* mutáns sejtekben a vad típushoz képest (9. ábra D). Az *Rdh14* kifejeződése esetén nem találtunk szignifikáns különbséget a két sejtvonal között (9. ábra E). Az *Raldh1* expressziója a 14. napon volt a legmagasabb az *Rybp null* mutáns sejtekben és az indukció mértéke két és félszer nagyobb volt a vad típusú sejtekben mérthez képest (9. ábra F). Ezzel szemben a *Raldh2* a 7. és 10. napokon mutatott szignifikánsan magasabb génexpressziós szintet *Rybp* hiányában (9. ábra G). A citoplazmában található retinsavat a CRBP fehérje komplex köti. A *Crbp1* expressziójában szignifikáns különbségek a 0., 7., és 14. napokon voltak megfigyelhetők, ahol az *Rybp null* mutáns sejtvonal esetében magasabb szintű génkifejeződés volt megfigyelhető (9. ábra H). A *Crbp2* kifejeződésének kinetikájában nem találtunk jelentős különbségeket a vad típusú és *Rybp null* mutáns sejtek között (9. ábra I). A további génexpressziós vizsgálatok kimutatták, hogy a sejtmagban

található retinsav receptor komplex fehérjék is magasabb mRNS szintet mutatnak *Rybp* hiányában. Kimutattuk, hogy a *Rar α* expressziója szignifikánsan megemelkedik a 10. napon és négyszer magasabb szinten volt megfigyelhető *Rybp* hiányában az *in vitro* neurális differenciáció végén (d14) (9. ábra J). A *Rar β* mRNS kifejeződésében nem lehetett szignifikáns különbséget találni a két sejtvonal között (9. ábra K). A sejtmagi receptor komplex további tagjainak expressziója folyamatosan növekvő kinetikát mutatott retinsav kezelést követően. Az *Rxr α* magasabb expressziós szintet mutatott az összes vizsgált időpontban az *Rybp null* mutáns sejtekben (9. ábra L). Az *Rxr β* expressziója pedig háromszor magasabb volt *Rybp* hiányában a retinsav kezelést követően (d7) (9. ábra M). A citoplazmában feleslegben található retinsav lebontását végző *Cyp26a1* enzim génexpressziója a vártan megfelelően a retinsav kezelést követően volt a legmagasabb, mely még kifejezettebb volt az *Rybp null* mutáns sejtekben a vad típushoz képest (9. ábra N). A *Cyp26b1* expressziójában nem volt szignifikáns különbség a két sejtvonal között (9. ábra O).

Ezen eredmények arra utalnak, hogy a legtöbb retinsav jelátviteli útvonal tag génexpressziója megemelkedik *Rybp* hiányában az *in vitro* neurális differenciáció során. Ahogyan azt korábban az őssejtekben is megfigyeltük, a retinol és retinsav kötő, valamint metabolizáló fehérjék génexpressziója megemelkedik, míg a lebontásban szerepet játszó gének szintje lecsökken az *in vitro* neurális differenciáció során *Rybp* hiányában a vad típushoz képest.



9. ábra: A retinsav (RA) jelátviteli útvonal tagok génexpressziója megváltozik *Rybp* hiányában a vad típushoz képest

A RA jelátviteli útvonal tagok: *Stra6* (A) transzmembrán receptor, az intracelluláris retinol kötő komplex tagjai: *Crabp1* (B) és *Crabp2* (C), a retinolt retinállá alakító enzimek: *Rdh10* (D), *Rdh14* (E) valamint a retinál retinsavvá alakításért felelős enzimek: *Raldh1* (F), *Raldh2* (G), az intracelluláris RA kötő komplex tagok: *Crabp1* (H) és *Crabp2* (I), génrepresszió fenntartásáért felelős sejtmagi receptor komplex tagjai: *Rara* (J), *Rarβ* (K), *Rxra* (L), *Rxrβ* (M) valamint a retinsav felesleg lebontását végző enzimek: *Cyp26a1* (N), *Cyp26b1* (M) relatív génexpressziós változásainak vizsgálata qRT-PCR segítségével vad típusú (*Rybp*^{+/+}, fekete oszlop) és *Rybp* null mutáns (*Rybp*^{-/-}, szürke oszlop) sejtekben az *in vitro* neurális differenciáció során. A génexpressziós változásokat a *Hprt*, háztartási gén kifejeződéséhez normalizáltuk. A y tengelyen a génexpresszió mértékét, az x tengelyen a mintavételi napokat tüntettem fel. Szignifikancia: t-próba (p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 ***), Szórás: standard deviáció ± SD.

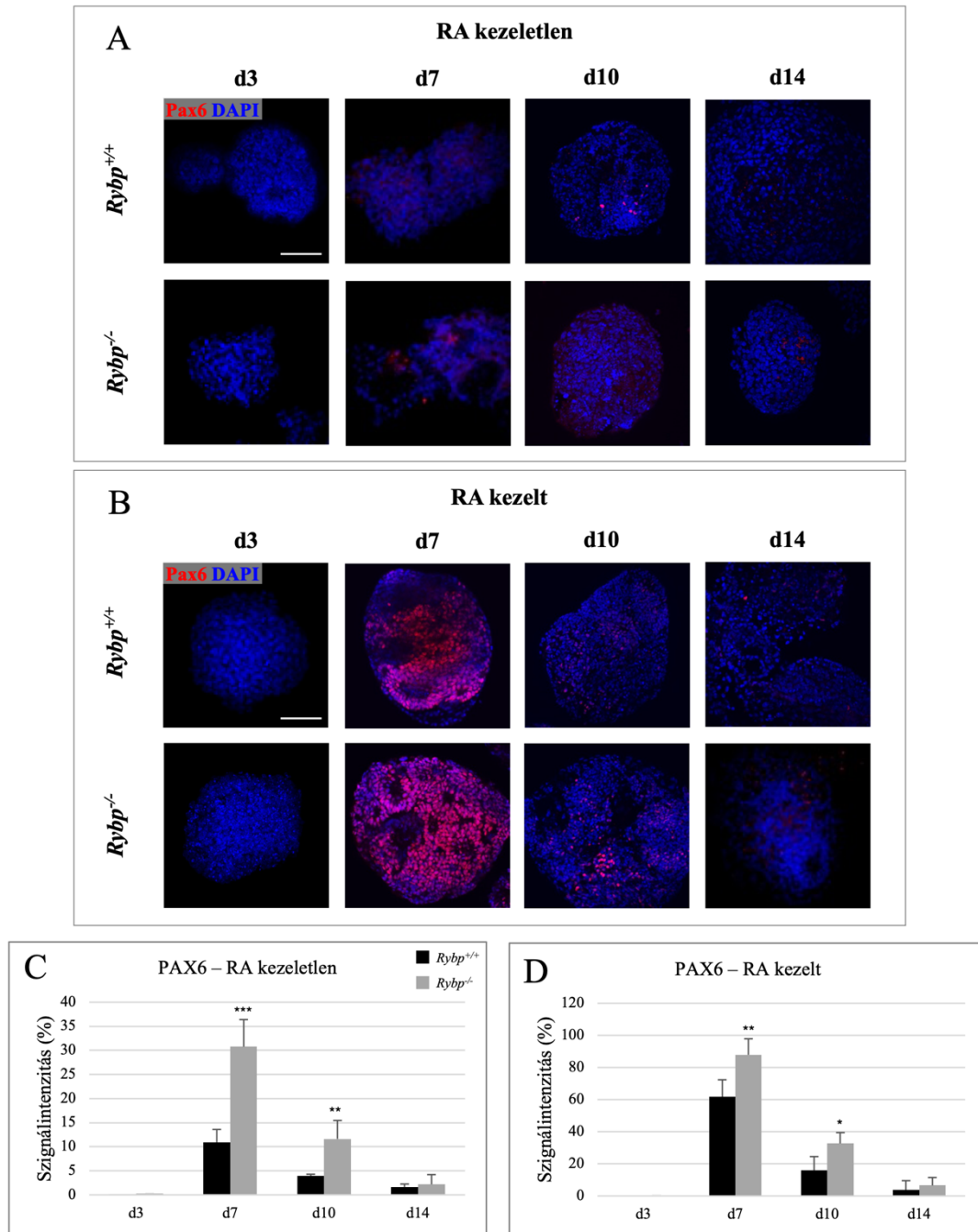
5.3 Retinsav kezelést követően a PAX6 fehérje szintje megemelkedik *Rybp* hiányában

Korábban már kimutattuk, hogy az *in vitro* neurális differenciáció során a *Pax6* megnövekedett mRNS expressziót mutat *Rybp* hiányában (Kovacs et al. 2016). Ezekben a kísérletekben a neurális differenciáció indukálása retinsav kezelés segítségével történt. Mivel a *Pax6* expressziója a retinsav jelátviteli útvonal szabályozása alatt áll, megvizsgáltuk, hogy a korábban megfigyelt expressziós különbséget a retinsav jelenlététől függetlenül az *Rybp* hiánya okozza-e vagy az a retinsav jelenlététől függ. Ennek megállapítására embrionális test formálási kísérletekből (lásd fentebb 4.2 résznél) származó retinsav kezelt és kezeletlen minták immuncitokémiai analízisét (lásd fentebb 4.4 résznél) végeztük el, vizsgálva a PAX6 kifejeződésének mértékét az EB-kben. A kísérlet során mintát vettünk a 3., 7., 10., és 14. napokon, majd az EB-ket anti-PAX6 ellenanyaggal jelöltük. A mintákat Olympus LSM konfokális mikroszkóp segítségével analizáltuk, majd a jel intenzitást ImageJ program segítségével kvantifikáltuk.

A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a PAX6 fehérje szintje a vártnak megfelelően alacsonyabb volt a retinsav kezeletlen embrionális testekben a retinsav kezelésen átesett embrionális testekhez képest. A retinsav kezeletlen mintákban a PAX6 fehérje kifejeződése a 10. naptól (d10) volt magasabb szinten megfigyelhető ellentétben a retinsav kezelt minták esetében. Retinsav kezelés hiányában is kimutatható volt a retinsav kezelt minták esetében a különbség a PAX6 kifejeződésében az *Rybp null* mutáns és vad típusú embrionális testek között (10. ábra B).

Ezzel szemben a retinsav kezelést (RA+) követően mind a vad típusú, mind az *Rybp null* mutáns sejtvonalakban megemelkedett a PAX6 fehérje szintje. A vártnak megfelelően ez az emelkedés a 7. napon (d7) volt a legkifejezettebb és a differenciáció előrehaladtával folyamatosan csökkent a fehérje mértéke (10. ábra A). A PAX6 szintje a retinsav kezelt embrionális testek esetén magasabb volt *Rybp* hiányában a vad típusúhoz képest, melyet az ImageJ analízis eredményei is alátámasztanak (10. ábra D). Az ImageJ kvantifikáció alapján elmondhatjuk, hogy retinsav kezelés hatására a PAX6 fehérje szintje minden vizsgált időpontban magasabb volt a vad típusúhoz képest, amely a differenciáció végén volt a legkifejezettebb (10. ábra C, D).

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az *Rybp* hiánya retinsav kezelés nélkül is hatással van a *Pax6* expressziójára és a róla képződő fehérje mennyiségére, mely retinsav kezelés hatására még erőteljesebb.



10. ábra: A retinsav (RA) jelátviteli útvonal target PAX6 mennyisége megemelkedik *Rybp* hiányában.

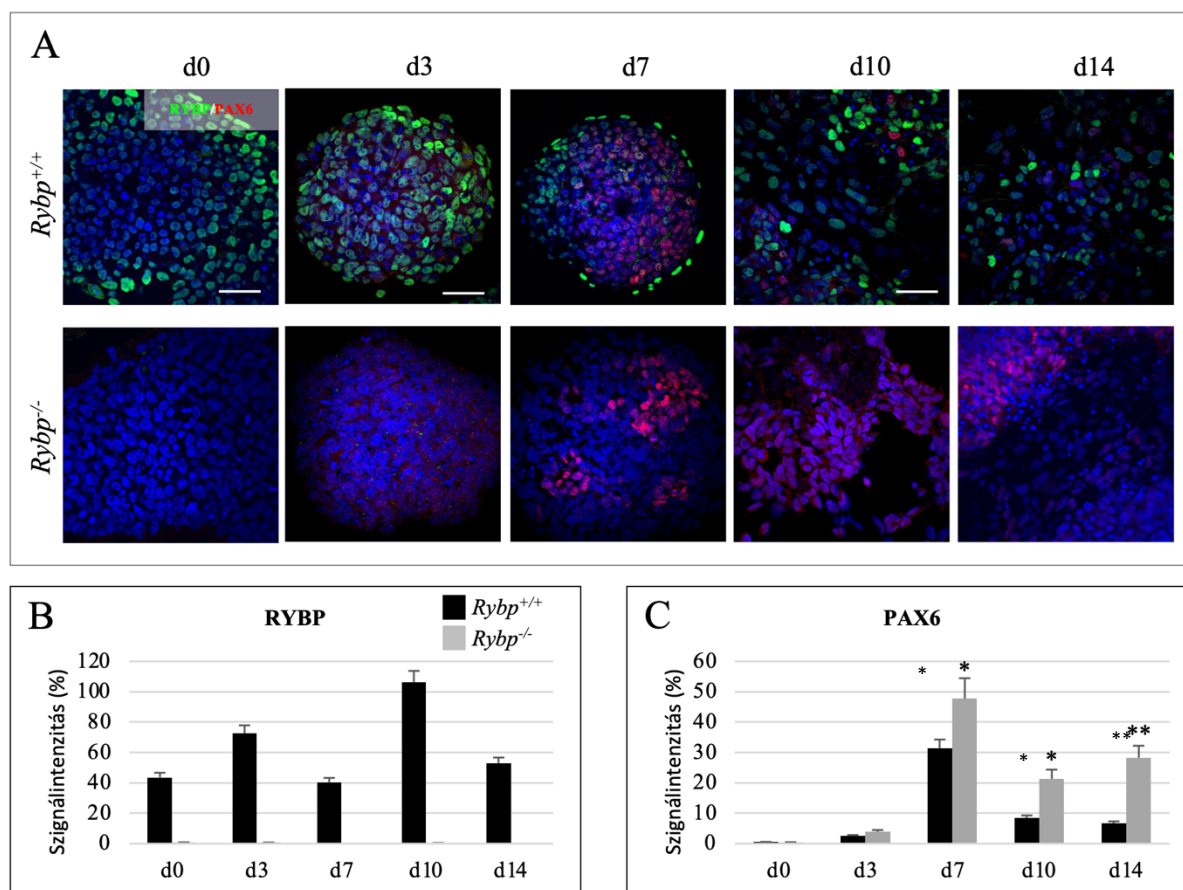
(A) – RA kezeletlen vad típusú (*Rybp*^{+/+}) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}) EB-k PAX6 immunfestése. Pirossal a PAX6 pozitív sejtek, míg késsel a sejtmagok láthatók. (B) – RA kezelt vad típusú (*Rybp*^{+/+}) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}) EB-k PAX6 immunfestése. Pirossal szintén a PAX6 pozitív sejtek, késsel a sejtmagok láthatók.

Olympus LSM konfokális mikroszkóp, Objektív: 40x, Lépték: 80 µm. (C) – PAX6 kifejeződésének kvantifikációja ImageJ program segítségével RA kezeletlen vad típusú (*Rybp*^{+/+}, fekete oszlop) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}, szürke oszlop) EB-kben. (D) – PAX6 kifejeződésének kvantifikációja ImageJ program segítségével RA kezelt vad típusú (*Rybp*^{+/+}, fekete oszlop) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}, szürke oszlop) EB-kben. A grafikonok y tengelyén az ImageJ programmal mért jelintenzitás százalékban, az x tengelyen a mintavételi napok lettek feltüntetve. Szignifikancia: t-próba (p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 ***), Szórás: standard deviáció ± SD.

5.4 Az RYBP és PAX6 fehérjék kifejeződése dinamikusan változik az *in vitro* neurális differenciáció során

Mivel a retinsav kezeletlen EB-ben is egy már eleve megemelkedett PAX6 szint volt detektálható *Rybp* hiányában, megvizsgáltuk az RYBP és a PAX6 egymáshoz viszonyított sejten belüli lokalizációját. Ehhez az *in vitro* neurális differenciáció során mintát vettünk a 0., 3., 7., 10., és 14 napokon (lásd fentebb 4.2 résznél) majd a sejteket anti-DEDAF (RYBP) és anti-PAX6 ellenanyagokkal jelöltük (lásd fentebb 4.4 résznél). A mintákat Olympus LSM konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk, majd a képek intenzitás analíziséhez az ImageJ szoftvert alkalmaztuk.

A vártak megfelelően az *Rybp null* mutáns sejtekben nem volt látható RYBP jel és a PAX6 mennyisége a vad típussal ellentétben a differenciáció végén is magas maradt (11. ábra A, B). A vad típusú sejtekben az RYBP mennyisége az összejtes (d0) és korai differenciációs állapotban (d3) volt a legmagasabb. A differenciáció során az RYBP mennyisége a retinsav kezelést követően (d7) csökken, míg a PAX6 szintje emelkedik. A differenciáció későbbi szakaszaiban (d10, d14) a PAX6 szintjének csökkenése mellett az RYBP mennyiségének emelkedése figyelhető meg (11. ábra A, C). Azokban a sejtekben, amelyekben nem figyelhető meg RYBP expresszió, magasabb PAX6 kifejeződés tapasztalható, valamint a két fehérje nem, vagy csak ritka esetekben fejeződik ki egyazon sejtben. A kapott eredmények tovább erősítik azt a feltevést, miszerint az RYBP represszált állapotban tartja a PAX6 gén kifejeződését.



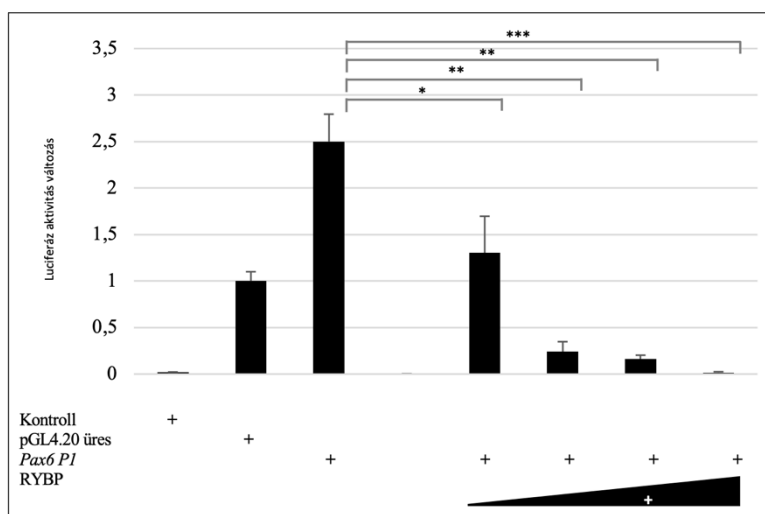
11. ábra: Az RYBP és a PAX6 nem fejeződik ki együtt a neurális differenciáció során az általunk vizsgált időpontokban

(A) vad típusú (*Rybp*^{+/+}) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}) sejtek PAX6 és RYBP (DEDAF) kettős festése az *in vitro* neurális differenciáció során. Olympus LSM konfokális mikroszkóp, Objektív: 60x a 0., 10., és 14. napokon, Objektív: 40x a 3. és a 7. napokon, Lépték: 100 μ m a 10. és 14. napokon, 80 μ m a 3. és 7. napokon. Kékkel a sejtmagokat, pirossal a PAX6, míg zöldel az RYBP pozitív sejtek láthatók. (B) RYBP kifejeződésének kvantifikációja ImageJ program segítségével RA kezeletlen vad típusú (*Rybp*^{+/+}, fekete oszlop) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}, szürke oszlop) mintákban. (C) PAX6 kifejeződésének kvantifikációja ImageJ program segítségével RA kezeletlen vad típusú (*Rybp*^{+/+}, fekete oszlop) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}, szürke oszlop) mintákban. A grafikonok y tengelyén az ImageJ programmal mért jelintenzitás, az x tengelyen a mintavételi napok lettek feltüntetve. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **), Szórás: standard deviáció \pm SD.

5.5 Az RYBP represszálja a *Pax6* expresszióját a *PI*-es promóterén keresztül

Annak a lehetőségét, hogy az RYBP képes-e szabályozni a *Pax6* gén transzkripcióját luciferáz riportert próba alkalmazásával vizsgáltuk. Ennek vizsgálatára a *Pax6* *PI*-es promóterét használtuk, mivel erről a promóterről íródik át a *Pax6* a legkorábban a neurális fejlődés során. A kísérlet elvégzéséhez HEK293 sejteket a *Pax6* *PI*-es promóter régióját tartalmazó luciferáz vektorral (lásd fentebb 4.7 résznél), valamint az *Rybp* cDNS-ét tartalmazó vektorral (Arrigoni

et al. 2006) együttesen transzfektáltuk (lásd fentebb 4.8 résznél). Az *Rybp* cDNS-ét tartalmazó vektort különböző koncentrációkban (1 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg) transzfektáltuk a sejtekbe. A transzekciót követő második napon a sejteket lizáltuk és megmértük a luciferáz aktivitásukat. A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy az RYBP a *Pax6* expresszióját represszálta. A különböző *Rybp* cDNS koncentrációk esetén mért luciferáz aktivitás egyenes arányban csökkent az *Rybp* koncentrációjának növekedésével (12. ábra). Ezen eredmények alapján kijelenthetjük, hogy az RYBP koncentráció függő módon képes represszálni a *Pax6* génexpresszióját, annak *P1*-es promóterén keresztül.



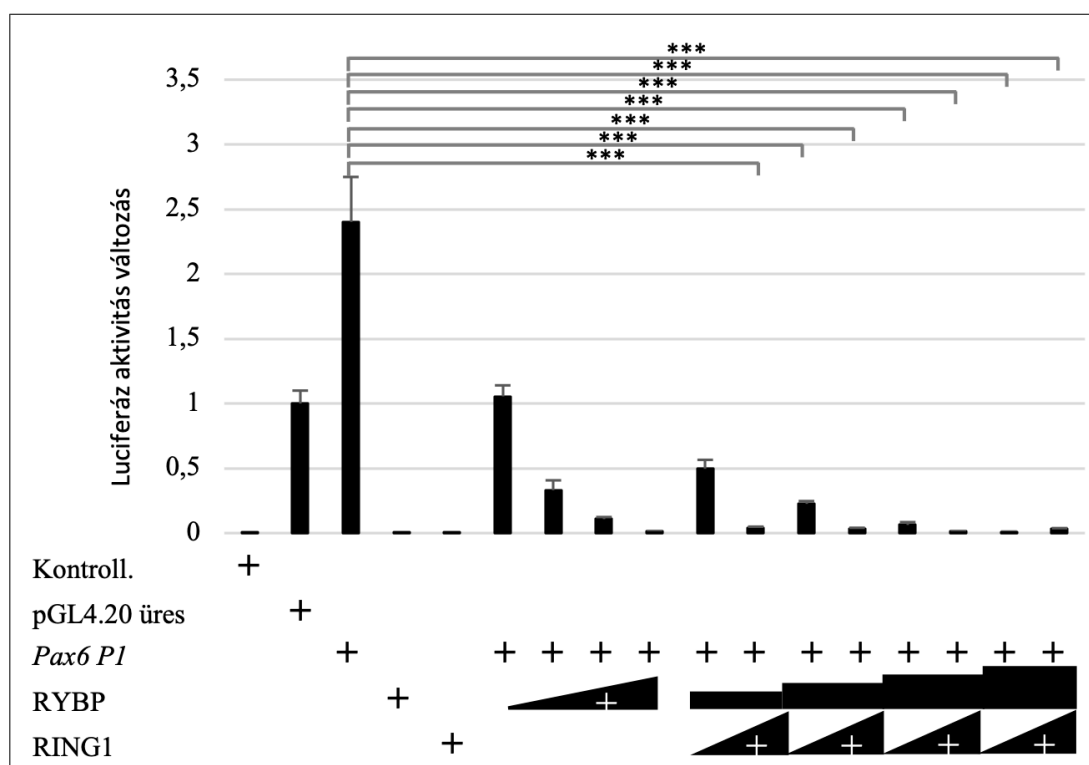
12. ábra: Az RYBP dózisfüggő módon szabályozza a *Pax6* kifejeződését.

