

Az RYBP szerepének vizsgálata a mezoderma kialakításában és axiális megnyúlásában

doktori értekezés tézisei

Kókity Lilla

témavezető: Dr. Purity Melinda
tudományos főmunkatás

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont,
Genetikai Intézet



Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és
Informatikai Kar, Biológia Doktori Iskola



Szeged,

2025

Bevezetés

A korai embrionális fejlődés egyik legfontosabb eseménye a gasztruláció, mely során az őssejtek kilépnek a pluripotens állapotból, hogy létrehozzák a három fő csíralemezt az ekto-, endo- és a mezodermát. A gasztruláció során bármilyen hiba nagymértékben kihat az embrió későbbi fejlődésére, a leendő szervek és testtájak megfelelő kialakítására. A gasztrulációs folyamat ezért szigorú transzkripciós és epigenetikai szabályozás alatt áll. A folyamat egy fontos szabályozó fehérjéje az RYBP (RING1 and YY1 Binding Protein), ami a nem-kanonikus Polikomb Represszív Komplex 1-ek (ncPRC1) központi tagjaként ismert. Csoportunk korábban kimutatta, hogy az *Rybp* kifejeződése esszenciális az egér embriogenezisben, az *Rybp* null mutáns embriók beágyazódás előtt elpusztultak, ami megnehezíti az *in vivo* vizsgálatokat. Ezenfelül az RYBP fontos a szívizomsejtek normál fejlődéséhez is. Az *Rybp*^{-/-} őssejtek *in vitro* szív irányú differenciációja során nem alakulnak ki dobogó szívizom telepek, és a szarkomer fehérjék termelődése is zavart

szenved. Kimutattuk, hogy a *Rybp* hiányában a PLAGL1 kardiális transzkripció faktor elvesztése legalább részben hozzájárulhat a megfigyelt fenotípushoz. A PLAGL1-ről ismert, hogy fontos szerepet tölt be a szarkomer fehérjék pl. *Tnnt2* génexpressziójának szabályozásában. Kimutattuk továbbá, hogy vad típusú sejtekben az RYBP az NKX2-5 kardiális progenitorral együtt képes aktiválni a *Plagl1* promóterét, ami az RYBP egy ncPRC1 független mechanizmusán keresztül valósul meg. Az RYBP *Plagl1*-en keresztüli szabályozása azonban nem adott magyarázatot a mutánsok teljes fenotípusára és a korai progenitor és gasztrulációs szakaszban megfigyelt génexpressziós változásra. Ezért PhD munkám során ezen korai stádium részletes vizsgálatát végeztem.

Célkitűzések

A PhD dolgozatomban az RYBP mezoderma kialakulásában és axiális megnyúlásban betöltött szerepét vizsgáltam egér embrionális összejt alapú 2D-s és 3D-s modell rendszerek segítségével.

Munkám során az alábbi célokat tűztük ki:

1. Megvizsgálni, hogy a szívizomsejteken kívül van-e más kardiális sejttípus is, melynek kialakulását az RYBP a PLAGL1-on keresztül szabályozhatja.
2. Összehasonlítani a kardiális progenitor és szív endotél marker gének mRNS és fehérje termelődését a vad típusú és az *Rybp*^{-/-} szívizom tenyészetekben.
3. Megvizsgálni, hogy RYBP hiányában károsodik-e a fő csíralemezek, az ekto-, endo- és mezoderma kialakulása.
4. Megvizsgálni, hogy az RYBP-nek a BRACHYURY-hoz hasonlóan lehet-e szerepe az axiális megnyúlásban.
5. Meghatározni az