A luciferáz aktivitás mértéke kontroll (HEK293 sejtek), üres, valamint *Pax6 P1* promóter tartalmazó pGL4.20, *Pax6 P1* promótert és különböző koncentrációban kotranszfektált *Rybp* (1 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg) cDNS-t tartalmazó sejtekben. A luciferáz aktivitás mértékét minden esetben az üres pGL4.20 luciferáz aktivitásához korrigáltuk. Az y tengelyen a luciferáz aktivitás mértéke üres pGL4.20 vektorra normalizálva, az x tengelyen a különböző transzekciós konstrukciók vannak feltüntetve. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***), Szórás: standard deviáció \pm SD.

5.6 Az RYBP Polikomb függő módon represszálja a *Pax6* kifejeződését

Mivel az RYBP többféle módon, és többféle komplexen keresztül is képes kifejteni hatását megvizsgáltuk, hogy a *Pax6* transzkripciójának gátlásában az ncPRC1 komplexeken keresztül fejt-e ki hatását. Ehhez ismét HEK293 sejteket kotranszfektáltuk a *Pax6 P1*-es promóter régióját tartalmazó luciferáz vektorral (lásd fentebb 4.7 résznél), valamint az *Rybp* cDNS-ét tartalmazó vektoron felül a PRC1 komplex katalitikus ubiquitin ligáz alegységének, a *Ring1*-nek a cDNS-ét tartalmazó vektorral. A kísérlet során az *Rybp* (1 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg) és a *Ring1* cDNS-ét (1 µg, 10 µg) tartalmazó vektorokat különböző koncentrációkban alkalmaztuk.

A transzfekciót követő második napon a sejteket lizáltuk és megmértük a luciferáz aktivitásukat (lásd fentebb 4.8 résznél). A kísérlet során minden esetben erősebb repressziót figyeltünk meg abban az esetben, amikor az *Rybp* és a *Ring1a* cDNS-ét együtt juttattuk be a sejtekbe (13. ábra). A kapott eredmények arra utalnak, hogy az RYBP hatását a RING1-gyel együtt fejti ki. Így valószínűsíthető, hogy a Polikomb Represszor Komplex tagjaként szabályozza a *Pax6* expresszióját.



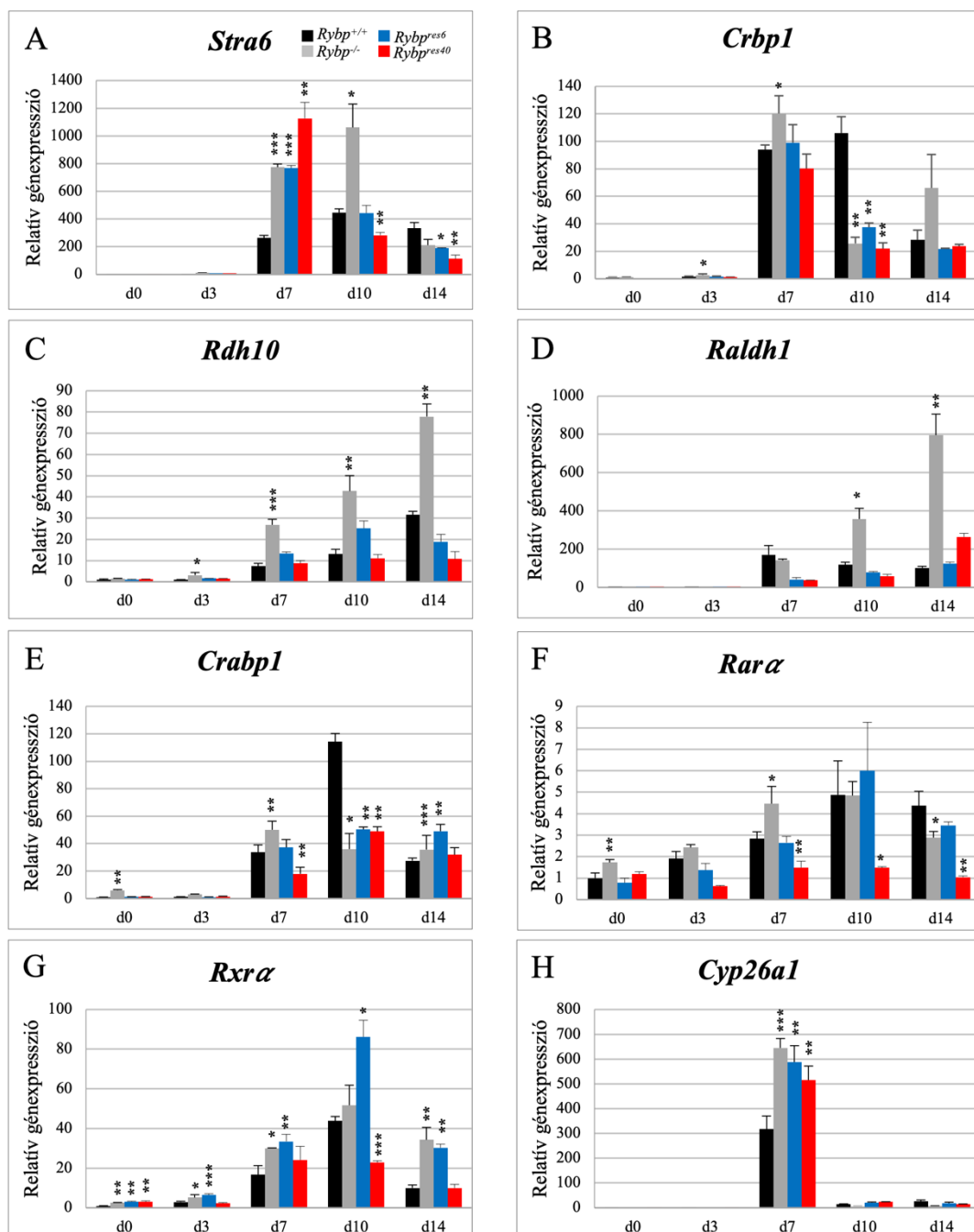
13. ábra: Az RYBP Polikomb függő módon hat a Pax6 P1-es promóterre.

A luciferáz aktivitás mértéke kontroll (HEK293 sejtek), üres valamint *Pax6 P1* promóter tartalmazó pGL4.20, *Pax6 P1* promótert és különböző koncentrációban kotranszfektált *Rybp* (1μg, 5μg, 10μg, 20μg) és *Ring1* (1μg, 10μg) cDNS-t tartalmazó sejtekben. A luciferáz aktivitás mértékét minden esetben az üres pGL4.20 luciferáz aktivitásához korrigáltuk. Az y tengelyen a luciferáz aktivitás mértéke, az x tengelyen a különböző transzfekciós konstrukciók vannak feltüntetve. Szignifikancia: t-próba (p<0.001 ***), Szórás: standard deviáció ± SD.

5.7 Az ektópikus *Rybp* menekíti a retinol metabolizmus enzimek génexpresszióját

A retinsav jelátviteli útvonal tagok génexpressziója megemelkedik az *in vitro* neurális differenciáció során *Rybp* hiányában. A továbbiakban qRT-PCR segítségével vizsgáltuk (lásd fentebb 4.3 résznél), hogy az *Rybp* cDNS visszajuttatása az *Rybp null* mutáns sejtekbe milyen hatással van a retinsav jelátviteli útvonal tagok mRNA expressziójának változására a neurális differenciáció során. Ehhez a vad típusú és *Rybp null* mutáns sejtvonalak mellett a laboratóriumunkban már korábban lentivírus által mediált génbeviteli módszerrel előállított, ektópikus *Rybp* expressziójára képes sejtvonalakokat használtunk (*Rybp^{res6}*, *Rybp^{res40}*) (Ujhelly et al. 2015). A génexpresszió vizsgálatához mintát vettünk az *in vitro* neurális differenciáció 0., 3., 7., 10., és 14. napján (lásd fentebb 4.2 résznél). Elsőként a retinol sejtekbe jutásáért felelős transzmembrán receptor, a *Stra6* génexpresszióját vizsgáltuk. A *Stra6* expressziója a retinsav kezelést követően (d7) a menekített sejtvonalakban (*Rybp^{res6}*, *Rybp^{res40}*) az *Rybp null* mutáns sejtekhez hasonlóan magasabb szintet mutatott a vad típushoz képest. A differenciáció későbbi időpontjaiban (d10, d14) szintje a vad típusú és menekített sejtvonalakban drasztikusan lecsökkent (14. ábra A). A *Crbp1* expressziója, mely a citoplazmába jutó retinol megkötéséért felelős CRBP komplex tagja, a *Stra6*-hez hasonlóan minden sejtvonalba a 7. napon mutatta a legmagasabb expressziót. A 10. napon a menekített és az *Rybp null* mutáns sejtvonalakban egyharmadára lecsökken a *Crbp1* expressziója a vad típushoz képest (14. ábra B). Ezt követően megvizsgáltuk a retinolt retinállá (*Rdh10*) és a retinált retinsavvá (*Raldh1*) alakító enzimek génexpressziós változásait is. A menekített sejtvonalakban mind az *Rdh10* (14. ábra C), mind pedig a *Raldh1* (14. ábra D) mRNA szintje közel azonos volt a vad típusnál megfigyelt értékekkel az *in vitro* neurális differenciáció minden vizsgált időpontjában. A citoplazmában található retinsav megkötését a CRABP komplex végzi, így megvizsgáltuk a *Crabp1* expressziós változásait. A *Crabp1* expressziója vad típusban a 10. napon éri el a legmagasabb szintet, ehhez képest a többi sejtvonalba az expresszió mértéke a felére csökken (14. ábra E). A továbbiakban vizsgáltuk a sejtmagban található receptor komplex tagjainak mRNA változásait. Az *Rybp^{res6}* sejtvonala esetén a *Rarα* expressziója nagymértékben megegyezik a vad típusú sejteknél megfigyelttel. Ezzel szemben az *Rybp^{res40}* sejtvonalba a differenciáció minden vizsgált időpontjában alacsonyabban expresszáldott a *Rarα* a vad típushoz képest (14. ábra F). A receptor komplex másik tagjának, az *Rxrα*-nak az expressziója az *Rybp^{res6}* sejtvonalba magasabb szinten volt megfigyelhető az *Rybp null* mutánshoz hasonlóan. Az *Rybp^{res40}* sejtvonalba az *Rxrα* szintje a *Rarα* kifejeződéséhez hasonlóan alacsonyabb volt a

differentiáció során a vad típushoz képest (14. ábra G). A vártak megfelelően a citoplazmában feleslegben található retinsav lebontásáért felelős *Cyp26a1* enzim génexpressziója a retinsav kezelést követően (d7) volt a legmagasabb, mely még magasabb szinten volt megfigyelhető a menekített, valamint az *Rybp null* mutáns sejtvonalakban (14. ábra H). A kapott eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az ektópikus *Rybp* a retinsav jelátviteli útvonal tagok génexpressziója esetén megfigyelt fenotípust részlegesen, míg a retinol retinsavvá alakításában fontos szerepet játszó gének kifejeződését teljes mértékben helyreállítja.

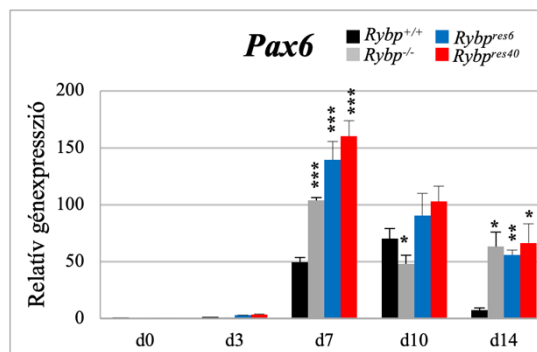


14. ábra: Az ektópikus *Rybp* menekíti a retinol RA átalakításában szerepet játszó enzimek mRNS expresszióját.

A RA jelátviteli útvonal tagok: *Stra6* (A) transzmembrán receptor, az intracelluláris retinol kötő komplex tag: *Crbp1* (B), a retinolt retinállá alakító enzimek: *Rdh10* (C), a retinál retinsav alakításért felelős enzimek: *Raldh1* (D), az intracelluláris RA kötő komplex tag: *Crabp1* (E), génrepresszió fenntartásáért felelős sejtmagi receptor komplex tagjai: *Rarα* (F), *Rxra* (G) valamint a retinsav felesleg lebontását végző enzim: *Cyp26a1* relatív génexpressziós változásainak vizsgálata qRT-PCR segítségével vad típusú (*Rybp*^{+/+}, fekete oszlop), *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}, szürke oszlop) és az ektópikus *Rybp*-t expresszáló (*Rybp*^{res6}, kék oszlop és *Rybp*^{res40}, piros oszlop) sejtekben az *in vitro* neurális differenciáció során. A génexpressziós változásokat a *Hprt*, háztartási gén kifejeződéséhez normalizáltuk. A y tengelyen a génexpresszió mértékét, az x tengelyen a mintavételi napokat tüntettem fel. Szignifikancia: t-próba (p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 ***), Szórás: standard deviáció ± SD.

5.8 Az ektópikus *Rybp* részben menekíti a *Pax6* génexpresszióját

Az ektópikus *Rybp Pax6* génexpresszióra gyakorolt hatását qRT-PCR segítségével vizsgáltuk (lásd fentebb 4.3 részénél). Ehhez a vad típusú és *Rybp null* mutáns sejtvonalak mellett a fentebb már említett (lásd fentebb 5.7 részénél) ektópikus *Rybp* termelésére képes sejtvonalakokat használtunk (*Rybp*^{res6}, *Rybp*^{res40}) (Ujhelly et al. 2015). A génexpresszió vizsgálatához RNS mintákat vettünk az *in vitro* neurális differenciáció 0., 3., 7., 10., és 14. napján (lásd fentebb 4.2 részénél). A *Pax6* expressziója a vártak megfelelően minden sejttypusban a retinsav kezelést követően (d7) volt a legmagasabb. A 7. napon szignifikánsan magasabb expresszió volt megfigyelhető az *Rybp null* mutáns és a menekített sejtvonala esetében a vad típushoz képest. A 10. napon a vad típusú és menekített sejtvonalakban nem volt szignifikáns különbség a *Pax6* mRNS expressziós szintjében. A vad típusú sejtvonalaiban a differenciáció előrehaladtával a *Pax6* expressziója folyamatosan csökkent, azonban az *Rybp null* mutáns és menekített sejtvonalakban a szintje magasán maradt. A differenciáció végén (d14) a *Pax6* szintje mind az *Rybp null* mutáns mind a menekített sejtvonalakban ötvenszer magasabb volt (15. ábra). A kapott eredmények alapján az *Rybp* ektópikus expressziója csak részlegesen, az *in vitro* neurális differenciáció 10. napán állítja helyre a *Pax6* gén expresszióját.



15. ábra: Az ektópikus *Rybp* részben menekíteni a *Pax6* génexpresszióját.

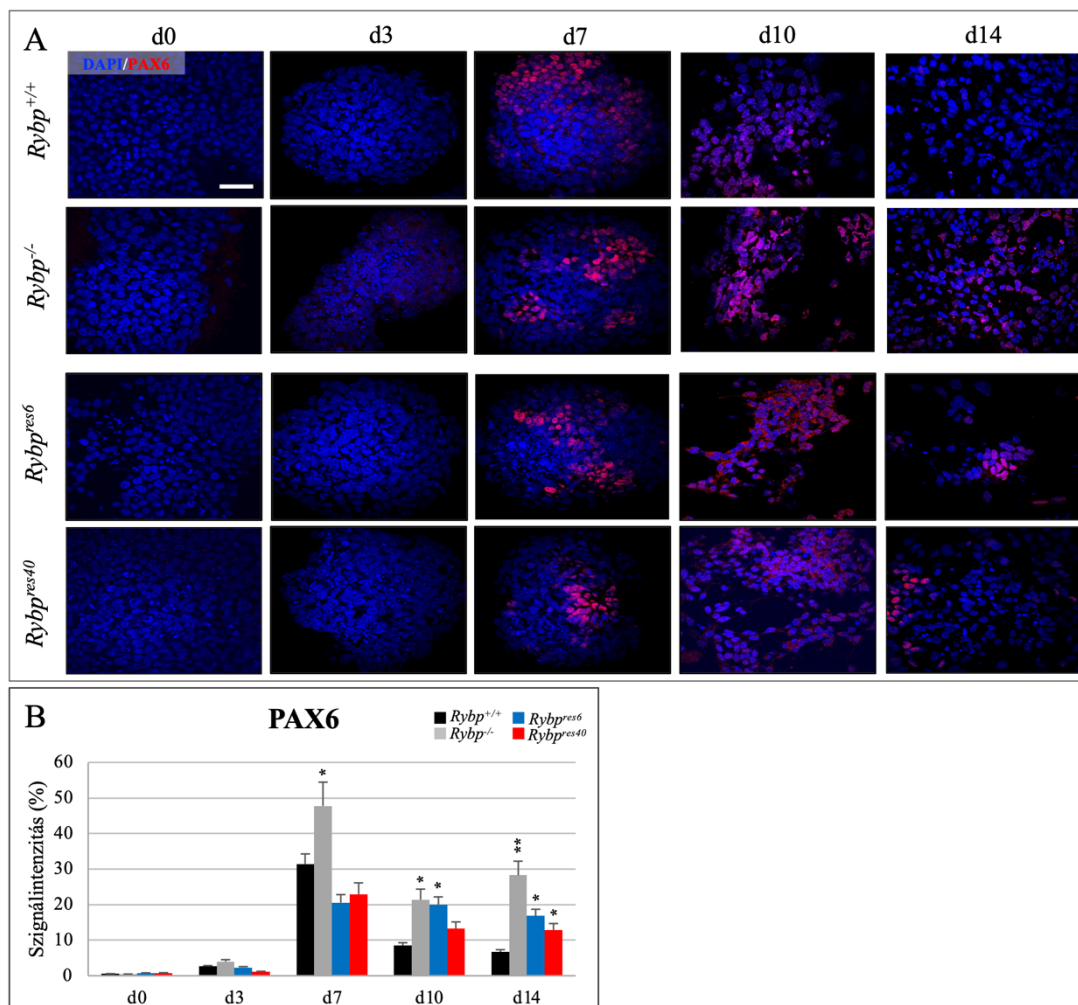
A *Pax6* mRNS kifejeződésének vizsgálata vad típusú (*Rybp*^{+/+}, fekete oszlop), *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}, szürke oszlop) és ektópikus *Rybp*-t kifejező (*Rybp*^{res6}, kék oszlop és *Rybp*^{res40}, piros oszlop) sejtek *in vitro* neurális differenciációja során qRT-PCR segítségével. A génexpressziós változásokat a *Hprt*, háztartási gén kifejeződéséhez normalizáltuk. A y tengelyen a génexpresszió mértékét, az x tengelyen a mintavételi napokat tüntettem fel. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***), Szórás: standard deviáció \pm SD.

5.9 A menekített sejtvonalakban a PAX6 fehérje szintje magasabb marad az *in vitro* neurális differenciáció során

Az előzőekben kimutattuk, hogy a *Pax6* mRNS szintjét az ektópikus *Rybp* csak részben képes helyreállítani az *in vitro* neurális differenciáció során a vad típushoz képest. Ezért a továbbiakban megvizsgáltuk, hogy az mRNS szint változásai a PAX6 fehérje mennyiségére is hatással vannak-e. Ennek megállapítására vad típusú, *Rybp null* mutáns és menekített sejtvonalak *in vitro* neurális differenciációjából származó mintákban (lásd fentebb 4.2 résznél) immuncitokémia (lásd fentebb 4.4 résznél) segítségével vizsgáltuk a PAX6 kifejeződésének mértékét. A kísérlet során a mintákat a 0., 3., 7., 10., és 14. napokon vizsgáltuk Olympus LSM konfokális mikroszkóppal, majd a készült képek intenzitás analízisét ImageJ program segítségével végeztük el.

A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a vártan megfelelően minden vizsgált sejtvonalba a retinsav kezelést követően (d7) figyelhettük meg a legmagasabb PAX6 kifejeződést. A menekített sejtvonalakban a PAX6 indukció mértéke retinsav kezelést követően (d7) az mRNS szintekkel ellentétben alacsonyabb volt a vad típushoz képest. Tehát a megnövekedett mRNS szintet nem feltétlenül követi egy megemelkedett fehérje szint. Azonban a differenciáció későbbi időpontjaiban (d10, d14) mértéke magasabb maradt a vad típushoz képest, de alacsonyabb szinten fejeződött ki, mint az *Rybp null* mutáns sejtekben (16. ábra A, B). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az *Rybp* ektópikus expressziója a *Pax6*

mRNS expresszióhoz hasonlóan, a PAX6 fehérje mennyiségét ugyancsak képes részlegesen menekíteni.



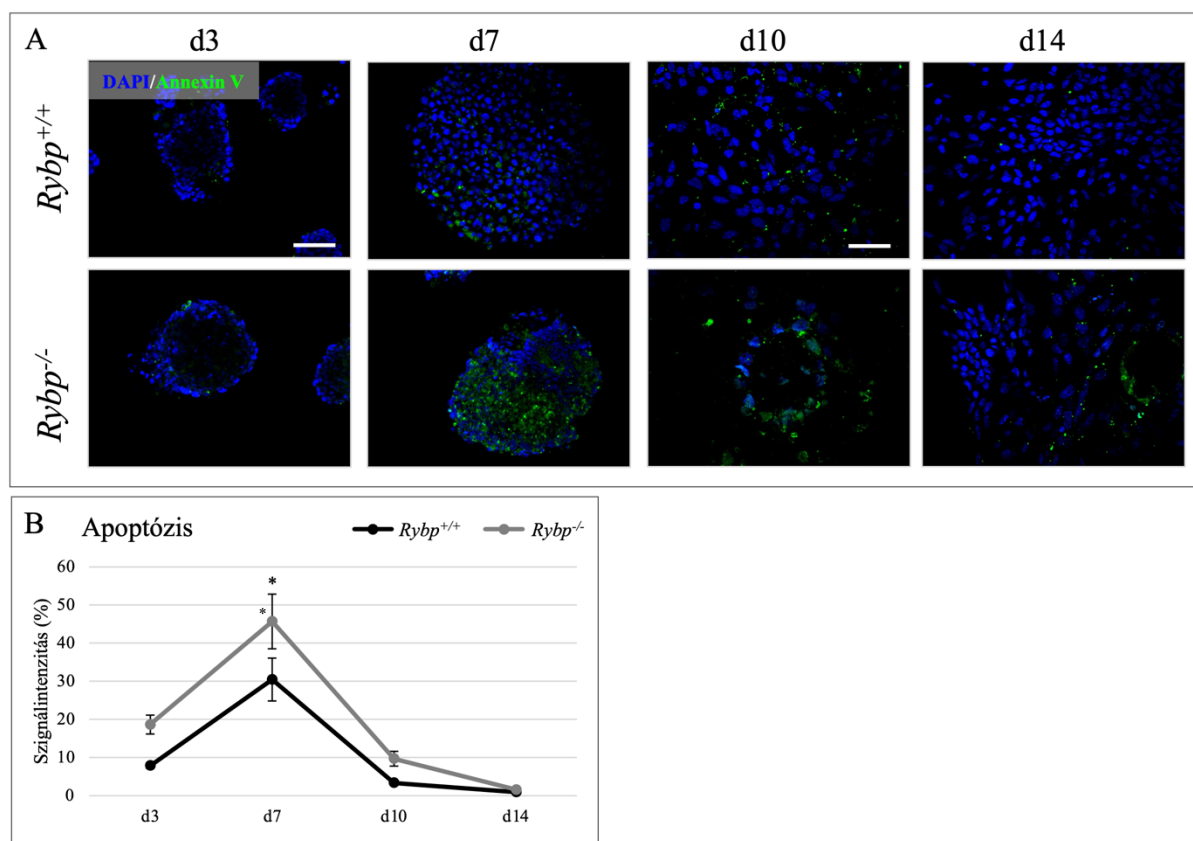
16. ábra: Az ektópikus *Rybp* részlegesen menekíti a PAX6 fehérje mennyiségét.

(A) – vad típusú (*Rybp*^{+/+}), *Rybp* null mutáns (*Rybp*^{-/-}) és ektópikus *Rybp*-t kifejező (*Rybp*^{res6}, *Rybp*^{res40}) sejtek PAX6 immunfestése az *in vitro* neurális differenciáció során. Pirossal a PAX6 pozitív sejtek, késsel a sejtmagok láthatók. Olympus LSM konfokális mikroszkóp, Objektív: 60x a 0., 10. és 14. napokon, Objektív: 40x a 3. és 7. napokon, Lépték: 100 μ m a 0., 10. és 14. napokon, 80 μ m a 3. és 7. napokon. (B) – PAX6 kifejeződésének kvantifikációja ImageJ program segítségével. A grafikonok y tengelyén az ImageJ programmal mért jelintenzitás, az x tengelyen a mintavételi napok lettek feltüntetve. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***), Szórás: standard deviáció \pm SD.

5.10 *Rybp* hiányában megemelkedik az apoptózis mértéke az *in vitro* neurális differenciáció során

Az eddigi eredmények egy lehetséges magyarázattal szolgálnak arra, hogy miért dúsulnak fel a neuroprogenitorok *Rybp* hiányában, mivel a *Pax6* szint emelkedése előfeltétele a progenitor képződésnek, de túlzott mennyiségben a terminális differenciációt gátolja. Ennek egyik lehetséges mechanizmusa lehet az apoptózis, mivel, irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a *Pax6* magas szintje képes apoptózist indukálni (Beger et al. 2007). Valamint az *Rybp* és a retinsav jelátviteli útvonal sejttypustól függően különböző útvonalakon képes az apoptózist szabályozni (Pirity, Locker, and Schreiber-Agus 2005; Simoni and Tolomeo 2001). Ezek alapján FITC konjugált Annexin V jelöléssel vizsgáltuk az apoptózis mértékét (lásd fentebb 4.5 részénél) a vad típusú és *Rybp null* mutáns sejtek *in vitro* neurális differenciációja során (lásd fentebb 4.2 részénél). Az immuncitokémiához mintát vettünk a differenciáció 3., 7., 10., és 14. napján. A mintákat Olympus LSM konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk és a képek intenzitás analízisét ImageJ programmal végeztük el.

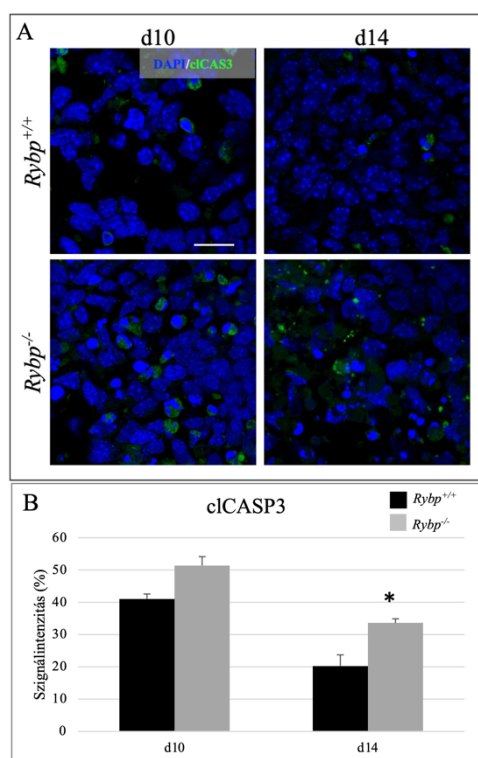
A differenciáció harmadik napján az apoptózis mértéke kétszer akkora *Rybp* hiányában a vad típushoz képest. Az apoptózis mértéke a 7. napon volt a legmagasabb mindkét sejtvonalban, valamint a két sejtvonal közötti különbség is ebben az időpontban volt a legnagyobb. Tehát a retinsav kezelést követően (d7) az apoptózis mértéke szignifikáns emelkedést mutat *Rybp* hiányában a vad típushoz képest. A differenciáció előrehaladtával az apoptózis mértéke is csökken. A 10. napon az *Rybp null* mutáns sejtekben még mindig magasabb az apoptotizáló sejtek aránya, azonban a differenciáció végén (d14) már nem figyelhető meg ez a különbség a két sejtvonal között (17. ábra A, B). Ezen eredmények alapján elmondható, hogy *Rybp* hiányában megemelkedik az apoptózis mértéke az *in vitro* neurális differenciáció során.



17. ábra: *Rybp* hiányában megemelkedik az apoptózis mértéke

(A) – vad típusú (*Rybp*^{+/+}) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}) sejtek Annexin V fluoreszcens jelölés az *in vitro* neurális differenciáció során. Kékkel a sejtmagokat, zölddel az apoptotizáló sejteket jelöltem. Olympus LSM konfokális mikroszkóp, Objektív: 40x a 3. és a 7. napokon, Objektív: 60x a 10. és 14. napokon, Lépték: 100 μ m a 10. és 14. napokon, 80 μ m a 3. és 7. napokon. (B) – Annexin V kifejeződésének kvantifikációja ImageJ program segítségével RA kezeletlen vad típusú (*Rybp*^{+/+}, fekete) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}, szürke) mintákban. A grafikonok y tengelyén az ImageJ programmal mért jelintenzitás százalékban, az x tengelyen a mintavételi napok lettek feltüntetve. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,05$ *), Szórás: standard deviáció \pm SD.

Az *in vitro* neurális differenciáció végén (d10, d14) megfigyelhető apoptózis részletesebb vizsgálatára aktivált-Kaspáz 3 immunfestést végeztünk (lásd fentebb 4.4 résznél) vad típusú és *Rybp null* mutáns őssejtek neurális differenciációjából származó 10 és 14 napos mintákon (lásd fentebb 4.2 résznél). A kapott eredmények nagyban megegyeznek az Annexin V fluoreszcens jelölés eredményeivel. A Kaspáz 3 festés esetében is magasabb volt az apoptotizáló sejtek aránya a 10. napon *Rybp* hiányában a vad típusúhoz képest. Az Annexin V fluoreszcens jelöléssel ellentétben a Kaspáz 3 szintje a differenciáció végén is magasabb volt az *Rybp null* mutáns sejtekben a vad típusúhoz képest (18. ábra A, B). A kapott eredmények alapján feltételezhető, hogy az *Rybp* hiánya esetében megfigyelt terminálisan differenciálódott sejtek alacsonyabb száma, magyarázható az apoptózis megemelkedésével.



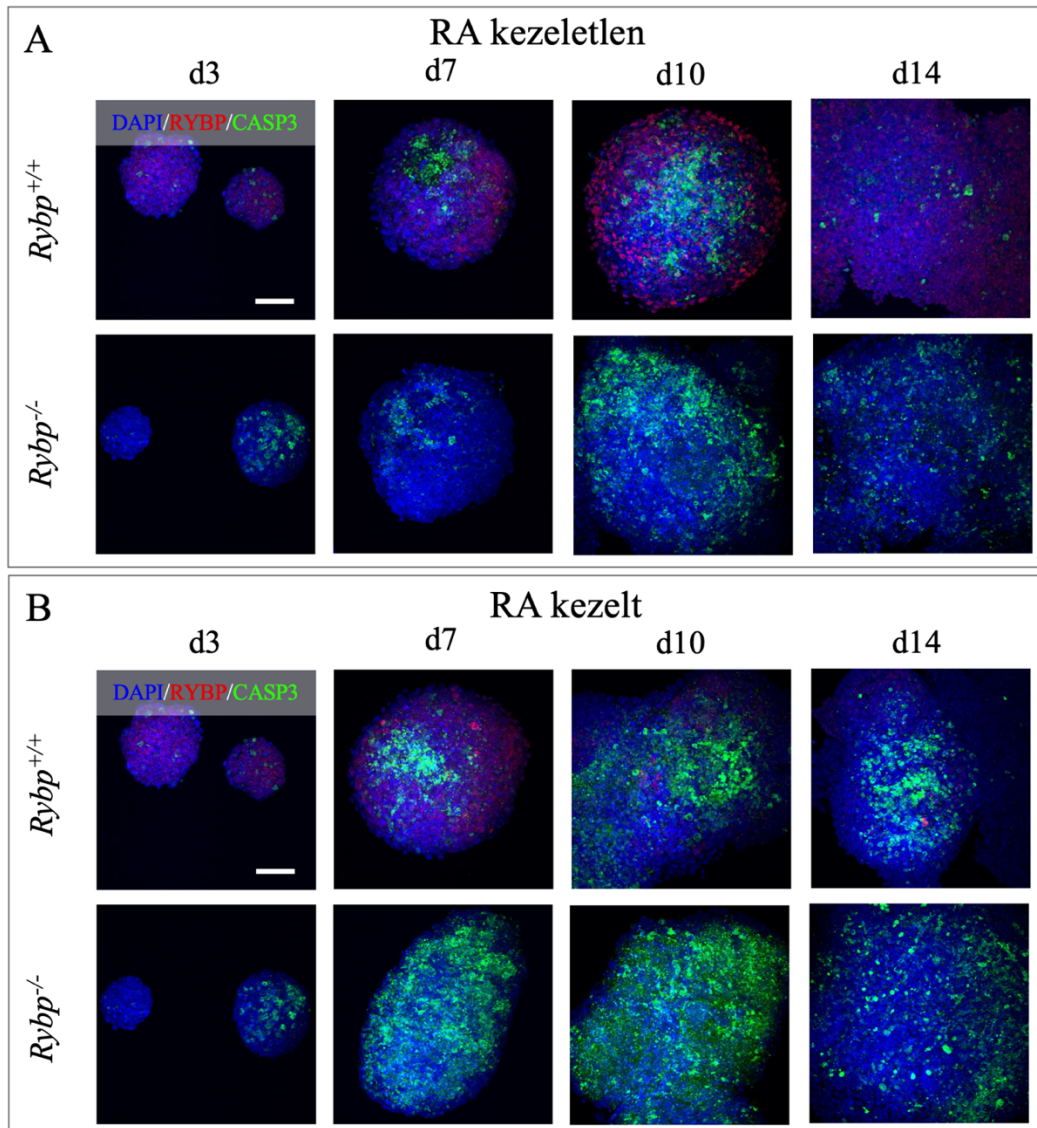
18. ábra: *Rybp* hiányában az *in vitro* neurális differenciáció késői szakaszában megnő az apoptotizáló sejtek aránya

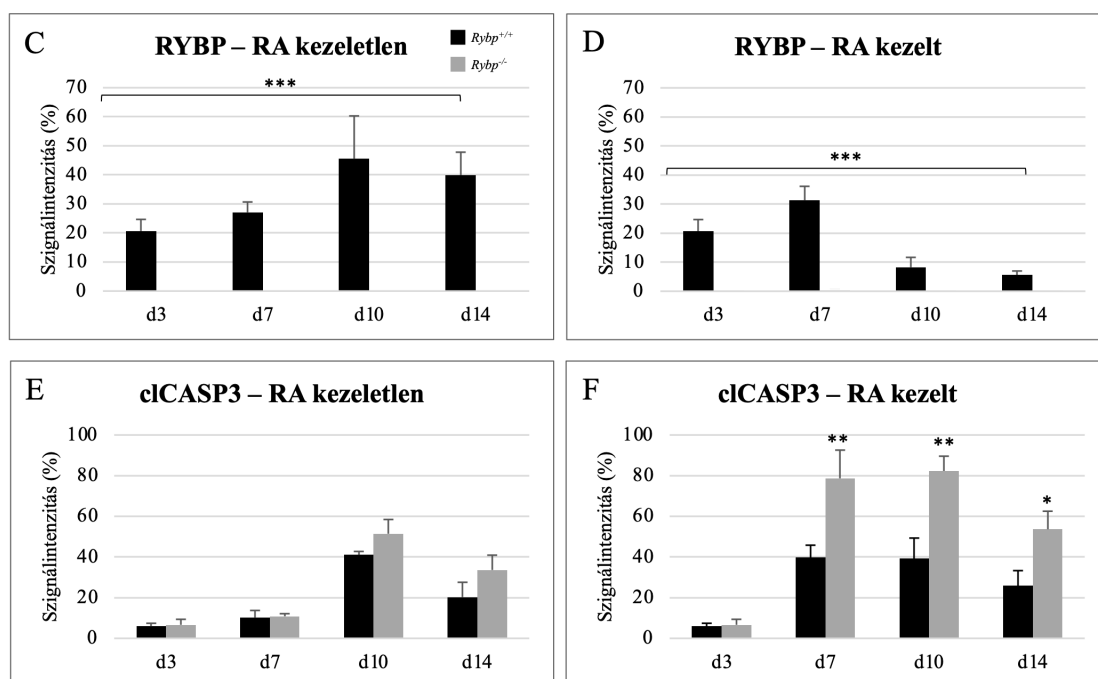
A vad típusú (*Rybp*^{+/+}) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}) neurális kultúrák aktivált-Kaspáz 3 festése. Olympus LSM konfokális mikroszkóp, Objektív: 60x, Lépték: 100 μ m. Zölddel az apoptotizáló sejtek, kékkel a sejtmagok látszanak. cCASP3: aktivált-Kaspáz 3

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy az RYBP fontos szerepet tölt be a Kaspáz 8 aktivációjában. Az RYBP és az apoptózis kapcsolatának részletesebb vizsgálatára, retinsav kezelt és kezeletlen EB-k immuncitokémiai analízisét végeztük el, vizsgálva az RYBP és az aktivált-Kaspáz 3 kifejeződését és egymáshoz viszonyított lokalizációját. A kísérlet során mintákat vettünk a 3., 7., 10., és 14. napokon (lásd fentebb 4.2 résznél), majd anti-RYBP és anti-CASP3 ellenanyaggal egyidejűleg festettük (lásd fentebb 4.4 résznél). A mintákról Olympus LSM konfokális mikroszkóp segítségével képeket készítettünk és ImageJ program segítségével intenzitás analízist végeztünk.

A vad típusú retinsav kezeletlen sejtekben az RYBP fehérje mennyisége megemelkedik a differenciáció késői szakaszaiban (19. ábra A, C). A retinsav kezelt vad típusú sejtekben a differenciáció során a vártan megfelelően az RYBP mennyisége lecsökken (19. ábra B, D). Az RYBP a vártan megfelelően nem mutatott festődést az *Rybp null* mutáns sejtekben (19. ábra B, E, F). Az aktivált-Kaspáz 3 és az RYBP nem mutatott kolokalizációt egyik vizsgált időpontban sem.

Mivel a neurális differenciációt a RA hozzáadásával indukáljuk megfigyelhető, hogy retinsav kezelés hiányában a differenciáció kevésbé volt hatékony mind a vad típusú, mind az *Rybp null* mutáns sejtek esetében. Továbbá azt is kimutattuk, hogy a retinsav kezelés nagymértékben megnöveli az apoptotizáló sejtek mértékét *Rybp* hiányában. A kapott eredmények arra utalnak, hogy az RYBP-nek az apoptózis egy korábbi szakaszában lehet szerepe.





19. ábra: Az RYBP és a aktivált-Kaspáz 3 nem kolokalizálódnak.

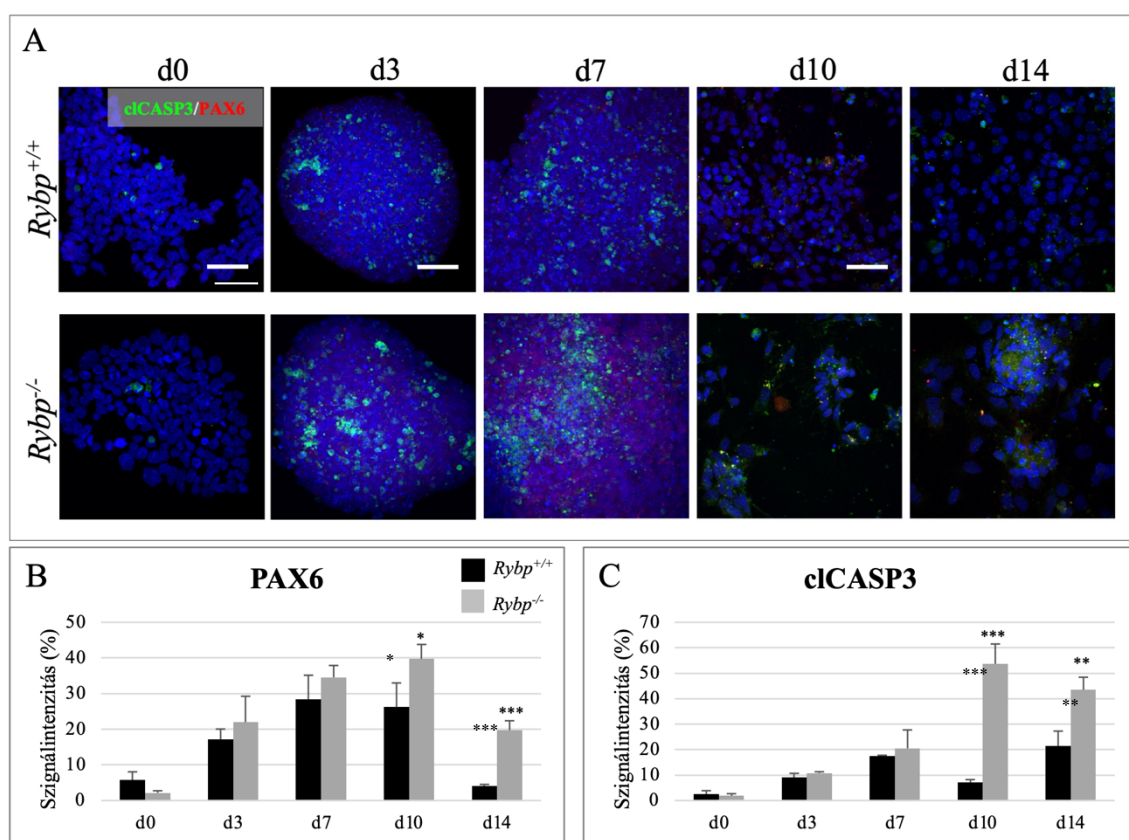
(A) – RA kezeletlen vad típusú (*Rybp*^{+/+}) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}) EB-k RYBP és aktivált-Kaspáz 3 immunfestése. Zöld színnel az aktivált-Kaspáz 3, pirossal az RYBP pozitív sejteket míg késsel a sejtmagokat láthatjuk. (B) – RA kezelt vad típusú (*Rybp*^{+/+}) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}) EB RYBP és aktivált-Kaspáz 3 immunfestése. Zölddel itt is az aktivált-Kaspáz 3, pirossal az RYBP pozitív sejtek, késsel a sejtmagok vannak jelölve.

Olympus LSM konfokális mikroszkóp, Objektív: 40x, Lépték: 80 μ m. (C) – RYBP kifejeződésének kvantifikációja ImageJ program segítségével RA kezeletlen vad típusú (*Rybp*^{+/+}, fekete oszlop) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}, szürke oszlop) EB-kben. (D) – RYBP kifejeződésének kvantifikációja ImageJ program segítségével RA kezelt vad típusú (*Rybp*^{+/+}, fekete oszlop) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}, szürke oszlop) EB-kben. (E) – aktivált-Kaspáz 3 kifejeződésének kvantifikációja ImageJ program segítségével RA kezeletlen vad típusú (*Rybp*^{+/+}, fekete oszlop) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}, szürke oszlop) EB-kben. (F) – aktivált-Kaspáz 3 kifejeződésének kvantifikációja ImageJ program segítségével RA kezeletlen vad típusú (*Rybp*^{+/+}, fekete oszlop) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}, szürke oszlop) EB-kben. A grafikonok y tengelyén az ImageJ programmal mért jelintenzitás százalékos arányát, az x tengelyen a mintavételi napokat tüntettem fel. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***), Szórás: standard deviáció \pm SD. RA: retinsav, clCASP3: aktivált-Kaspáz 3.

5.11 A PAX6 magas szintje a neurális differenciáció során apoptózist eredményez

Annak vizsgálatára, hogy a *Pax6* mRNS és fehérje magas szintje *Rybp* hiányában valóban összefügg-e a megemelkedett apoptózissal PAX6 és aktivált-Kaspáz 3 kettős immunfestést alkalmaztunk (lásd fentebb 4.4 résznél). A vad típusú és *Rybp null* mutáns összevont *in vitro* neurális differenciációja során mintákat vettünk a 0., 3., 7., 10., és 14. napokon (lásd fentebb

4.2 részénél). A korábbi eredményekhez hasonlóan, a PAX6 szintje vad típusban a differenciáció végére folyamatosan lecsökken, ezzel szemben az *Rybp null* mutáns sejtekben magasabb szintet mutat (20. ábra A, B). A Kaszpáz 3 pozitív apoptotizáló sejtek a vad típusban az egész differenciáció során alacsonyabb számban figyelhetők meg. Az *Rybp null* mutáns sejtekben a Kaszpáz 3 szintje a differenciáció későbbi szakaszaiban (d10, d14) megemelkedik a vad típushoz képest (20. ábra A, C). Ezen felül, összefüggés figyelhető meg a PAX6 késői neurális kultúrákban (d10, d14) megfigyelt magasabb szintje és az apoptózis mértéke között *Rybp* hiányában. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a PAX6 magas szintje gátolja a terminális differenciációt, ami a sejtek apoptózisához vezet, hiába képződnek nagyobb mértékben progenitorok a mutánsban.



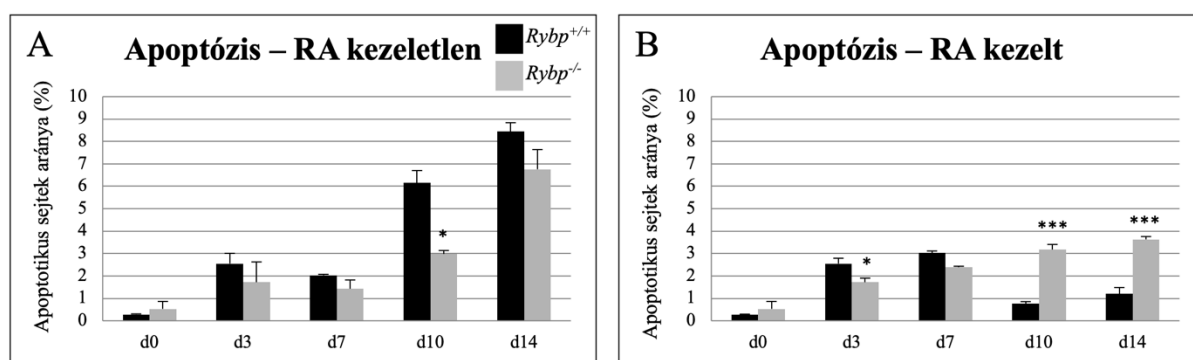
20. ábra: A PAX6 és a aktivált-Kaspáz 3 együttesen fejeződik ki a neurális differenciáció késői időpontjaiban

(A) vad típusú (*Rybp*^{+/+}) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}) sejtek PAX6 és aktivált-Kaspáz 3 kettős festése az *in vitro* neurális differenciáció során. Olympus LSM konfokális mikroszkóp, Objektív: 60x a 0., 10. és 14. napokon, Objektív: 40x a 3. és a 7. napokon, Lépték: 100 μ m a 10. és 14. napokon, 80 μ m a 3. és 7. napokon. (B) PAX6 kifejeződésének kvantifikációja ImageJ program segítségével RA kezletlen vad típusú (*Rybp*^{+/+}, fekete oszlop) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}, szürke oszlop) mintákban. (C) aktivált-Kaspáz 3 kifejeződésének kvantifikációja ImageJ program segítségével RA kezletlen vad típusú (*Rybp*^{+/+}, fekete oszlop) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}, szürke oszlop) mintákban. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***), Szórás: standard deviáció \pm SD. cI-CASP3: aktivált-Kaspáz 3.

5.12 Retinsav kezelés hatására, az *Rybp null* mutáns sejtekben megemelkedik az apoptózis mértéke az *in vitro* neurális differenciáció késő szakaszában

A retinsav is képes az apoptózis mértékének befolyásolására a *Kaszpáz* gének szabályozása által. Ezért a továbbiakban megvizsgáltuk, hogy az *Rybp null* mutáns sejtek esetén megfigyelt magasabb apoptózis retinsav függő-e. Ennek vizsgálatára az áramlási citometria (FACS) módszerét alkalmaztuk (lásd fentebb 4.6 résznél) retinsav kezelt és kezeletlen EB-kben (lásd fentebb 4.2 résznél), amelyekből mintákat vettünk a 0., 3., 7., 10., és 14. napokon.

Az EB-k a 3. és 7. napokon kavitálnak, a belső sejtöteg szabályozott módon apoptotizál és létrejön egy üreg az embrionális fejlődés hólyagcsíra állapotához hasonlóan. Így ennek megfelelően, a retinsav kezelt mintákban az apoptotizáló sejtek mértéke a 3. és 7. napokon volt a legmagasabb a vad típus esetében. A differenciáció végére (d10, d14) az apoptotizáló sejtek aránya a kavitáció mértékével arányosan lecsökken a vad típusú sejtekből képzett EB-kben. Ezzel szemben *Rybp* hiányában az apoptózis mértéke folyamatos emelkedést mutat a differenciáció során. Az *Rybp null* mutáns EB-kben megemelkedik az apoptózis a 10. és 14. napokon a vad típushoz képest. Retinsav kezelés hiányában az apoptotizáló sejtek száma folyamatos emelkedést mutat a differenciáció előrehaladása során (21. ábra). A fenti eredmények arra utalnak, hogy az *Rybp* hiánya és a retinsav együttesen felelősek az *Rybp null* mutáns sejtek neurális differenciációja során megfigyelt progenitorok felszaporodásáért és ezt követő pusztulásáért, így a neurális differenciáció zavaráért.



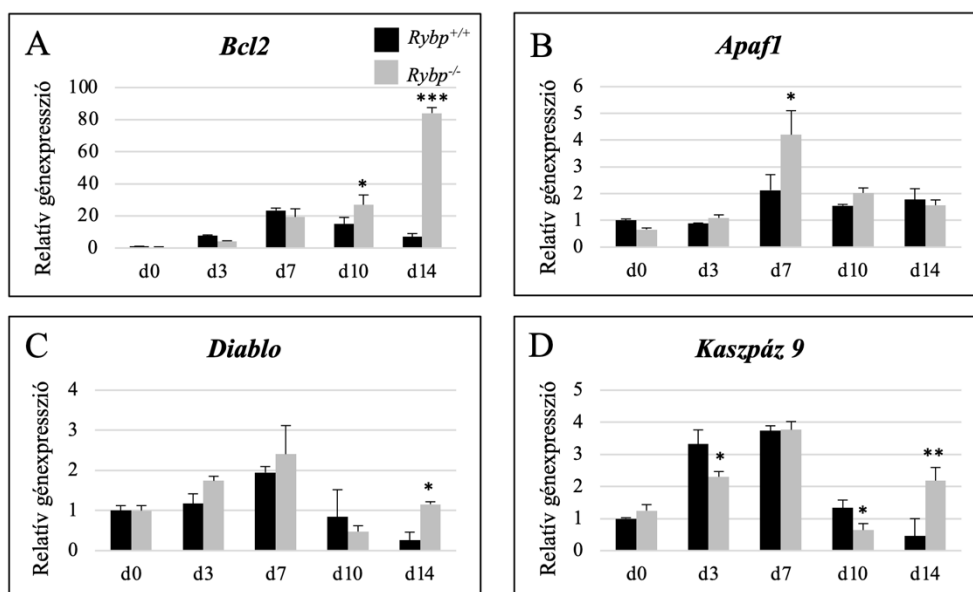
21. ábra: RA kezelés hatására megemelkedik az apoptózis mértéke az *in vitro* neurális differenciáció végén *Rybp* hiányában

Az apoptotizáló sejtek mértékét propidium jodid (PI) jelölés után fluoreszcencia aktivált sejtválogatással határoztuk meg a RA kezelt (A) és kezeletlen (B) vad típusú (*Rybp*^{+/+}, fekete oszlop) és *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}, szürke oszlop) EB-kben. Az y tengelyen az apoptózis százalékos mértéke, az x tengelyen a mintavételi napok vannak feltüntetve. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,05$ *, $p < 0,001$ ***), Szórás: standard deviáció \pm SD.

5.13 A belső és külső apoptózis jelátviteli útvonal tagok génexpressziója megemelkedik *Rybp* hiányában

Eddigi eredményeink alapján elmondható, hogy az *Rybp* jelenléte, valamint hiánya befolyásolja az apoptózis mértékét az *in vitro* neurális differenciáció során. Annak érdekében, hogy megállapítsuk melyik apoptózis jelátviteli útvonalon keresztül fejt ki az *Rybp* a hatását qRT-PCR segítségével vizsgáltuk (lásd fentebb 4.3 résznél) mind az belső, mind az külső apoptózis jelátviteli útvonal tagok génexpressziós változásait az őssejtek *in vitro* neurális differenciációja során, melyekhez mintát vettünk a 0., 3., 7., 10., és 14. napokon (lásd fentebb 4.2 résznél).

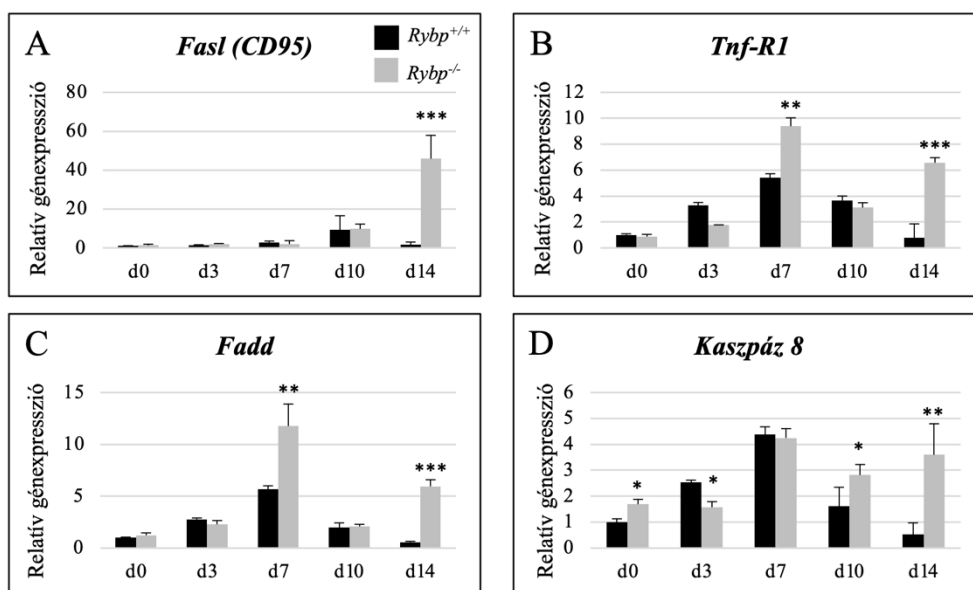
Az belső vagy mitokondriális stressz indukált apoptózis jelátviteli útvonal tagok közül elsőként a mitokondrium membrán permeabilitását szabályzó, *Bcl2* (BCL2 Apoptosis Regulator) mRNS szintjének változásait vizsgáltuk. A *Bcl2* expressziója szignifikánsan megemelkedik a neurális differenciáció végén (d14) az *Rybp null* mutáns sejtekben a vad típushoz képest (22. ábra A). Ezt követően megvizsgáltuk a *Diablo* (Diablo IAP-Binding Mitochondrial Protein) mRNS szintjét, amely szintén magasabb expressziót mutat a differenciáció végén (d14) *Rybp* hiányában. Ez a gén egy mitokondriális fehérjét kódol, amely az apoptózis folyamata során a citoplazmába kerülve képes aktiválni a kaspázokat (pl.: Kaspáz 9) (22. ábra B). A továbbiakban vizsgáltuk az *Apaf1* expresszióját is mely a retinsav kezelést követően (d7) magasabb volt az *Rybp null* mutáns sejtekben (22. ábra C). Végül a *Kaspáz 9* mRNS szintet is megvizsgáltuk, amely szintén magasabb expressziós szintet mutatott a *Rybp* hiányában a 14. napon (22. ábra D). Megállapíthatjuk, hogy az összes vizsgált belső apoptózis jelátviteli útvonal tag magasabb mRNS expressziós szintet mutatott a *Rybp* hiányában, főképp az *in vitro* neurális differenciáció végén (d14).



22. ábra: Az belső apoptózis jelátviteli útvonal tagok mRNA expressziója megemelkedik az *Rybp null* mutáns sejtekben a neurális differenciáció során

Az belső jelátviteli útvonalhoz tartozó mitokondrium membránfehérje, *Bcl2* (A), a Kaszpázok aktiválásáért felelős *Apaf1* (B), az apoptózis inhibitor fehérje kötő *Diablo* (C) valamint a *Caspase9* (D) expressziójának vizsgálata qRT-PCR-rel. A fekete oszlopok a vad típust a szürke oszlopok az *Rybp null* mutáns sejtekből származó eredményeket reprezentálják. Az y tengelyen a génexpressziós változásokat, az x tengelyen a mintavételi napokat tüntettem fel. A génexpressziós változásokat a *Hprt*, háztartási gén kifejeződéséhez normalizáltuk. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***), Szórás: standard deviáció \pm SD.

Ezt követően megvizsgáltuk a külső szignál által közvetített apoptózis jelátviteli útvonal tagjainak mRNA expressziós változásait (lásd fentebb 4.3 részénél) az *in vitro* neurális differenciáció során (lásd fentebb 4.2 részénél). A *Fasl* (CD95), amely a FAS (Fas Cellular Surface Death Receptor) receptorok ligand molekulája, génexpressziója jelentősen megemelkedik *Rybp* hiányában a 14. napon (23. ábra A). A FASL receptor molekuláját kódoló *Tnf-R1* gén expressziója retinsav kezelést követően, valamint a differenciáció végén is magasabb szintet mutat az *Rybp null* mutáns sejtekben a vad típusához képest (23. ábra B). A *Fadd*, amely a *pro-kaspáz 8* aktiválásáért felelős DISC komplex tagja, expressziós szintje *Rybp* hiányában a *Tnf-R1* expressziójához hasonlóan a 7. és 14 napokon volt a legmagasabb (23. ábra C). A továbbiakban megvizsgáltuk az iniciátor *kaspáz 8* mRNA szintjét is. A *kaspáz 8* magasabb expressziós szintet mutat az *Rybp null* mutánsban a differenciáció késői szakaszaiban (d10, d14) (23. ábra D). A kapott eredmények alapján elmondható, hogy *Rybp* hiányában megemelkedik az külső apoptózis jelátviteli tagok expressziója. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az *Rybp* hatással van mind az belső, mind az külső apoptózis jelátviteli útvonal tagok mRNA expressziójára.



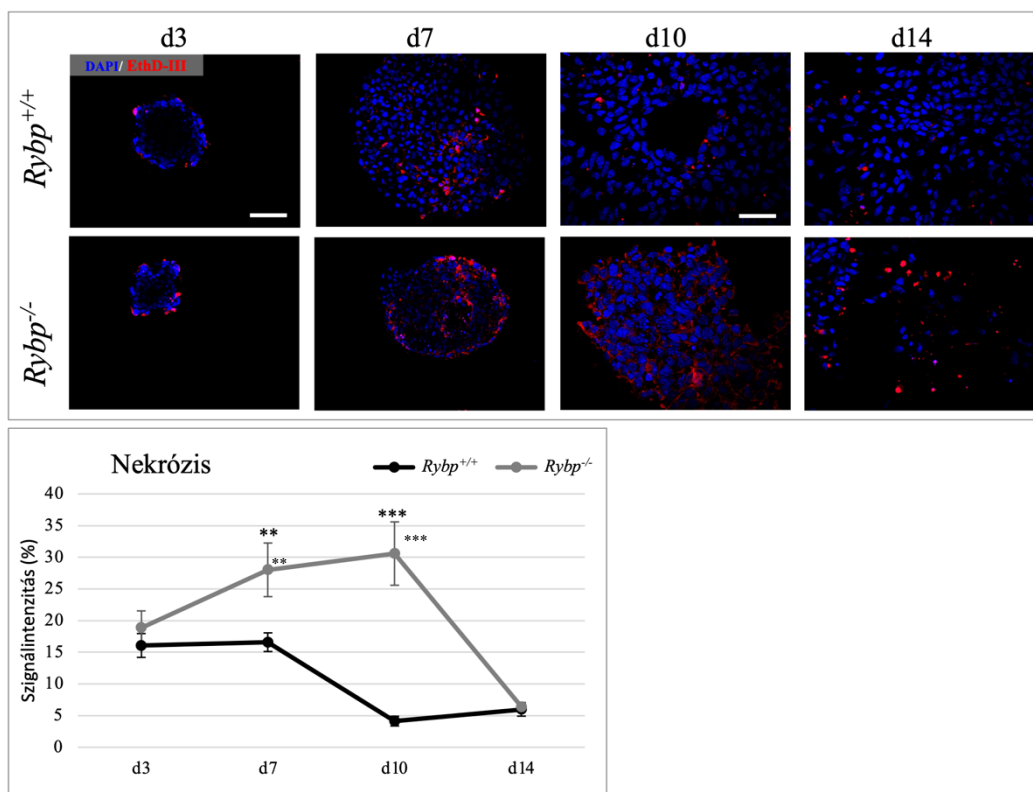
23. ábra: Az külső apoptózis jelátviteli útvonal tagok mRNA expressziója megemelkedik az *Rybp null* mutáns sejtekben a neurális differenciáció során

Az külső jelátviteli útvonal ligandját érzékelő receptor komplex tagjai a *Fas* (A) és a *Tnf-R1* (B), az apoptózis szignált közvetítő, *Fadd* (C) és a *Caspase8* (D) mRNA szintek vizsgálata qRT-PCR segítségével. A fekete oszlopok a vad típust a szürke oszlopok az *Rybp null* mutáns sejtekből származó eredményeket reprezentálják. Az y tengelyen a génexpressziós változásokat, az x tengelyen a mintavételi napokat tüntettem fel. A génexpressziós változásokat a *Hprt*, háztartási gén kifejeződéséhez normalizáltuk. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***), Szórás: standard deviáció \pm SD.

5.14 Az *Rybp null* mutáns sejtekben megnő a nekrosis mértéke

Mivel egyes sejthalál molekulák az apoptózis indukálásán kívül képesek a nekrosis kiváltására is, ezért immuncitokémiával vizsgáltuk a nekrotizáló sejtek mennyiségét az *in vitro* neurális differenciáció során vad típusú és *Rybp null* mutáns sejtekben. A neurális differenciáció során (lásd fentebb 4.2 részénél) a sejteket a 3., 7., 10., és 14. napokon egy kis molekulású, fluoreszcens festék az EthD-III (Ethidium homodimer III) segítségével jelöltük a nekrotizáló sejtek kimutatása céljából (lásd fentebb 4.5 részénél). A mintákról Olympus LSM konfokális mikroszkóppal képeket készítettünk és ImageJ programmal intenzitás analízis végeztünk.

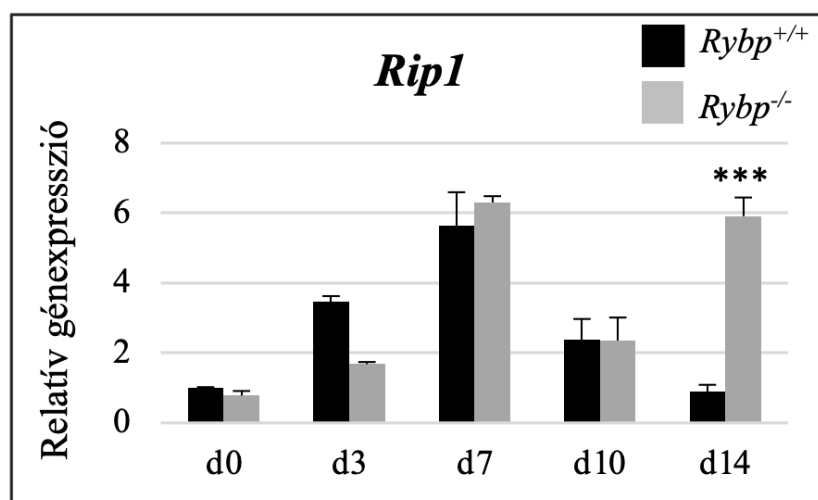
A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy *Rybp* hiányában jelentősen megnő a nekrosis mértéke a retinsav kezelést követően (d7) a vad típushoz képest. A nekrotizáló sejtek száma a korai neurális kultúrákban (d10) volt a legmagasabb az *Rybp null* mutáns sejtekben (24. ábra A, B). Ezek alapján arra következtethetünk, hogy az *Rybp* hiánya nem csak az apoptózis, de a nekrosis megemelkedését okozza az *in vitro* neurális differenciáció során.



24. ábra: Az *Rybp* null mutáns sejtekben megnő a nekrozis mértéke

(A) – vad típusú (*Rybp*^{+/+}) és *Rybp* null mutáns (*Rybp*^{-/-}) sejtek EthD-III jelölése az *in vitro* neurális differenciáció során. Olympus LSM konfokális mikroszkóp, Objektív: 40x a 3. és 7. napokon, Objektív: 60x a 10., és 14. napokon, Lépték: 100 μ m a 10. és 14. napokon, 80 μ m a 3. és 7. napokon. (B) – EthD-III kifejeződésének kvantifikációja ImageJ program segítségével RA kezeletlen vad típusú (*Rybp*^{+/+}, fekete) és *Rybp* null mutáns (*Rybp*^{-/-}, szürke) mintákban. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***), Szórás: standard deviáció \pm SD.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az *Rybp* milyen hatással van a nekroptózis jelátviteli útvonalra, qRT-PCR segítségével vizsgáltuk (lásd fentebb 4.3 résznél) a *Rip1* mRNS expressziójának változásait *Rybp* null mutáns és vad típusú összegek *in vitro* neurális differenciációja során (lásd fentebb 4.2 résznél). A kísérlethez mintákat vettünk a 0., 3., 7., 10., és 14 napokon. A *Rip1*, mely a TNF- α szignál közvetítette nekroptózis jelátviteli útvonal kulcsfontosságú molekulája, expressziója a neurális differenciáció végén szignifikánsan megemelkedik az *Rybp* null mutáns sejtekben a vad típushoz képest (25. ábra). A kapott eredmény alapján arra következtethetünk, hogy az *Rybp* hatással van a nekroptózis jelátviteli útvonalára is.



25. ábra: A nekroptózis jelátviteli útvonal tag, *Rip1* expressziója megváltozik *Rybp* hiányában

Fertőzés vagy szövetkárosodás hatására kialakuló jelet közvetítő *Rip1* mRNS szintjének vizsgálata qRT-PCR segítségével vad típusú és *Rybp null* mutáns sejtekben a neurális differenciáció során. A fekete oszlopok a vad típust a szürke oszlopok az *Rybp null* mutáns sejtekből származó eredményeket reprezentálják. Az y tengelyen a génexpressziós változásokat, az x tengelyen a mintavételi napokat tüntettem fel. A génexpressziós változásokat a *Hprt*, háztartási gén kifejeződéséhez normalizáltuk. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,001$ ***), Szórás: standard deviáció \pm SD.

5.15 Az apoptózis és nekrozis útvonal tagok Polikomb Represszor Csoportba tartozó fehérjék target génjei

Annak érdekében, hogy megállapítsuk, az RYBP mely komplexeken keresztül képes szabályozni az apoptózis folyamatát, őssejtekből származó ChIP-seq adatok elemzését végeztük el (Morey et al. 2013; 2015). Az elérhető adatok alapján vizsgáltuk az apoptózis és nekrozis jelátviteli útvonal tagokban található PRC1, PRC2 és ncPRC komplexek központi tagjainak kötőhelyeit. Az analízist kizárólag őssejtekből származó adatok elemzése alapján végeztük el mivel neurális differenciációból származó adatok nem voltak elérhetőek. Kimutattuk, hogy a vizsgált apoptózis jelátviteli útvonal tagok többsége (*Kaspáz 3*, *Fadd*, *Diablo*, *Tnf-R1*, *Act1/Traf3ip2*, (TRAF3 Interacting Protein 2), *Kaspáz 8*) az RYBP célgénje (Morey et al. 2013; 2015). Ezen felül a *Tnf-R1*, a *Kaspáz 3* és a *Casp8* célgénjei az RNF2 fehérjének is, mely központi eleme mind a PRC1 komplexnek mind az ncPRC1 komplexeknek. A *Bcl2* több PRC1 tagnak (CBX2, PCGF1, RNF2) is target génje. Az *Act,1* az RYBP-n felül a PRC1 tagok (CBX2, PCGF1) célgénje is A nekroptózis jelátvitelben fontos *Rip1* és *Rip2* target génjei az RNF2 fehérjének, így mind a PRC1 mind a ncPRC1 komplexek is szabályozhatják (2. táblázat). Ezek alapján valószínűsíthető, hogy az RYBP Polikomb komplexek által is szabályozhatja az apoptózis és a nekrozis folyamatát.

	Gén név	RNF2	RYBP	PCGF1	CBX2
Apoptózis	<i>Casp3</i>	✓	✓	-	-
	<i>Fadd</i>	-	✓	-	-
	<i>Diablo</i>	-	✓	-	-
	<i>Bcl2</i>	✓	-	✓	✓
	<i>Tnfrsf1a</i>	✓	✓	-	-
	<i>Act1</i>	-	✓	✓	✓
	<i>Casp8</i>	✓	✓	-	-
	<i>Casp9</i>	✓	-	-	-
Nekrózis	<i>Rip1</i>	✓	-	-	-
	<i>Rip3</i>	✓	-	-	-

2. táblázat: Apoptózis és nekrózis jelátviteli útvonal tagok ChIP-seq analízise PRC és ncPRC1 központi tagok kötőhelyeire

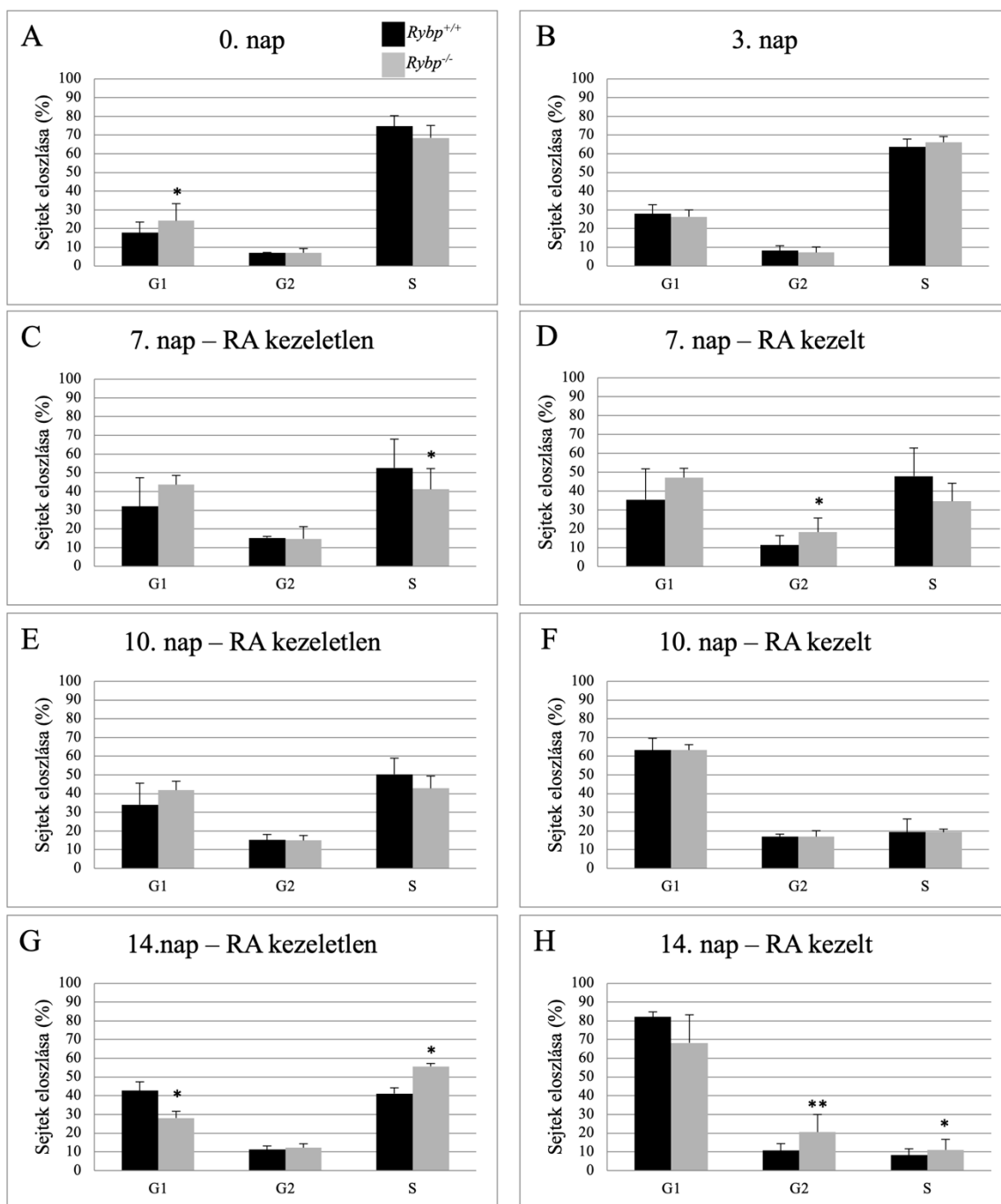
-: nincs kötődés, ✓: van kötődés

5.16 Retinsav kezelés hatására megváltozik a sejtciklus fázisok eloszlása az *in vitro* neurális differenciáció során

Mivel az RYBP a PAX6 és a retinsav hatással vannak az apoptózis és a proliferáció folyamatára, valamint irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a sejtciklus folyamatában is fontos szerepet játszanak (Beger et al. 2007; H. L. Chan and Morey 2019; Das et al. 2015), ezért FACS segítségével (lásd fentebb 4.6 résznél) megmértük a sejtciklus fázisok eloszlását vad típusú és *Rybp null* mutáns retinsav kezelt és kezeletlen EB-kben (lásd fentebb 4.2 résznél). A kísérlethez mintákat vettünk a 0., 3., 7., 10., és 14. napokon és BrdU jelölést követően FACS analízist végeztünk.

A 0. napon az összes állapotnak megfelelően a sejtek többsége az S fázisban van (26. ábra A). A differenciáció kezdeti szakaszában (d3) a sejtek nagy része a vártak megfelelően még mindig az S fázisban található, azonban megfigyelhető egy enyhe növekedés a G1 fázisban (26. ábra B). A 7. napon retinsav kezelés hiányában a sejtek nagyrésze továbbra is az S fázisban van, de a G1 fázisban lévő sejtek aránya folyamatosan növekszik (26. ábra C). Hasonló eredmények figyelhetők meg retinsav kezelést követően is, azonban retinsav hatására az *Rybp null* mutáns sejtek esetén kevesebb sejt található az S fázisban és több a G1 fázisban a vad

típushoz képest (26. ábra D). A legnagyobb különbség a retinsav kezelt és kezeletlen sejtek között a 10. napon volt megfigyelhető. Ebben az időpontban retinsav kezelés hiányában mindkét sejtvonal esetén a sejtek többsége G2 és G1 fázisban található (26. ábra E). Retinsav kezelés hatására mindkét sejtvonalban a G1 fázisban lévő sejtek aránya a duplájára emelkedik, míg a G2 fázisban található sejtek mennyisége a felére csökken a retinsav kezeletlen sejtekhez képest (26. ábra F). A differenciáció végén a retinsav kezeletlen sejtek esetén megemelkedik az S fázisban lévő sejtek mennyisége a 10 napos mintákhoz képest és ez az emelkedés *Rybp* hiányában még kifejezettebb volt (26. ábra G). Retinsav kezelést követően az *Rybp null* mutáns sejtek a vad típushoz hasonló kinetikát mutattak, a sejtek többsége G1 fázisban volt és a 10. naphoz képest enyhén megemelkedett az S fázisban található sejtek mennyisége (26. ábra H). Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a retinsav kezelés hatására a vad típusú és *Rybp null* mutáns sejtekben megváltozik a sejtciklus fázisok eloszlása.



26. ábra: Retinsav kezelés hatására megváltozik a sejtciklus fázisok aránya az *in vitro* neurális differenciáció késői szakaszában (d10)

A sejtciklus különböző fázisait BrdU jelölés után FACS analízissel határoztuk meg RA kezelt és kezeletlen vad típusú és *Rybp null* mutáns őssejtekben (A), 3 napos EB-kben (B), 7 napos RA kezeletlen (C) és kezelt (D) EB-kben, 10 napos RA kezeletlen (E) és kezelt (F) EB-kben és 14 napos RA kezeletlen (G) és kezelt (H) EB-kben. A fekete oszlopok a vad típust a szürke oszlopok az *Rybp null* mutáns sejtekből származó eredményeket reprezentálják. Az y tengelyen a sejtek százalékos aránya, míg az x tengelyen a sejtciklus fázisait tüntettem fel. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **), Szórás: standard deviáció \pm SD.

6. Eredmények megvitatása

Korábban kimutattuk, hogy az *Rybp* esszenciális szerepet tölt be a központi idegrendszer fejlődése során (Pirity, Locker, and Schreiber-Agus 2005), valamint az *Rybp null* mutáns őssejtekből kevesebb terminális differenciálódott idegsejt típus (neuron, oligodendrocita, asztrocita) alakul ki az *in vitro* neurális differenciáció során (Kovacs et al. 2016).

Jelen tézis keretein belül választ kerestem arra a kérdésre, hogy milyen mechanizmusok állhatnak a korábban megfigyelt fenotípus hátterében, vagyis mi okozhatja terminális differenciáció zavarát. Így munkám során vizsgáltam, hogy az RYBP hogyan képes szabályozni a neurális fejlődés fontos lépéseit, mint például a retinsav jelátviteli útvonalat, mely kritikus az egér embrionális őssejtek *in vitro* ideg irányú differenciálódásában (J. Lu et al. 2009). Megvizsgáltam, hogyan változik a retinsav jelátviteli útvonal *Rybp* hiányában és ez hogyan kapcsolódik a már korábban megfigyelt magasabb *Pax6* szinthez.

Kimutattam, hogy a retinsav jelátviteli útvonal tagok génexpressziója már őssejtes állapotban megváltozik *Rybp* hiányában (8. ábra). A retinsav jelátviteli útvonal kritikus szerepet játszik a neurális differenciáció kezdeti szakaszában több neurális transzkripciós faktor aktiválása révén, mint például a PAX6 (Mangelsdorf et al. 1991; Piedrafita and Pfahl 1999). Az egyedfejlődés során a retinsav koncentrációja meghatározza a különböző sejtípusok kialakulását. A magas retinsav koncentráció neurális differenciálódást indukál, míg alacsony koncentrációban kardiomiocita differenciálódást eredményez (Rohwedel, Guan, and Wobus 1999). A retinsav jelátviteli útvonal önreguláció révén szabályozza magát a retinsav szintézis folyamatát is, ezáltal egy állandó szintet tartva fent. Így a retinsav jelátviteli útvonal megváltozása befolyásolja a szintetizált retinsav mennyiségét.

A retinsav jelátviteli útvonal tagok relatív génexpressziós vizsgálata során megfigyeltük, hogy szintjük megemelkedik *Rybp* hiányában az *in vitro* neurális differenciáció során (9. ábra). A *Pax6*-hez hasonlóan retinsav jelátviteli útvonal szabályozása alá eső gének esetében (*Stra6*, *Crabp1*, *Cyp26a1* – 9. ábra A, H, N) szignifikáns különbség volt megfigyelhető az *Rybp null* mutáns és vad típusú sejtek között. A retinsav indukálható *Stra6* transzmembrán receptor felelős a retinol sejtekbe történő felvételéért. A *Stra6* magas expressziós szintje az *Rybp null* mutáns sejtekben felveti annak a lehetőségét, hogy ezek a sejtek több retinolt képesek felvenni a környezetükből (9. ábra A). A *Stra6* magasabb szintje már önmagában is okozhatja a retinsav jelátviteli útvonal megváltozását (Wu and Ross 2010). Ugyanakkor a megemelkedett expressziója jelezheti a retinsav jelátviteli útvonal megváltozását, mivel a retinsav hatására

aktiválódó gének közé tartozik (Laursen et al. 2015). A retinol retinállá alakítását végző enzim, az *Rdh10* génexpressziós szintje hasonló kinetikát mutatott, mint a *Stra6*, ami arra utalhat, hogy a megnövekedett retinol felvétel miatt nagyobb mennyiségű átalakító enzimre van szükség ahhoz, hogy az *Rybp null* mutáns sejtekben a többlet retinolt retinállá alakítsák (9. ábra D). Ugyancsak megemelkedett a retinált retinsavvá átalakító *Raldh1* és *Raldh2* enzimek génexpressziós szintje (9. ábra F, G). Ezen eredmények alapján elmondhatjuk, hogy *Rybp* hiányában nem csak a retinol retinál, de a retinál retinsav átalakulás is fokozottabban működik. Ezen a ponton meg kell említeni, hogy az *in vitro* neurális differenciáció során a neuroektoderma kialakulását nagy koncentrációjú (5 μ M) all-transz retinsav hozzáadásával indukáljuk. A retinsav kis lipofil molekula révén képes a sejtmembránon keresztül diffúzióval bejutni a sejtekbe (Parker and Crouch 2010). Ebben az esetben az első jelátviteli útvonal tag, mely fontos szerepet játszik a CRABP, amely megköti a retinsavat és a sejtmagba (CRABP1) vagy a lebontó enzimekhez szállítja (CRABP2). Retinsav kezelést követően (d7) a *Crabp1* expressziója megemelkedett *Rybp* hiányában, ami arra utal, hogy több retinsav szállítódik az *Rybp null* mutáns sejtek sejtmagjába (9. ábra H). A magba kerülő retinsav a RAR/RXR komplexhez kötődve aktiválja az eddig represszált állapotban lévő géneket (Lara-Ramírez, Zieger, and Schubert 2013). A *Crabp1*-hoz hasonlóan, több retinsav jelátviteli útvonal tagnak (*Crabp1*, *Crabp2*, *Rar β* , *Cyp26a1* és *Cyp26b1*) is a retinsav kezelést követően (d7) emelkedik meg jelentősen az expressziója (9. ábra B, I, K, M, N). Ezen eredmények alapján elmondható, hogy az *Rybp* hiánya megváltoztatja a retinsav jelátviteli útvonalat a RAR/RXR komplexeken, a *Crabp1* és más retinsav jelátviteli útvonal tagok aktivációján keresztül. Mindezek a hatások együttesen válthatják ki az *Rybp* hiányában korábban megfigyelt fenotípust, miszerint több neurális progenitor sejt és kevesebb terminálisan differenciálódott idegsejt típus képződik. *Rybp* hiányában a PAX6 magasabb kifejeződése fehérje szinten is megfigyelhető volt (10. ábra). Ez retinsav kezelés hatására még kifejezettebb mértéket öltött az *Rybp null* mutáns sejtekben a vad típushoz képest a neurális differenciáció minden általunk vizsgált időpontjában. Az a megfigyelés, hogy retinsav kezelés nélkül is magasabb az *Rybp null* mutáns sejtek PAX6 szintje (10. ábra A, C) arra utal, hogy az *Rybp* kulcsfontosságú szerepet játszik a *Pax6* expressziójának szabályozásában a retinsav jelátviteli útvonaltól függetlenül. Retinsav kezelés hatására a különbség fokozódik, és a PAX6 szintje továbbra is magasabb marad *Rybp* hiányában az *in vitro* neurális differenciáció 10. és 14. napján is, ami arra utal, hogy az RYBP szükséges a *Pax6* repressziójához a neurális differenciáció terminális szakaszaiban (10. ábra B, D). A PAX6 megnövekedett szintje az *Rybp null* mutáns sejtekben az *in vitro* neurális

differentiáció 7. 10. és 14. napján (10. ábra B, D) eredményezheti azt, hogy egy olyan progenitor populáció keletkezik, mely nem képes a terminális differenciációra, mivel a PAX6 szintje nem csökken le megfelelő mértékben. Ezek alapján elképzelhető, hogy az RYBP közvetlen módon képes szabályozni a *Pax6* kifejeződését. RYBP és PAX6 kettős immunfestés segítségével kimutattuk, hogy az RYBP és a PAX6 fehérjék egymáshoz viszonyított sejten belüli kifejeződése dinamikusan változik az *in vitro* neurális differenciáció későbbi szakaszaiban (d10, d14) (11. ábra), melyből arra következtethetünk, hogy az RYBP a differenciáció terminális szakaszában represszálhatja a *Pax6* kifejeződését. Ezen eredményemet a közelmúltban a laborban áramlási citometria segítségével kísérletekkel is alátámasztottuk, ahol kimutattuk, hogy a progenitor sejtekben a PAX6 és az RYBP koexpresszálódik, majd a differenciáció későbbi szakaszaiban a kettős pozitív sejtek mennyisége lecsökken (Sutus et al. 2022).

Ezen hipotézist luciferáz riporter próbával vizsgálatam, melyekhez a *Pax6* *PI*-es promóter régióját használtuk. Ezek az eredmények megerősítették, hogy az RYBP dózisfüggő módon represszálja a *Pax6* génkifejeződését (12. ábra), mely arra utal, hogy az RYBP közvetlen módon szabályozhatja a *Pax6* gén kifejeződését a *PI* promóterén keresztül. A *Pax6* *PI*-es promóter régiójában több olyan kötőhely is található, ahova az RYBP vagy más ncPRC komplex tagok kölcsönható partnerei képesek kötődni. Ez arra utal, hogy az RYBP represszor funkcióját Polikomb függő módon tölti be. Az E2F és YY1 fehérjéről korábban kimutatták, hogy az RYBP-vel közreműködve vesznek részt egyes gének szabályozásában (Schlisio, Halperin, Vidal, Nevins, et al. 2002). Továbbá a YY1-ről feltételezik, hogy DNS-kötő fehérjeként kölcsönhat az ncPRC komplexekkel, azonban ennek bizonyítása még várat magára (Bajusz, Kovács, and Pirity 2018). Az RYBP más kölcsönható partnereiről, a MYC és MAX transzkripciós faktorokról korábban bizonyították, hogy szabályozó szerepet töltenek be a differenciálódás, valamint a neurogenesis folyamata során, illetve a daganatok kialakulásában (Sarkar and Sharma 2002; Grandori et al. 2000; Carroll et al. 2018).

A HEK293 sejtek kotranszfekciója RYBP-vel és a Polikomb represszor komplexek központi fehérjéjével, a RING1-nal erősebb repressziót váltott ki a *Pax6* *PI*-es promóterén, ami alapján szintén arra következtethetünk, hogy az RYBP valóban Polikomb függő módon represszálja a *Pax6* promóterét (13. ábra).

A neurális fejlődés során az egyik legfontosabb szerepet az ncPRC1.1 komplex játssza (Bajusz, Kovács, and Pirity 2018; Nunes et al. 2001). A komplex az idegrendszerben magas szinten van jelen. Az RYBP mellett a BCOR, a KDM2B, az SKP1/USP7 a RING1/RNF2, valamint a PCGF1 alkotják az ncPRC1.1 komplexet (Yan et al. 2017). Irodalmi adatok alapján ismert,

hogy őssejtekben a *Pax6* target génje a PCGF1 fehérjének (Morey et al. 2015; Onodera and Nakayama 2015; Scelfo et al. 2019; Sun et al. 2016) (3. táblázat). Ezek alapján felmerül a lehetőség, hogy az RYBP az ncPRC1.1 komplexen keresztül szabályozza a *Pax6* kifejeződését. Ennek bizonyítása további kísérleteket igényel. Továbbá a BCOR fehérje a BCOR komplex tagjaként is ismert, mely fontos szerepet tölt be a neurális differenciáció folyamatában (Gearhart et al. 2006; Tiberi et al. 2012). Az ncPRC1.1 komplexen kívül az ncPRC1.4 komplex is fontos szerepet játszik a neurális fejlődésben, mivel egyik központi tagjának, a *Pcgf4*-nek a null mutációja neurológiai rendellenességeket okoz egerekben (Van der Lugt et al. 1994). Őssejtekből származó ChIP-seq adatok alapján a *Pax6* a PCGF4 target génje (Morey et al. 2015; Onodera and Nakayama 2015; Scelfo et al. 2019; Sun et al. 2016) (3. táblázat). Ezek alapján lehetséges, hogy az RYBP a BCOR komplexel együttműködve vagy az ncPRC1.4 komplexen keresztül represszálja a *Pax6* promóterét.

Továbbá az irodalomból az is ismert, hogy neurális sejtekből származó minták ChIP-seq analízise során kapcsolatot találtak a *Pax6* gén és a PCGF2, valamint a PCGF5 fehérjék között (Morey et al. 2015; Onodera and Nakayama 2015; Scelfo et al. 2019; Sun et al. 2016) (3. táblázat). Az ncPRC1.5 komplex fontos szerepet játszik a központi idegrendszer fejlődésében, ezzel szemben az ncPRC1.2 komplexnek ilyen funkciója nem ismert (Bruggeman et al. 2005; Zencak et al. 2005; Bajusz, Kovács, and Pirity 2018). Ezen adatok alapján nem zárható ki annak a lehetősége, hogy az RYBP az ncPRC1.5 komplexen keresztül fejt ki represszálo hatását a *Pax6* gén kifejeződésére az *in vitro* neurális differenciáció során.

<i>Pax6</i>		
	őssejtes állapot	neurális sejtek
RYBP	–	N.A
RING1/RNF2	–	+
PCGF1	+	–
PCGF2	+	+
PCGF3	–	N.A
PCGF4	+	N.A
PCGF5	–	+
PCGF6	–	N.A

3. táblázat: Az RYBP, RING1/RNF2 és PCGF fehérjék kötő régiójának analízise a *Pax6* P1 promóterén őssejtekben és neurális sejtekben.

+: van kötés, -: nincs kötés, N.A: nincs adat

Összefoglalva azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az RYBP Polikomb függő módon represszálja a *Pax6*-et a *PI*-es promóterén keresztül az *in vitro* neurális differenciáció során, azonban a pontos mechanizmus még nem ismert.

A laborunkban már korábban lentivirális módszerrel létrehoztunk olyan sejtvonalatokat, amelyekbe az *Rybp* kódoló szakaszát visszavittük az *Rybp* null mutans sejtekbe (*Rybp^{res6}* és *Rybp^{res40}*). Ezeknek az úgynevezett „menekített” sejtvonalaknak a relatív génexpressziós vizsgálata során megállapítottuk, hogy az ektópusan expresszáldó *Rybp* részlegesen helyreállította a retinsav jelátviteli útvonal tagok génexpresszióját az *in vitro* neurális differenciáció során (16. ábra). A retinol és a retinál átalakításában szerepet játszó gének (*Rdh10*, *Raldh1*) expresszióját az ektópikus *Rybp* teljes egészében menekítette (14. ábra C, D). Ezen eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy az RYBP közvetlenebb szabályozási szerepet tölt be ezen gének esetén, mivel tudjuk, hogy az RYBP képes szabályozni más retinsav jelátviteli útvonal tagokat is, mint például a *Cyp26a1* (Zhao et al. 2020). Továbbá az ektópikus *Rybp* a retinsav indukálható *Pax6*-et is képes volt részlegesen menekíteni mind mRNS mind pedig fehérje szinten (15. ábra, 16. ábra). A menekített sejtvonalak esetében tapasztalható részleges menekítés egyik magyarázata lehet az, hogy a transzgenikus *Rybp* nem a saját promótere szabályozása alatt áll, tehát nem feltétlenül a megfelelő időben és sejtben expresszáldódik egy szabályozott módon, hanem minden sejtben nagy mértékben. A lentivirális expresszió gyakran eredményezi, hogy az expresszáltatott gén nemcsak egy kópiában található meg a sejtekben, hanem eltérő kópiaszámban, így a fiziológiásnál magasabb szinten fejeződik ki. Ez a túlzott expresszió szintén káros lehet a sejtekre nézve, különösen, hogy az *Rybp* hatása dózisfüggő.

Az eddig leírt eredmények magyarázzák, hogy az *Rybp* hiányában a progenitor sejtek mennyisége feldúsul, azonban azokból kevesebb terminálisan differenciálódott sejtípus képződik. Mivel mind az RYBP-ről és a PAX6-ról, mind pedig a retinsavról tudjuk, hogy szerepet játszanak a sejthalál folyamatában (Zheng et al. 2001; Simoni and Tolomeo 2001; Pirity, Locker, and Schreiber-Agus 2005; Beger et al. 2007), feltételeztük, hogy a kevesebb terminálisan differenciálódott sejtípus esetlegesen magasabb apoptózis eredményez *Rybp* hiányában. Annexin V fluoreszcens jelöléssel (17. ábra), valamint Kaszpáz 3 immunfestés (18. ábra) segítségével kimutattuk, hogy *Rybp* hiányában megemelkedik az apoptózis mértéke, különösen a retinsav kezelést követően (d7) (17. ábra A). A PAX6 magas szintje összefügghet az apoptózis megemelkedésével (20. ábra), tehát feltételezhető, hogy *Rybp* hiányában nagyobb mennyiségben keletkeznek progenitor sejtek, de azok mégsem lépnek a terminális differenciáció fázisába, mivel apoptotizálnak. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy az

Rybp hiánya mellett a retinsavnak is szerepe van az *Rybp null* mutáns sejtekben megfigyelt magasabb apoptózisban. Ezen elméletünket retinsav kezelt és kezeletlen embrionális testek FACS analízisével támasztottuk alá, mivel a retinsav kezelt mintákban az apoptózis mértéke megemelkedett *Rybp* hiányában az *in vitro* neurális differenciáció terminális szakaszaiban (d10, d14) (21. ábra). Annak érdekében, hogy meghatározzuk azt, hogy az RYBP mely apoptotikus jelátviteli útvonalakon fejti ki hatását megvizsgáltuk mind az belső (22. ábra), mind az külső (23. ábra) jelátviteli útvonal tagok relatív génexpresszióját. Eredményeink alapján *Rybp* hiányában mindkét apoptózis jelátviteli útvonal tagjainak mRNS szintje megemelkedik az *in vitro* neurális differenciáció során, jellemzően a differenciáció késői szakaszában (d10, d14) (22. ábra, 23. ábra). Ezen eredmények alapján arra következtethetünk, hogy az *Rybp* hiánya, valamint a retinsav jelátviteli útvonal megváltozása és a PAX6 megemelkedett szintje hozzájárul az *Rybp null* mutáns sejt kultúrában megfigyelt megnövekedett apoptózishoz, amely hozzájárulhat a terminális differenciáció hibájához.

Mivel az apoptózis külső jelátviteli útvonalának kiváltó szignálja megegyezik a nekroptózis jelátviteli útval (Dillon et al. 2012; Holler et al. 2000; Bonnet et al. 2011), így megvizsgáltuk a nekroptózis mértékét is az *in vitro* neurális differenciáció során vad típusú és *Rybp null* mutáns mintákban. Ethidium homodimer III jelöléssel kimutattuk, hogy a nekroptózis mértéke retinsav kezelést követően szignifikánsan megemelkedik *Rybp* hiányában az *in vitro* neurális differenciáció során (24. ábra). Továbbá a *Rip1*, mely a TNF- α szignál közvetítette nekroptózis jelátviteli útvonal kulcsfontosságú molekulája, expressziója a neurális differenciáció végén szignifikánsan megemelkedik az *Rybp null* mutáns sejtekben a vad típushoz képest (27. ábra). A kapott eredmények alapján elmondható, hogy *Rybp* hiányában nem csak az apoptózis de a nekroptózis szintje is megemelkedik, így valószínűleg ezek együttesen hozzájárulnak a kevesebb terminálisan differenciálódott sejt típus kialakulásához. Annak a megállapítása, hogy valójában mi indukálja a progenitorok pusztulását, további vizsgálatokat igényel.

Őssejtekből származó ChIP-seq adatok (Turner and Bracken 2013; Morey et al. 2015) elemzése során kimutattuk, hogy az apoptózis jelátviteli útvonal tagok közül a *Kaspáz 3*, a *Fadd*, a *Diablo*, a *Tnf-R1*, az *Act1*, valamint a *Casp8* az RYBP target génjei közé tartoznak. Továbbá a *Tnf-R1*, a *Kaspáz 3* és a *Kaspáz 8* célgénjei az RNF2-nek is, mely központi eleme mind a PRC1, mind pedig az ncPRC1 komplexeknek. A *Bcl2* a PRC1 (RNF2 és CBX2) és ncPRC1 (RNF2 és PCGF1) komplex tagok közül több fehérjének is target génje. Az *Act1*, mely fontos szerepet játszik a citokin válasz kialakításában, target génje az RYBP-n kívül a PRC1 komplex tag CBX2-nek és az ncPRC1.1 komplex tag PCGF1-nek is. A nekroptózis jelátvitel

kulcsfontosságú génjei a *Rip1* és *Rip2* célgénjei az RNF2-nek, így több apoptózis jelátviteli útvonal taghoz (*Tnf-R1*, *Kaspáz 3*, *Kaspáz 8*, *Bcl2*, *Act1*) hasonlóan mind PRC1, mind pedig ncPRC1 szabályozása alatt állhatnak (2. táblázat). A kapott eredmények alapján elmondható, hogy az apoptózis és a nekrosis folyamatát az RYBP Polikomb függő módon szabályozhatja az ncPRC1 komplexeken keresztül, valamint a jelátviteli útvonal tagok az RYBP-től függetlenül más Polikomb represszor fehérjék szabályozása alatt is állhatnak, így mind a PRC és ncPRC komplexek szerepet játszhatnak az apoptózis különböző folyamatainak regulációjában.

A progenitorok feldusulásának egyik lehetséges oka lehet a sejtciklus egyes fázisainak megváltozása ezért megvizsgáltuk, hogy az *Rybp* hiánya és a retinsav kezelés hogyan befolyásolja a sejtciklus alakulását. Irodalmi adatokból szinten ismert, hogy a retinoid származékok, legfőképpen a retinsav befolyásolja a sejtciklusból való kilépést és a differenciáció folyamatát, egy eddig meg azonosítatlan mechnaizmus által (Das et al. 2015). Eredményeink alapján a differenciáció kezdeti szakaszában (d0, d3) a különböző sejtfázisok aránya nem változott (26. ábra A, B). Az első különbségeket retinsav kezelést követően (d7) figyeltük meg, amikor is retinsav kezelés hatására az *Rybp null* mutáns sejtek esetén lecsökkent az S fázisban lévő sejtek aránya és megnőtt a G1 és G2 fázisban lévő sejtek száma (26. ábra D). A legnagyobb különbséget a retinsav kezelt és kezeletlen minták között a differenciáció késői szakaszaiban (d10 és d14) észleltük. A 10. és 14. napokon az S fázisban lévő sejtek aránya mindkét sejtvonal esetében drasztikusan lecsökkent a retinsav kezelt mintákban és ezzel párhuzamosan a G1 fázisban található sejtek mennyisége megemelkedett (26. ábra F, H), míg retinsav kezelés hiányában a sejtek jelentős része S fázisban volt (26. ábra E, G). A kapott eredmények arra utalnak, hogy az *Rybp* hiánya nem okoz jelentős különbségeket a sejtciklus fázisainak eloszlásában, azonban a retinsav kezelés következtében a sejtek kilépnek az S fázisból és G1 fázisba kerülnek, mely megfelel a terminális differenciáció folyamatának. Azonban az *Rybp null* mutáns sejtek esetén megfigyelhető, hogy a differenciáció végén (d14) szignifikánsan több sejt tartózkodik S fázisban, ami magyarázattal szolgálhat a már korábban megfigyelt kevesebb érett neurális sejt típus kialakulására. A laboratóriumunkban a kardiális differenciáció során is vizsgáltuk a sejtciklus különböző fázisaiban a sejtek eloszlását az idő függvényében, ahol azt tapasztaltuk, hogy már a differenciáció kezdeti szakaszában eltérés volt megfigyelhető a vad típusú és *Rybp null* mutáns sejtek között. A retinsav kezeletlen neurális mintákhoz hasonlóan az *Rybp^{-/-}* kardiális kultúrák esetében is kevesebb sejt lépett ki a sejtciklusból, amely fokozottabb proliferációra utal, így hozzájárulva a rendellenes neurális és kardiális fejlődéshez. Az itt taglalt eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a retinsav kezelés

nagyban befolyásolja a sejtciklus fázisait a neurális differenciáció során mind vad típusú mind pedig *Rybp null* mutáns mintákban.

Ezek alapján, a retinsav jelátviteli útvonal szabályozása alatt álló neurális transzkripció faktor, PAX6 magasabb expresszióját az *Rybp null* mutáns sejtekben okozhatja a retinsav jelátviteli útvonal megváltozása. Továbbá az *Rybp* hiánya, a PAX6 magas szintje és a megváltozott retinsav jelátvitel együttesen hozzájárulhat az apoptózis és nekrosis szintjének megemelkedéséhez az *in vitro* neurális differenciáció során, amely magyarázata lehet az *Rybp null* mutáns neurális kultúrákban megfigyelt hibás terminális differenciációnak.

Dolgozatomban kimutattam, hogy az *Rybp* fontos szerepet tölt be a RA jelátviteli útvonal tagok génexpressziójának szabályozásában és hogy transzkripcionálisan szabályozza a RA jelátviteli útvonal target gén *Pax6*-et. Ezáltal az *Rybp* egy új, eddig még nem jellemzett szerepére világítottam rá a neurális differenciáció terminális szakaszában. Az eredményeink a jövőben hozzájárulhatnak a különböző központi idegrendszeri fejlődési rendellenességek részletesebb megismeréséhez.

7. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Pírity Melinda Katalin tudományos főmunkatársnak, hogy lehetőséget biztosított számomra és megteremtette a feltételeket, hogy a csoportjában dolgozva elkészíthessem MSc diplomadolgozatom után, PhD értekezésemet is. Köszönöm a folyamatos szakmai és szellemi támogatást, a rengeteg tudást, amit neki köszönhetően szereztem, valamint a lehetőséget, hogy egy érdekes és izgalmas témán dolgozhattam.

Köszönöm kollégáimnak Dr. Kovács Gergőnek, Dr. Bajusz Izabellának, Szabó Viktóriának, Surya Henry-nek, Dudás Krisztinának és Adorján Lilinek a kísérletek elvégzésében nyújtott segítséget, a támogatást és a jókedvet, amivel könnyebbé tették a munkát.

Szeretném megköszönni Dr. Erdélyi Miklósnak, hogy az ELKH Genetikai Intézetében írhattam PhD tézisemet, Dr. Endre Gabriellának a qRT-PCR kísérletekben nyújtott segítségét, Dr. Kozma-Bognár Lászlónak, hogy segített a luciferáz riporter próbák kivitelezésében, Dr. Ayaydin Ferhan-nak, Dr. Steinbach Gábornak és Valkonyiné Kelemen Ildikónak a konfokális mikroszkóp használatában nyújtott segítségüket.

Külön szeretnék köszönetet mondani Szabó Viktóriának és Ürmösi Adélnak, akikkel közösen vágunk bele ebbe a csodálatos és nehéz kalandba, amit doktori képzésnek hívnak. Hálás vagyok a folyamatos támogatásokért, bátorításokért és szeretetekért. Nélkületek sokkal nehezebb lett volna!

Végül szeretnék köszönetet mondani a családomnak, barátaimnak és páromnak, Áronnak, hogy mindig bátorítottak és végig hittek bennem és a legnehezebb napokon is szeretettel és megértéssel fordultak felém.

A disszertációban elvégzett kutatásokat az alábbi pályázatok támogatták: GINOP-2.3.2-15-2016-00001 és a GINOP-2.3.2-15-2016-00039.

8. Irodalomjegyzék

- Adameova, Adriana, Eva Goncalvesova, Adrian Szobi, and Naranjan S. Dhalla. 2016. “Necroptotic Cell Death in Failing Heart: Relevance and Proposed Mechanisms.” *Heart Failure Reviews* 21 (2): 213–21. <https://doi.org/10.1007/s10741-016-9537-8>.
- Alexei Degterev, Junichu Hitomi, Megan Germscheid, Irene L Ch'en, Olga Korkina, Xin Teng, Derek Abbott, Gregory D Cuny, Chengyuan, Gerhard Wagner, Stephen M Hendrick, Scott A Gerber, Alexey Lugovskoy, Junying Yuan. 2008. “Identification of RIP1 Kinase as a Specific Cellular Target of Necrostatins.” *Physiology & Behavior* 176 (3): 139–48. <https://doi.org/10.1038/nchembio.83>. Identification.
- Almeida, Mafalda, Greta Pintacuda, Osamu Masui, Yoko Koseki, Michal Gdula, David Brown, Arne Mould, et al. 2019. “Europe PMC Funders Group PCGF3 / 5-PRC1 Initiates Polycomb Recruitment in X Chromosome Inactivation” 356 (6342): 1081–84. <https://doi.org/10.1126/science.aal2512>. PCGF3/5-PRC1.
- Ameisen, J. C., H. Groux, and A. Capron. 1992. “MORT PROGRAMMEE (APOPTOSE) DES LYMPHOCYTES T CD4+ ET PATHOGENIE DU SIDA.” In *Comptes Rendus de l'Academie Des Sciences - Serie III*, 314:47–50. C R Acad Sci III. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1358412/>.
- Anderson, Tonya R., Eva Hedlund, and Ellen M. Carpenter. 2002. “Differential Pax6 Promoter Activity and Transcript Expression during Forebrain Development.” *Mechanisms of Development* 114 (1–2): 171–75. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00051-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00051-5).
- Andrew G. Renehan, Catherin Booth, Christopher S. Potten. 2001. “What Is Apoptosis and Why Is It Important?” *Comorbidity: Symptoms, Conditions, Behavior and Treatments*, no. June: 1–22. https://doi.org/10.1007/978-3-030-32545-9_1.
- Anthony Atala, Robert Lanza. n.d. “Handbook of Stem Cells - 2nd Edition.” 2012. Accessed April 8, 2021. <https://www.elsevier.com/books/handbook-of-stem-cells/atala/978-0-12-385942-6>.
- Arrigoni, Rachele, Steven L. Alam, Joseph A. Wamstad, Vivian J. Bardwell, Wesley I. Sundquist, and Nicole Schreiber-Agus. 2006. “The Polycomb-Associated Protein Rybp Is a Ubiquitin Binding Protein.” *FEBS Letters* 580 (26): 6233–41. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.027>.
- Bajusz, Izabella, Surya Henry, Enikő Sutus, Gergő Kovács, and Melinda K. Pirtty. 2019.

- “Evolving Role of RING1 and YY1 Binding Protein in the Regulation of Germ-Cell-Specific Transcription.” *Genes* 10 (11): 1–33. <https://doi.org/10.3390/genes10110941>.
- Bajusz, Izabella, Gergő Kovács, and Melinda Pirity. 2018. “From Flies to Mice: The Emerging Role of Non-Canonical PRC1 Members in Mammalian Development.” *Epigenomes* 2 (1): 4. <https://doi.org/10.3390/epigenomes2010004>.
- Barnhart, Bryan C, Elizabeth C Alappat, and Marcus E Peter. 2003. “The CD95 Type I/Type II Model.” *Seminars in Immunology* 15 (3): 185–93. [https://doi.org/10.1016/s1044-5323\(03\)00031-9](https://doi.org/10.1016/s1044-5323(03)00031-9).
- Beger, Joachim, Silke Berger, Tran Cong Tou, Marcello D’Amelio, Francesco Cecconi, Jessica A. Gorski, Kevin R. Jones, Peter Gruss, and Anastassia Stoykova. 2007. “Conditional Activation of Pax6 in the Developing Cortex of Transgenic Mice Causes Progenitor Apoptosis.” *Development* 134 (7): 1311–22. <https://doi.org/10.1242/dev.02809>.
- Bel-Vialar, Sophie, François Medevielle, and Fabienne Pituello. 2007. “The on/off of Pax6 Controls the Tempo of Neuronal Differentiation in the Developing Spinal Cord.” *Developmental Biology* 305 (2): 659–73. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.02.012>.
- Bergquist, H. 1964. “The Formation of the Front Part of the Neural Tube.” *Experientia* 20 (2): 92–93. <https://doi.org/10.1007/BF02151260>.
- Bibel, Miriam, Jens Richter, Katrin Schrenk, Kerry Lee Tucker, Volker Staiger, Martin Korte, Magdalena Goetz, and Yves-Alain Barde. 2004. “Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into a Defined Neuronal Lineage.” *Nature Neuroscience* 7 (9): 1003–9. <https://doi.org/10.1038/nn1301>.
- Bonnet, Marion C., Daniela Preukschat, Patrick Simon Welz, Geert Van Loo, Maria A. Ermolaeva, Wilhelm Bloch, Ingo Haase, and Manolis Pasparakis. 2011. “The Adaptor Protein FADD Protects Epidermal Keratinocytes from Necroptosis In Vivo and Prevents Skin Inflammation.” *Immunity* 35 (4): 572–82. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.08.014>.
- Brenner, Dirk, Heiko Blaser, and Tak W. Mak. 2015. “Regulation of Tumour Necrosis Factor Signalling: Live or Let Die.” *Nature Reviews Immunology* 15 (6): 362–74. <https://doi.org/10.1038/nri3834>.
- Bruggeman, Sophia W.M., Merel E. Valk-Lingbeek, Petra P.M. Van Der Stoop, Jacqueline J.L. Jacobs, Karin Kieboom, Ellen Tanger, Danielle Hulsman, et al. 2005. “Ink4a and Arf Differentially Affect Cell Proliferation and Neural Stem Cell Self-Renewal in Bmi1-Deficient Mice.” *Genes and Development* 19 (12): 1438–43.

- <https://doi.org/10.1101/gad.1299305>.
- Buchou, Thierry, Muriel Vernet, Olivier Blond, Hans H. Jensen, Hervé Pointu, Birgitte B. Olsen, Claude Cochet, Olaf-Georg Issinger, and Brigitte Boldyreff. 2003. "Disruption of the Regulatory β Subunit of Protein Kinase CK2 in Mice Leads to a Cell-Autonomous Defect and Early Embryonic Lethality." *Molecular and Cellular Biology* 23 (3): 908–15. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.3.908-915.2003>.
- Buja, L M, M L Eigenbrodt, and E H Eigenbrodt. 1993. "Apoptosis and Necrosis. Basic Types and Mechanisms of Cell Death." *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 117 (12): 1208–14.
- Carroll, Patrick A., Brian W. Freie, Haritha Mathsaraja, and Robert N. Eisenman. 2018. "The MYC Transcription Factor Network: Balancing Metabolism, Proliferation and Oncogenesis." *Frontiers of Medicine*. Higher Education Press. <https://doi.org/10.1007/s11684-018-0650-z>.
- Chan, Ho Lam, and L. Morey. 2019. "Emerging Roles for Polycomb-Group Proteins in Stem Cells and Cancer." *Trends in Biochemical Sciences* 44 (8): 688–700. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.04.005>.
- Chan, Sic L., and Mark P. Mattson. 1999. "Caspase and Calpain Substrates: Roles in Synaptic Plasticity and Cell Death." *Journal of Neuroscience Research* 58 (1): 167–90. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19991001\)58:1<167::AID-JNR16>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19991001)58:1<167::AID-JNR16>3.0.CO;2-K).
- Chen, Deng, Jianbing Zhang, Mao Li, Elizabeth R. Rayburn, Hui Wang, and Ruiwen Zhang. 2009. "RYBP Stabilizes P53 by Modulating MDM2." *EMBO Reports* 10 (2): 166–72. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.231>.
- Chen, Hao, Moses J. Namkung, and Mont R. Juchau. 1995. "Biotransformation of All-Trans-Retinol and All-Trans-Retinal to All-Trans-Retinoic Acid in Rat Conceptal Homogenates." *Biochemical Pharmacology* 50 (8): 1257–64. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)02005-W](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)02005-W).
- Chinnaiyan, Arul M., Karen O'Rourke, Muneesh Tewari, and Vishva M. Dixit. 1995. "FADD, a Novel Death Domain-Containing Protein, Interacts with the Death Domain of Fas and Initiates Apoptosis." *Cell* 81 (4): 505–12. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90071-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90071-3).
- Croce, Luciano Di, and Kristian Helin. 2013. "Transcriptional Regulation by Polycomb Group Proteins." *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (10): 1147–55. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2669>.

- Danen-van Oorschot, A. A.A.M., P. Voskamp, M. C.M.J. Seelen, M. H.A.M. van Miltenburg, M. W. Bolk, S. W. Tait, J. G.R. Boesen-de Cock, J. L. Rohn, J. Borst, and M. H.M. Noteborn. 2004. "Human Death Effector Domain-Associated Factor Interacts with the Viral Apoptosis Agonist Apoptin and Exerts Tumor-Preferential Cell Killing." *Cell Death and Differentiation* 11 (5): 564–73. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401391>.
- Daniel L. Chao, Le Ma, Kang Shen. 2009. "Nat Rev Neurosci" 10 (4): 262–71. <https://doi.org/10.1038/nrn2594>.Transient.
- Das, Bhaskar C, Pritam Thapa, Radha Karki, Sasmita Das, Ting-chun Liu, Ingrid Torregroza, Darren P Wallace, et al. 2015. "HHS Public Access" 22 (2): 673–83. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.11.025>.Retinoic.
- Davis, Lea K., K. J. Meyer, D. S. Rudd, A. L. Librant, E. A. Epping, V. C. Sheffield, and T. H. Wassink. 2008. "Pax6 3' Deletion Results in Aniridia, Autism and Mental Retardation." *Human Genetics* 123 (4): 371–78. <https://doi.org/10.1007/s00439-008-0484-x>.
- DeGregori, James, and David G. Johnson. 2012. "Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis." *Current Molecular Medicine* 6 (7): 739–48. <https://doi.org/10.2174/156652406778773484>.
- Degterev, Alexei, Zhihong Huang, Michael Boyce, Yaqiao Li, Prakash Jagtap, Noboru Mizushima, Gregory D. Cuny, Timothy J. Mitchison, Michael A. Moskowitz, and Junying Yuan. 2005. "Chemical Inhibitor of Nonapoptotic Cell Death with Therapeutic Potential for Ischemic Brain Injury." *Nature Chemical Biology* 1 (2): 112–19. <https://doi.org/10.1038/nchembio711>.
- Dillon, Christopher P., Andrew Oberst, Ricardo Weinlich, Laura J. Janke, Tae Bong Kang, Tehila Ben-Moshe, Tak W. Mak, David Wallach, and Douglas R. Green. 2012. "Survival Function of the FADD-CASPASE-8-CFLIPL Complex." *Cell Reports* 1 (5): 401–7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.03.010>.
- Duester, Gregg. 2000. "Families of Retinoid Dehydrogenases Regulating Vitamin A Function." *European Journal of Biochemistry* 267 (14): 4315–24. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01497.x>.
- E García, C Marcos-Gutiérrez, M del Mar Lorente, J C Moreno, M Vidal. 1999. "RYBP, a New Repressor Protein That Interacts with Components of the Mammalian Polycomb Complex, and with the Transcription Factor YY1." *The EMBO Journal* 18 (12): 3404.
- Eichele, Gregor. 1999. "A Vital Role for Vitamin A." *Nature Genetics* 21 (4): 346–47. <https://doi.org/10.1038/7665>.

- Epstein, Jonathan, Jiexing Cai, Tom Glaser, Lisa Jepeal, and Richard Maas. 1994. "Identification of a Pax Paired Domain Recognition Sequence and Evidence for DNA-Dependent Conformational Changes." *Journal of Biological Chemistry* 269 (11): 8355–61. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)37201-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)37201-0).
- Ericson, J, P Rashbass, A Schedl, S Brenner-Morton, A Kawakami, V van Heyningen, T.M Jessell, and J Briscoe. 1997. "Pax6 Controls Progenitor Cell Identity and Neuronal Fate in Response to Graded Shh Signaling." *Cell* 90 (1): 169–80. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80323-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80323-2).
- Farhy, Chen, Michael Elgart, Zehavit Shapira, Varda Oron-Karni, Orly Yaron, Yotam Menuchin, Gideon Rechavi, et al. 2013. "Pax6 Is Required for Normal Cell-Cycle Exit and the Differentiation Kinetics of Retinal Progenitor Cells." Edited by Sandro Banfi. *PLoS ONE* 8 (9): e76489. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076489>.
- Favor, Jack, Alan Bradley, Nathalie Conte, Dirk Janik, Walter Pretsch, Peter Reitmeir, Michael Rosemann, Wolfgang Schmahl, Johannes Wienberg, and Irmgard Zaus. 2009. "Analysis of Pax6 Contiguous Gene Deletions in the Mouse, *Mus Musculus*, Identifies Regions Distinct from Pax6 Responsible for Extreme Small-Eye and Belly-Spotting Phenotypes." *Genetics* 182 (4): 1077–88. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.104562>.
- Fujii, H., Takashi Sato, Sinya Kaneko, Osamu Gotoh, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Kanju Osawa, Shigeaki Kato, et al. 1997. "Metabolic Inactivation of Retinoic Acid by a Novel P450 Differentially Expressed in Developing Mouse Embryos." *The EMBO Journal* 16 (14): 4163–73. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.14.4163>.
- Fukuda, Tsuyoshi, Akinori Tokunaga, Reiko Sakamoto, and Nobuaki Yoshida. 2011. "Fbxl10/Kdm2b Deficiency Accelerates Neural Progenitor Cell Death and Leads to Exencephaly." *Molecular and Cellular Neuroscience* 46 (3): 614–24. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.01.001>.
- Gage, Fred H. 2000. "Mammalian Neural Stem Cells." *Science* 287 (5457): 1433–38. <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1433>.
- Gajović, S, L St-Onge, Y Yokota, and P Gruss. 1997. "Retinoic Acid Mediates Pax6 Expression during in Vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells." *Differentiation; Research in Biological Diversity* 62 (4): 187–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9503603>.
- Gao, Zhonghua, Pedro Lee, James M. Stafford, Melanie Von Schimmelmann, Anne Schaefer, and Danny Reinberg. 2014. "An AUTS2-Polycomb Complex Activates Gene Expression in the CNS." *Nature* 516 (7531): 349–54.

- <https://doi.org/10.1038/nature13921>.
- Gao, Zhonghua, Jin Zhang, Roberto Bonasio, Francesco Strino, Ayana Sawai, Fabio Parisi, Yuval Kluger, et al. 2012. “PCGF Homologs, CBX Proteins, and RYBP Define Functionally Distinct PRC1 Family Complexes.” *Molecular Cell* 45 (3): 344–56. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.002>.
- Gearhart, Micah D., Connie M. Corcoran, Joseph A. Wamstad, and Vivian J. Bardwell. 2006. “Polycomb Group and SCF Ubiquitin Ligases Are Found in a Novel BCOR Complex That Is Recruited to BCL6 Targets.” *Molecular and Cellular Biology* 26 (18): 6880–89. <https://doi.org/10.1128/mcb.00630-06>.
- Gibert, Benjamin, and Patrick Mehlen. 2015. “Dependence Receptors and Cancer: Addiction to Trophic Ligands.” *Cancer Research* 75 (24): 5171–75. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3652>.
- Glaser, Tom, David S. Walton, and Richard L. Maas. 1992. “Genomic Structure, Evolutionary Conservation and Aniridia Mutations in the Human PAX6 Gene.” *Nature Genetics* 2 (3): 232–39. <https://doi.org/10.1038/ng1192-232>.
- Grandori, C., S. M. Cowley, L. P. James, and R. N. Eisenman. 2000. “The Myc/Max/Mad Network and the Transcriptional Control of Cell Behavior.” *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Annu Rev Cell Dev Biol. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.653>.
- Gross, Atan, Xiao Ming Yin, Kun Wang, Michael C. Wei, Jennifer Jockel, Curt Milliman, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, and Stanley J. Korsmeyer. 1999. “Caspase Cleaved BID Targets Mitochondria and Is Required for Cytochrome c Release, While BCL-X(L) Prevents This Release but Not Tumor Necrosis Factor-R1/Fas Death.” *Journal of Biological Chemistry* 274 (2): 1156–63. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.2.1156>.
- Hao, Yi Heng, Michael D. Fountain, Klementina Fon Tacer, Fan Xia, Weimin Bi, Sung Hae L. Kang, Ankita Patel, et al. 2015. “USP7 Acts as a Molecular Rheostat to Promote WASH-Dependent Endosomal Protein Recycling and Is Mutated in a Human Neurodevelopmental Disorder.” *Molecular Cell* 59 (6): 956–69. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.033>.
- Harvey, N. L., and S. Kumar. 1998. “The Role of Caspases in Apoptosis.” *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Adv Biochem Eng Biotechnol. <https://doi.org/10.1007/bfb0102307>.
- Hitoshi, Seiji, Vincent Tropepe, Marc Ekker, and Derek van der Kooy. 2002. “Neural Stem

- Cell Lineages Are Regionally Specified, but Not Committed, within Distinct Compartments of the Developing Brain.” *Development* 129 (1).
- Holler, Nils, Rossana Zaru, Olivier Micheau, Margot Thome, Antoine Attinger, Salvatore Valitutti, Jean Luc Bodmer, Pascal Schneider, Brian Seed, and Jürg Tschopp. 2000. “Fas Triggers an Alternative, Caspase-8-Independent Cell Death Pathway Using the Kinase RIP as Effector Molecule.” *Nature Immunology* 1 (6): 489–95.
<https://doi.org/10.1038/82732>.
- Huang, Xiao, and Jean-Pierre Saint-Jeannet. 2004. “Induction of the Neural Crest and the Opportunities of Life on the Edge.” *Developmental Biology* 275 (1): 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.07.033>.
- Huillard, Emmanuelle, Léa Ziercher, Olivier Blond, Michael Wong, Jean-Christophe Deloulme, Serhiy Souchelnyskyi, Jacques Baudier, Claude Cochet, and Thierry Buchou. 2010. “Disruption of CK2 β in Embryonic Neural Stem Cells Compromises Proliferation and Oligodendrogenesis in the Mouse Telencephalon.” *Molecular and Cellular Biology* 30 (11): 2737–49. <https://doi.org/10.1128/mcb.01566-09>.
- Irrinki, K. M., K. Mallilankaraman, R. J. Thapa, H. C. Chandramoorthy, F. J. Smith, N. R. Jog, R. K. Gandhirajan, et al. 2011. “Requirement of FADD, NEMO, and BAX/BAK for Aberrant Mitochondrial Function in Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Necrosis.” *Molecular and Cellular Biology* 31 (18): 3745–58.
<https://doi.org/10.1128/mcb.05303-11>.
- Iyer, Shankar S., Wilco P. Pulskens, Jeffrey J. Sadler, Loes M. Butter, Gwendoline J. Teske, Tyler K. Ulland, Stephanie C. Eisenbarth, et al. 2009. “Necrotic Cells Trigger a Sterile Inflammatory Response through the Nlrp3 Inflammasome.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (48): 20388–93.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0908698106>.
- Joseph Alan Wamstad, Connie Marie Corcoran, Anne Marjorie Keating, Vivian J. Bardwell. 2008. “Role of the Transcriptional Corepressor Bcor in Embryonic Stem Cell Differentiation and Early Embryonic Development.” *PLoS ONE* 3 (7).
- Julien, Olivier, and James A. Wells. 2017. “Caspases and Their Substrates.” *Cell Death and Differentiation* 24 (8): 1380–89. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.44>.
- Jun, Susie, and Claude Desplan. 1996. “Cooperative Interactions between Paired Domain and Homeodomain.” *Development* 122 (9): 2639–50.
- Kallenberger, Stefan M, Joël Beaudouin, Juliane Claus, Carmen Fischer, K Peter, Stefan Legewie, and Roland Eils. 2015. “NIH Public Access” 7 (316).

- <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004738.Intra->.
- Kerr, J. F.R., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. "Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics." *British Journal of Cancer* 26 (4): 239–57. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>.
- Kerr, John F.R. 2002. "History of the Events Leading to the Formulation of the Apoptosis Concept." *Toxicology* 181–182 (December): 471–74. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00457-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00457-2).
- Kim, Jiha, and James D. Lauderdale. 2006. "Analysis of Pax6 Expression Using a BAC Transgene Reveals the Presence of a Paired-Less Isoform of Pax6 in the Eye and Olfactory Bulb." *Developmental Biology* 292 (2): 486–505. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.12.041>.
- Kingston, Robert E., Claudia A. Chen, and John K. Rose. 2003. "Calcium Phosphate Transfection." *Current Protocols in Molecular Biology* 63 (1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0901s63>.
- Kiraz, Yağmur, Aysun Adan, Melis Kartal Yandim, and Yusuf Baran. 2016. "Major Apoptotic Mechanisms and Genes Involved in Apoptosis." *Tumor Biology*, April, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5035-9>.
- Kon, N., J. Zhong, Y. Kobayashi, M. Li, M. Szabolcs, T. Ludwig, P. D. Canoll, and W. Gu. 2011. "Roles of HAUSP-Mediated P53 Regulation in Central Nervous System Development." *Cell Death and Differentiation* 18 (8): 1366–75. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.12>.
- Kovacs, Gergo, Viktoria Szabo, and Melinda K. Purity. 2016. "Absence of Rybp Compromises Neural Differentiation of Embryonic Stem Cells." *Stem Cells International* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4034620>.
- Kovacs, Gergo, Viktoria Szabo, Melinda K. Purity, Gergo Kovacs, Viktoria Szabo, and Melinda K. Purity. 2016. "Absence of Rybp Compromises Neural Differentiation of Embryonic Stem Cells." *Stem Cells International* 2016: 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/4034620>.
- Lara-Ramírez, Ricardo, Elisabeth Zieger, and Michael Schubert. 2013. "Retinoic Acid Signaling in Spinal Cord Development." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (7): 1302–13. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.002>.
- Laursen, Kristian B., Vasundhra Kashyap, Joseph Scandura, and Lorraine J. Gudas. 2015. "An Alternative Retinoic Acid-Responsive Stra6 Promoter Regulated in Response to Retinol Deficiency." *Journal of Biological Chemistry* 290 (7): 4356–66.

- <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.613968>.
- Leist, Marcel, and Marja Jäättelä. 2001. "Four Deaths and a Funeral: From Caspases to Alternative Mechanisms." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nat Rev Mol Cell Biol. <https://doi.org/10.1038/35085008>.
- Levine, Beth, and Guido Kroemer. 2008. "Autophagy in the Pathogenesis of Disease." *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>.
- Lin, Yong, Anne Devin, Yolanda Rodriguez, and Zheng Gang Liu. 1999. "Cleavage of the Death Domain Kinase RIP by Caspase-8 Prompts TNF-Induced Apoptosis." *Genes and Development* 13 (19): 2514–26. <https://doi.org/10.1101/gad.13.19.2514>.
- Lou, David Y., Isabel Dominguez, Paul Toselli, Esther Landesman-Bollag, Conor O'Brien, and David C. Seldin. 2008. "The Alpha Catalytic Subunit of Protein Kinase CK2 Is Required for Mouse Embryonic Development." *Molecular and Cellular Biology* 28 (1): 131–39. <https://doi.org/10.1128/mcb.01119-07>.
- Lu, Bingwei, Lily Jan, and Yuh Nung Jan. 2000. "Control of Cell Divisions in the Nervous System: Symmetry and Asymmetry." *Annual Review of Neuroscience*. Annu Rev Neurosci. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.531>.
- Lu, Jianfeng, Li Tan, Ping Li, Hui Gao, Bo Fang, Shoudong Ye, Zhe Geng, Ping Zheng, and Houyan Song. 2009. "All-Trans Retinoic Acid Promotes Neural Lineage Entry by Pluripotent Embryonic Stem Cells via Multiple Pathways." *BMC Cell Biology* 10 (July). <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-57>.
- Lugt, N. M.T. Van der, J. Domen, K. Linders, M. Van Roon, E. Robanus-Maandag, H. Te Riele, M. Van der Valk, et al. 1994. "Posterior Transformation, Neurological Abnormalities, and Severe Hematopoietic Defects in Mice with a Targeted Deletion of the Bmi-1 Proto- Oncogene." *Genes and Development* 8 (7): 757–69. <https://doi.org/10.1101/gad.8.7.757>.
- M.Hanson, Isabel, Anne Seawright, Karen Hardman, Shirley Hodgson, Dmitri Zaletayev, Gyorgy Fekete, and Veronica van Heyningen. 1993. "PAX6 Mutations in Aniridia." *Human Molecular Genetics* 2 (7): 915–20. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.7.915>.
- Maden, Malcolm. 2002. "Retinoid Signalling in the Development of the Central Nervous System." *Nature Reviews Neuroscience* 3 (11): 843–53. <https://doi.org/10.1038/nrn963>.
- Mandel, Silvia A., Tali Fishman-Jacob, and Moussa B.H. Youdim. 2009. "Modeling Sporadic Parkinson's Disease by Silencing the Ubiquitin E3 Ligase Component, SKP1A." *Parkinsonism and Related Disorders* 15 (SUPPL. 3): S148–51. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(09\)70803-X](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70803-X).

- Mangelsdorf, David J., Kazuhiko Umesono, Steven A. Kliewer, Uwe Borgmeyer, Estelita S. Ong, and Ronald M. Evans. 1991. "A Direct Repeat in the Cellular Retinol-Binding Protein Type II Gene Confers Differential Regulation by RXR and RAR." *Cell* 66 (3): 555–61. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90018-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90018-0).
- Manuel, Martine N., Da Mi, John O. Masonand, and David J. Price. 2015. "Regulation of Cerebral Cortical Neurogenesis by the Pax6 Transcription Factor." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9 (March). <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00070>.
- Martello, Graziano, and Austin Smith. 2014. "The Nature of Embryonic Stem Cells." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30 (1): 647–75. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013116>.
- Mcculloch, Ernest A, and James E Till. 2005. "C O M M E N T A R Y Perspectives on the Properties of Stem Cells" 11 (10): 1026–28.
- Moise, Alexander R., Vladimir Kuksa, Yoshikazu Imanishi, and Krzysztof Palczewski. 2004. "Identification of All- *Trans* -Retinol:All- *Trans* -13,14-Dihydroretinol Saturase." *Journal of Biological Chemistry* 279 (48): 50230–42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409130200>.
- Monderer-Rothkoff, Galya, Nitzan Tal, Marina Risman, Odem Shani, Malka Nissim-Rafinia, Laura Malki-Feldman, Vera Medvedeva, Matthias Groszer, Eran Meshorer, and Sagiv Shifman. 2021. "AUTS2 Isoforms Control Neuronal Differentiation." *Molecular Psychiatry* 26 (2): 666–81. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0409-1>.
- Morey, Lluís, Luigi Aloia, Luca Cozzuto, Salvador Aznar Benitah, and Luciano Di Croce. 2013. "RYBP and Cbx7 Define Specific Biological Functions of Polycomb Complexes in Mouse Embryonic Stem Cells." *Cell Reports* 3 (1): 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.11.026>.
- Morey, Lluís, Alexandra Santanach, Enrique Blanco, Luigi Aloia, Elphège P. Nora, Benoit G. Bruneau, and Luciano Di croce. 2015. "Polycomb Regulates Mesoderm Cell Fate-Specification in Embryonic Stem Cells through Activation and Repression Mechanisms." *Cell Stem Cell* 17 (3): 300–315. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.08.009>.
- Nagata, Shigekazu. 1997. "Apoptosis by Death Factor." *Cell*. Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81874-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81874-7).
- . 2005. "DNA Degradation in Development and Programmed Cell Death." *Annual Review of Immunology* 23: 853–75. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115811>.

- Nagy, Andras, Janet Rossant, Rika Nagy, Wanda Abramow-Newerly, and John C Roder. 1993. "Derivation of Completely Cell Culture-Derived Mice from Early-Passage Embryonic Stem Cells." *Developmental Biology* 90: 8424–28.
- Neira, José L., Mónica Román-Trufero, Lellys M. Contreras, Jesús Prieto, Gagandeep Singh, Francisco N. Barrera, M. Lourdes Renart, and Miguel Vidal. 2009. "The Transcriptional Repressor RYBP Is a Natively Unfolded Protein Which Folds upon Binding to DNA [†]." *Biochemistry* 48 (6): 1348–60. <https://doi.org/10.1021/bi801933c>.
- Novak, Bela, John J. Tyson, Bela Gyorffy, and Attila Csikasz-Nagy. 2007. "Irreversible Cell-Cycle Transitions Are Due to Systems-Level Feedback." *Nature Cell Biology* 9 (7): 724–28. <https://doi.org/10.1038/ncb0707-724>.
- Nunes, Manoel, Isabelle Blanc, Jerome Maes, Marc Fellous, Benoit Robert, and Ken McElreavey. 2001. "NSPc1, a Novel Mammalian Polycomb Gene, Is Expressed in Neural Crest-Derived Structures of the Peripheral Nervous System." *Mechanisms of Development* 102 (1–2): 219–22. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00288-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00288-X).
- Okada, Yohei, Takuya Shimazaki, Gen Sobue, and Hideyuki Okano. 2004. "Retinoic-Acid-Concentration-Dependent Acquisition of Neural Cell Identity during in Vitro Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells." *Developmental Biology* 275 (1): 124–42. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.07.038>.
- Oksenberg, Nir, and Nadav Ahituv. 2013. "The Role of AUTS2 in Neurodevelopment and Human Evolution." *Trends in Genetics*. Trends Genet. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.08.001>.
- Onodera, Atsushi, and Toshinori Nakayama. 2015. "Epigenetics of T Cells Regulated by Polycomb/Trithorax Molecules." *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.03.001>.
- Osumi, Noriko, Hiroshi Shinohara, Keiko Numayama-Tsuruta, and Motoko Maekawa. 2008. "Concise Review: Pax6 Transcription Factor Contributes to Both Embryonic and Adult Neurogenesis as a Multifunctional Regulator." *Stem Cells* 26 (7): 1663–72. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0884>.
- Parker, Ryan O., and Rosalie K. Crouch. 2010. "Retinol Dehydrogenases (RDHs) in the Visual Cycle." *Experimental Eye Research* 91 (6): 788–92. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2010.08.013>.
- Piedrafita, F. Javier, and M. Pfahl. 1999. "Nuclear Retinoid Receptors and Mechanisms of Action." In , 153–84. Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-58483-1_5.

- Pinson, Jeni, John O. Mason, T. Ian Simpson, and David J. Price. 2005. "Regulation of the Pax6: Pax6(5a) mRNA Ratio in the Developing Mammalian Brain." *BMC Developmental Biology* 5: 4–7. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-5-13>.
- Pirity, Melinda K, Joseph Locker, and Nicole Schreiber-Agus. 2005. "Rybp/DEDAF Is Required for Early Postimplantation and for Central Nervous System Development." *Molecular and Cellular Biology* 25 (16): 7193–7202. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.16.7193-7202.2005>.
- Pjaweletz, Cloud P., Lu Charboneau, Verena E. Bichsel, Nicole L. Simone, Tina Chen, John W. Gillespie, Michael R. Emmert-Buck, Mark J. Roth, Emanuel F. Petricoin, and Lance A. Liotta. 2001. "Reverse Phase Protein Microarrays Which Capture Disease Progression Show Activation of Pro-Survival Pathways at the Cancer Invasion Front." *Oncogene* 20 (16): 1981–89. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204265>.
- Pugh, Trevor J, Shyamal Dilhan Weeraratne, Tenley C Archer, Daniel A Pomeranz, Daniel Auclair, James Bochicchio, Mauricio O Carneiro, et al. 2013. "HHS Public Access" 488 (7409): 106–10. <https://doi.org/10.1038/nature11329>.MEDULLOBLASTOMA.
- Rhinn, Muriel, and Pascal Dollé. 2012. "Retinoic Acid Signalling during Development." *Development* 139 (5).
- Rohwedel, Jürgen, Kaomei Guan, and Anna M. Wobus. 1999. "Induction of Cellular Differentiation by Retinoic Acid in Vitro." *Cells Tissues Organs* 165 (3–4): 190–202. <https://doi.org/10.1159/000016699>.
- Sánchez, Carmen, Inés Sanches, Jeroen A.A. Demmers, Patrick Rodriguez, John Strouboulis, and Miguel Vidal. 2007. "Proteomics Analysis of Ring1B/Rnf2 Interactions Identifies a Novel Complex with the Fbxl10/JhdmlB Histone Demethylase and the Bcl6 Interacting Corepressor." *Molecular and Cellular Proteomics* 6 (5): 820–34. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600275-MCP200>.
- Sarkar, Suparna A., and Raghubir P. Sharma. 2002. "Modulation of C-Myc, Max, and Mad Gene Expression during Neural Differentiation of Embryonic Stem Cells by All-Trans-Retinoic Acid." *Gene Expression* 10 (3): 125–35. <https://doi.org/10.0000/096020197390130>.
- Scelfo, Andrea, Daniel Fernández-Pérez, Simone Tamburri, Marika Zanotti, Elisa Lavarone, Monica Soldi, Tiziana Bonaldi, Karin Johanna Ferrari, and Diego Pasini. 2019. "Functional Landscape of PCGF Proteins Reveals Both RING1A/B-Dependent-and RING1A/B-Independent-Specific Activities." *Molecular Cell* 74 (5): 1037-1052.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.04.002>.

- Schlisio, Susanne, Terri Halperin, Miguel Vidal, and Joseph R. Nevins. 2002. "Interaction of YY1 with E2Fs, Mediated by RYBP, Provides a Mechanism for Specificity of E2F Function." *EMBO Journal* 21 (21): 5775–86. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf577>.
- Schlisio, Susanne, Terri Halperin, Miguel Vidal, Joseph R. Nevins, T.W. Burke, J.G. Cook, M. Asano, et al. 2002. "Interaction of YY1 with E2Fs, Mediated by RYBP, Provides a Mechanism for Specificity of E2F Function." *The EMBO Journal* 21 (21): 5775–86. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf577>.
- Schorr, Kristel, Minglin Li, Stanislaw Krajewski, John C. Reed, and Priscilla A. Furth. 1999. "Bcl-2 Gene Family and Related Proteins in Mammary Gland Involution and Breast Cancer." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 4 (2): 153–64. <https://doi.org/10.1023/A:1018773123899>.
- Schwartz, Yuri B, and Vincenzo Pirrotta. 2013. "A New World of Polycombs: Unexpected Partnerships and Emerging Functions." *Nature Reviews. Genetics* 14 (12): 853–64. <https://doi.org/10.1038/nrg3603>.
- Shan, Bing, Heling Pan, Ayaz Najafov, and Junying Yuan. 2018. "Necroptosis in Development and Diseases." *Genes and Development* 32 (5–6): 327–40. <https://doi.org/10.1101/gad.312561.118>.
- Shen, Han Ming, and Patrice Codogno. 2012. "Autophagy Is a Survival Force via Suppression of Necrotic Cell Death." *Experimental Cell Research*. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.006>.
- Sherr, C. J., and J. M. Roberts. 1995. "Inhibitors of Mammalian G1 Cyclin-Dependent Kinases." *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/gad.9.10.1149>.
- Simoni, Daniele, and Manlio Tolomeo. 2001. "Retinoids , Apoptosis and Cancer," 1823–37.
- Soriano, Eduardo, and José Antonio Del Río. 2005. "The Cells of Cajal-Retzius: Still a Mystery One Century After." *Neuron*. Neuron. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.019>.
- Sultana, Razia, Chang En Yu, Jun Yu, Jeffery Munson, Donghui Chen, Wenhui Hua, Annette Estes, et al. 2002. "Identification of a Novel Gene on Chromosome 7q11.2 Interrupted by a Translocation Breakpoint in a Pair of Autistic Twins." *Genomics* 80 (2): 129–34. <https://doi.org/10.1006/geno.2002.6810>.
- Sun, Kun, Liang Zhou, Yu Zhao, Huating Wang, and Hao Sun. 2016. "Genome-Wide RNA-Seq and ChIP-Seq Reveal Linc-YY1 Function in Regulating YY1/PRC2 Activity during Skeletal Myogenesis." *Genomics Data* 7 (March): 247–49.

- <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.01.022>.
- Sutus, Enikő, Surya Henry, Lili Adorján, Gergő Kovács, and Melinda Katalin Purity. 2022. “RYBP Regulates Pax6 during in Vitro Neural Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells.” *Scientific Reports* 12 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06228-1>.
- Tait, Stephen W.G., and Douglas R. Green. 2010. “Mitochondria and Cell Death: Outer Membrane Permeabilization and Beyond.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (9): 621–32. <https://doi.org/10.1038/nrm2952>.
- Takahashi, Kazutoshi, and Shinya Yamanaka. 2006. “Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.” *Cell* 126 (4): 663–76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- Temming, Petra, Timothy W. Corson, and Dietmar R. Lohmann. 2012. “Retinoblastoma Tumorigenesis: Genetic and Epigenetic Changes Walk Hand in Hand.” *Future Oncology* 8 (5): 525–28. <https://doi.org/10.2217/fon.12.41>.
- Tiberi, Luca, Jelle Van Den Ameele, Jordane Dimidschstein, Julie Piccirilli, David Gall, Adèle Herpoel, Angéline Bilheu, et al. 2012. “BCL6 Controls Neurogenesis through Sirt1-Dependent Epigenetic Repression of Selective Notch Targets.” *Nature Neuroscience* 15 (12): 1627–35. <https://doi.org/10.1038/nn.3264>.
- Turner, Siobhán A, and Adrian P Bracken. 2013. “A “Complex” Issue: Deciphering the Role of Variant PRC1 in ESCs.” *Cell Stem Cell* 12 (2): 145–46. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.014>.
- Ujhelly, Olga, Viktoria Szabo, Gergo Kovacs, Flora Vajda, Sylvia Mallok, Janos Prorok, Karoly Acsai, et al. 2015. “Lack of Rybp in Mouse Embryonic Stem Cells Impairs Cardiac Differentiation.” *Stem Cells and Development* 24 (18): 2193–2205. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0569>.
- Vidal, Miguel. 2009. “Role of Polycomb Proteins Ring1A and Ring1B in the Epigenetic Regulation of Gene Expression.” *The International Journal of Developmental Biology* 53 (2–3): 355–70. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082690mv>.
- Walther, Claudia, Jean Louis Guenet, Dominique Simon, Urban Deutsch, Birgit Jostes, Martyn D. Goulding, Dimitrij Plachov, Rudi Balling, and Peter Gruss. 1991. “Pax: A Murine Multigene Family of Paired Box-Containing Genes.” *Genomics* 11 (2): 424–34. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90151-4](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90151-4).
- Wigler, M., R. Sweet, G. K. Sim, B. Wold, A. Pellicer, E. Lacy, T. Maniatis, S. Silverstein, and R. Axel. 1992. “Transformation of Mammalian Cells with Genes from Prokaryotes

- and Eukaryotes. 1979.” *Biotechnology (Reading, Mass.)* 24: 444–52.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1422052/>.
- Wu, Lili, and A. Catharine Ross. 2010. “Acidic Retinoids Synergize with Vitamin A to Enhance Retinol Uptake and STRA6, LRAT, and CYP26B1 Expression in Neonatal Lung.” *Journal of Lipid Research* 51 (2): 378–87. <https://doi.org/10.1194/jlr.M001222>.
- Yan, Yun, Wukui Zhao, Yikai Huang, Huan Tong, Yin Xia, Qing Jiang, and Jinzhong Qin. 2017. “Loss of Polycomb Group Protein Pcgfl Severely Compromises Proper Differentiation of Embryonic Stem Cells.” *Scientific Reports* 7 (December 2016): 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep46276>.
- Zencak, Dusan, Merel Lingbeek, Corinne Kostic, Meriem Tekaya, Ellen Tanger, Dana Hornfeld, Muriel Jaquet, et al. 2005. “Bmi1 Loss Produces an Increase in Astroglial Cells and a Decrease in Neural Stem Cell Population and Proliferation.” *Journal of Neuroscience* 25 (24): 5774–83. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3452-04.2005>.
- Zhao, Jicheng, Min Wang, Luyuan Chang, Juan Yu, Aoqun Song, Cuifang Liu, Wenjun Huang, et al. 2020. “RYBP/YAF2-PRC1 Complexes and Histone H1-Dependent Chromatin Compaction Mediate Propagation of H2AK119ub1 during Cell Division.” *Nature Cell Biology* 22 (4): 439–52. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0484-1>.
- Zheng, Lixin, Olaf Schickling, Marcus E. Peter, and Michael J. Lenardo. 2001. “The Death Effector Domain-Associated Factor Plays Distinct Regulatory Roles in the Nucleus and Cytoplasm.” *Journal of Biological Chemistry* 276 (34): 31945–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102799200>.

9. Eredmények összefoglalása

A Ring1 és Yy1 kötő fehérje, RYBP a polikomb represszor fehérjék (PRC) családjába tartozik. A polikomb fehérjék a sejtidentitás epigenetikai szabályozói, melyek kulcsfontosságúak az embrionális őssejtek pluripotenciájának fenntartásában és a differenciáció elindításában. Az RYBP ezen belül a nem kanonikus polikomb represszor komplexek (ncPRC1) központi molekulája. Csoportunk korábban kimutatta, hogy az RYBP kifejeződése esszenciális az egér embriogenezisben, mivel az *Rybp null* mutáns embriók beágyazódás előtt elpusztulnak. Az *Rybp* heterozigóta egerekben pedig a fehérje csökkent szintje a központi idegrendszer fejlődési zavarait okozta: ilyen volt az előagy túlzott növekedése, a kisagy hiánya, a rendellenes velőcső záródás, valamint az agykéreg megfelelő rétegződésének zavara. Az RYBP neurális fejlődésben betöltött szerepét tovább hangsúlyozza az a korábbi megállapításunk, miszerint az *Rybp null* mutáns egér őssejtek *in vitro* neurális differenciációja zavart szenved, mivel több progenitor és kevesebb terminálisan differenciálódott idegsejt típust képeznek. Ezen kívül a vad típusú sejtekhez képest, az *Rybp null* mutáns sejt kultúrákban megemelkedett a *Pax6* neurális progenitor marker gén szintje, mely kapcsolódhat a megnövekedett progenitor képződéshez.

A *Pax6* egy fontos korai neurális marker gén és kulcsfontosságú transzkripció faktor, mely a neurális differenciáció során a neurális őssejtek képződését indukálja. Magas szintje képes gátolni a neurális fejlődés terminális szakaszát azáltal, hogy a sejteket neurális progenitor állapotban tartja. A *Pax6* kifejeződése a retinsav jelátviteli útvonal szabályozása alatt is áll, a sejtekbe bejutó retinsav aktiválja az expresszióját.

A kis lipofil molekulák csoportjába tartozó retinsav egy A-vitamin származék, melyről már régóta köztudott, hogy nélkülözhetetlen a látás folyamatában. Ezen kívül egyik legjelentősebb szerepe az embriogenezis folyamatában van. A retinsav jelátviteli útvonal központi szabályozó szerepét a velőcsőben zajló korai neurális differenciációs folyamatokban is leírták.

Ezen információk alapján PhD munkám során azt vizsgáltam, hogy az RYBP hiánya hogyan befolyásolja a retinsav jelátviteli útvonalat, valamint ez hogyan járulhat hozzá az *Rybp null* mutáns sejtek *in vitro* neurális differenciációja során megfigyelt fenotípus kialakulásához.

Mivel a *Pax6* a RA jelátviteli útvonal szabályozása alatt is áll, megvizsgáltam annak a lehetőségét, hogy az *Rybp* hiánya az *in vitro* neurális differenciáció során képes-e befolyásolni a RA jelátviteli útvonalat, különös tekintettel a *Pax6*-re. A laboratóriumunk által korábban

publikált transzkriptom adatok újraelemzése során kapott eredmények alapján elmondható, hogy *Rybp* hiányában már összejt állapot megváltozik a retinsav jelátviteli útvonal tagok génexpressziója a vad típushoz képest. A jelátviteli útvonal tagok génexpresszióját qRT-PCR segítségével tovább vizsgálva arra az eredményre jutottunk, hogy az összes általunk vizsgált RA jelátviteli útvonal tag génexpressziója megemelkedett *Rybp* hiányában. Ezek alapján feltételezhető, hogy a *Rybp*^{-/-} sejtekbe vagy több retinsav jut be, vagy érzékenyebben reagálnak a retinsavra, ezáltal a retinsav anyagcsere megváltozik ezekben a sejtekben. Továbbá, RA indukciót követően a PAX6 pozitív neurális progenitor sejtek aránya megemelkedett az *Rybp null* mutáns neurális kultúrákban. Az RYBP és PAX6 fehérjék sejten belüli lokalizációját vizsgálva megállapítottuk, hogy a két fehérje kifejeződése dinamikusan változik az *in vitro* neurális differenciáció során. Ez arra utal, hogy az RYBP közvetlenül befolyásolhatja a Pax6 expresszióját. Luciferáz riporter próba segítségével bizonyítottuk, hogy az RYBP represszálja a *Pax6* gén kifejeződését a *P1* promóterén keresztül. Továbbá megfigyeltük, hogy egy másik ncPRC1 tag, a RING1 jelenléte az RYBP mellett erősebb represszióhoz vezetett. Ennek alapján arra következtethetünk, hogy az RYBP polikomb függő módon represszálja a *Pax6* génkifejeződését az ncPRC1-en keresztül.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy az *Rybp* ektópikus expressziója képes-e menekíteni a mutáns fenotípust, melyhez a laboratóriumunkban korábban lentivirális módszerrel létrehozott sejtvonalatokat alkalmaztunk. A retinsav jelátviteli útvonal relatív génexpressziós változásait vizsgálva megfigyeltük, hogy az ektópikus *Rybp* menekíti a retinol metabolizmusában szerepet játszó enzimek génexpresszióját. A *Pax6* kifejeződését az ektópikus *Rybp* részben képes menekíteni, ezzel szemben a fehérje mennyisége magasabb marad ezekben a mintákban az *in vitro* neurális differenciáció során. A kapott eredmények magyarázzák az *Rybp* hiányában megfigyelt progenitor sejt feldúsulást, azonban a kevesebb terminálisan differenciálódott sejtípust nem.

Mivel az RYBP pro- és anti-apoptotikus szerepet is betölthet sejtípustól és fejlődési stádiumtól függően. Ezért megvizsgáltuk az apoptózis mértékét. Kaszpáz 3 immunfetés és Annexin V jelölés segítségével kimutattuk, hogy *Rybp* hiányában megnőtt az apoptózis mértéke az *in vitro* neurális differenciáció során. Továbbá, azt is megállapítottuk, hogy a PAX6 magas szintje apoptózist eredményez a neurális differenciáció során, valamint a retinsav kezelés befolyásolja az apoptózis mértékét. *Rybp null* mutáns sejtekben megemelkedett az apoptózis mértéke a neurális differenciáció késői szakaszában retinsav kezelést követően. Megvizsgálva a belső és külső apoptózis jelátviteli útvonal tagok génexpresszióját, azt az eredményt kaptuk, hogy mindkét apoptózis jelátviteli útvonal tagjainak génexpressziója megemelkedik az *Rybp null*

mutáns mintákban a vad típushoz képest. A kapott eredmények arra utalnak, hogy az RYBP-nek anti-apoptotikus szerepe van a neurális differenciáció során, melynek hiánya és a retinsav, valamint a PAX6 megemelkedett szintje együttesen járul hozzá az *Rybp null* mutáns sejt kultúrákban megfigyelt magas neurális progenitor pusztuláshoz, ami feltehetően hozzájárul a terminális differenciáció deficienciájához.

Az apoptózis külső jelátviteli útvonalát kiváltó receptor (TNFR1) aktivációja megegyezik a nekroptózis jelátviteli útval. Ezért EthD III jelölés segítségével, amely a nekrotizáló sejteket jelöli, kimutattam, hogy *Rybp* hiányában magasabb a nekrozis mértéke az *in vitro* neurális differenciáció során, különösen a terminális differenciáció kezdeti szakaszában. A nekroptózis jelátviteli útvonal kulcsfontosságú tagjának, a RIP1-nek a génexpressziós változását vizsgálva kimutattuk, hogy szintje megemelkedik a differenciáció végén az *Rybp null* mutáns kultúrákban. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy *Rybp* hiányában nem csak az apoptózis, de a nekrozis is megemelkedik, melyek együttesen járulnak hozzá a kevesebb terminálisan differenciálódott sejt típus kialakulásához.

Mivel az RYBP hatással van mind az apoptózis mind a nekroptózis folyamatára, összegekből származó ChIP-seq adatok segítségével vizsgáltuk, hogy mely komplexeken keresztül fejtheti ki hatását. Megállapítottuk, hogy mind az apoptózis, mind a nekrozis jelátviteli útvonalak tagjai PRC komplexekbe tartozó fehérjék target génje, így elképzelhető, hogy az RYBP polikomb függő módon szabályozhatja ezen folyamatokat.

Irodalmi adatokból tudjuk, hogy az RYBP, a PAX6 és a retinsav is hatással vannak a proliferáció és a sejtciklus folyamatára. FACS analízis segítségével kimutattuk, hogy retinsav kezelés hatására megváltozik a sejtciklus fázisok eloszlása az *in vitro* neurális differenciáció során, mely ugyancsak hozzájárulhat a progenitor sejtek felszaporodásához.

Összeségében elmondható, hogy PhD munkám során kimutattam, hogy az *Rybp* szabályozza a RA jelátviteli útvonalat. Valamint represszálja annak target génjének, a *Pax6*-nek a kifejeződését polikomb függő módon az ncPRC1 komplexeken keresztül. Továbbá azt is kimutattam, hogy *Rybp* hiányában a neurális kultúrákban nagy mértékű apoptózis és nekrozis figyelhető meg, amely az egyik magyarázata lehet az *Rybp null* mutáns sejtek esetében megfigyelt sérült terminális differenciációnak. Ezen eredmények ugyancsak rávilágítanak az *Rybp* esszenciális szerepére a központi idegrendszer fejlődésében normál, valamint patológias körülmények között, mint például a velőcső záródási rendellenességek vagy a neurodegeneratív betegségek.

10. Summary

The Ring1 and YY1 binding protein, called RYBP is a member of the Polycomb Repressive Complexes (PRC). The Polycomb proteins are evolutionary conserved epigenetic regulators, which have an important role in the maintenance of pluripotency and starting differentiation. The Rybp is a core member of the non-canonical PRC1 complexes. We have previously reported that RYBP is important for embryogenesis, since Rybp null mutant embryos died before implantation and in the case of the heterozygous littermate alterations in RYBP dosage resulted a defect of the central nervous system development: like neural tube defects, exencephaly and disorganized cortex. Moreover, *Rybp null* mutant mouse embryonic stem cells have compromised differentiation ability due to accelerated neural progenitor formation which fail to generate terminally differentiated neural cells. However, alterations in the gene expression level of the *Pax6* gene was also observed.

Pax6 is an essential neural transcription factor, it has an important role in the neural stem cell formation and eye development. Furthermore, its high level prevents the terminal differentiation of neural lineages. The expression *Pax6* is under the control of the retinoic acid signaling pathway.

The active metabolite of Vitamin-A, retinoic acid is a small lipophile molecule, which is essential to the neural development *in vitro* and *in vivo* as well. It has an important role during embryogenesis, and it is essential during the early neural differentiation processes.

During my PhD work, I investigated the relationship between RYBP, *Pax6* and the retinoic acid RA signaling pathway during *in vitro* neural differentiation of mouse embryonic stem cells ES. The starting point of my research was our previous finding that in the absence of *Rybp*, the level of the early neural marker PAX6, which is regulated by the RA signaling pathway, remains high even at the end of differentiation. High levels of PAX6 inhibit terminal differentiation of neural stem cells, which may contribute to the neural phenotype observed in the absence of *Rybp*; the cells form a less complex neural network.

In the absence of *Rybp*, the mRNA levels of RA signaling pathway members are elevated compared to the wild type. Based on these, it can be assumed that either more retinoic acid enters *Rybp null* mutant cells, or they are more sensitive to retinoic acid treatment, thus altering the metabolism of retinoic acid in these cells. Based on these results, it can be concluded that in the absence of *Rybp* the retinoic acid signaling pathway is modified, which affects the expression of genes under retinoic acid regulation, and thus the process of

differentiation. Furthermore, by PAX6 immunostaining of RA treated and untreated embryonic bodies, we showed that the amount of PAX6 was higher in *Rybp null* mutant cells even without RA treatment. This suggests that RYBP may directly regulate *Pax6* expression. Therefore, we investigated whether *Pax6* is directly regulated by RYBP or indirectly through the retinoic acid signaling pathway using a luciferase reporter assay. We have shown that RYBP is able to repress *Pax6* expression in a dose-dependent manner. To examine whether repression is Polycomb dependent or not, the *Rybp* cDNA containing vector and the *Ring1* cDNA, which is a core member of the Polycomb Repressor Complex, containing vector were co-transfected with the luciferase reporter vector containing the *Pax6 P1* promoter. Based on our results, it can be concluded that *Ring1* also modulates repression in a dose-dependent manner, as the repression was stronger in cases where *Rybp* and *Ring1* were used together compared to samples transfected with *Rybp* alone. Based on these results, we can conclude that this repressor function is performed by RYBP at least in part in a Polycomb-dependent manner.

We want to test whether the re-introduction of *Rybp* with a lentiviral expression system to the *Rybp null* mutant cells can restore the wild type mRNA levels of the RA pathway members. We observed that only partial rescue was observed in most retinoic acid signaling pathway members and in the case of *Pax6*. The ectopic *Rybp* was able to rescue the expression of genes involved in retinol and retinal transformation. Based on these results, we can conclude that RYBP may play a more direct regulatory role in the regulation of the retinoic signaling pathway. The results explain the progenitor cell enrichment observed in the absence of *Rybp*, but not the less terminally differentiated cell types.

To further investigate the extent of apoptosis during *in vitro* neural differentiation, we performed FITC conjugated Annexin V labeling and Caspase 3 immunostaining and FACS analysis. My results showed that in the absence of *Rybp*, the rate of apoptosis increases, which was even more pronounced with RA treatment. In order to determine on which apoptotic signaling pathway *Rybp* acts, we examined the gene expression of the intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. Expression of both extrinsic and intrinsic signaling pathway members was elevated in the absence of *Rybp* during *in vitro* neural differentiation. Based on these results, we can conclude that both *Rybp* deficiency and elevated retinoic acid levels contribute to the high neural progenitor death observed in *Rybp null* mutant cell cultures, which is presumably contributing to terminal differentiation deficiency.

Since the trigger signal of the extrinsic signaling pathway of apoptosis is the same as the signaling pathway of necroptosis, we also examined the extent of necrosis in wild type and *Rybp null* mutant cells. We used EthD III labeling to visualize the necrotic cells during the in

vitro neural differentiation, and we found that, the rate of necrosis is higher in the absence of *Rybp* especially in the beginning of the terminal differentiation. The relative gene expression analysis revealed that, the key signaling molecule of the necroptosis pathway, *Rip1* shows a higher gene expression in the *Rybp null* mutant cultures at the end of the neural differentiation. Based on these results, it can be concluded that in the absence of *Rybp* not only the rate of apoptosis but also the necrosis was increased, which together contribute to the less terminally differentiated cell types.

It is known from the literature that retinoid derivatives, especially retinoic acid, influence the exit from the cell cycle and the process of differentiation. However, the mechanism itself has not been described yet. Thus, we examined the distribution of cells in different cell cycle phases in RA treated and untreated EBs using FACS analysis. The results suggest that the absence of *Rybp* does not cause significant differences in the displacement of the cell cycle phases but, as a result of retinoic acid treatment, the cells exit the S phase and enter the G1 phase.

Overall, during my PhD work I show that, *Rybp* regulates the retinoic signaling pathway. Moreover, RYBP repress the retinoic acid pathway target gene, *Pax6* in a polycomb dependent way. Furthermore, I show that, the rate of apoptosis and necrosis is higher in the absence of *Rybp*, which can be one of the causatives of the impaired terminal differentiation towards neuronal lineages from progenitors. Our results may contribute to a more detailed understanding of the developmental abnormalities of the central nervous system in the future.

11. Publikációk listája

MTMT azonosító: 10071413

Összesített impact factor: 11,379

A fokozatszerzési eljárás alapját képező közlemény:

Sutus, E., Henry, S., Adorján, L., Kovács, G., Pirity, M.K. (2022). RYBP regulates Pax6 during in vitro neural differentiation of mousenembryonic stem cells. *Scientific Reports* 12:1 Paper: 2364. doi: 10.1038/s41598-022-06228-1

IF: 4,38

További közlemények:

Henry, S., Szabó, V., **Sutus, E.**, Pirity, M.K. (2020). RYBP is important for cardiac progenitor cell development and sarcomere formation. *Plos One* 15:7 p. e0235922. doi: 10.1371/journal.pone.0235922

IF: 3,24

Bajusz, I., Henry, S., **Sutus, E.**, Kovács, G., Pirity, M.K. (2019). Evolving role of RING1 and YY1 binding protein in the regulation of germ-cell-specific transcription. *Genes* 10:11 Paper: 941,33 p. doi: 10.3390/genes10110941

IF: 3,759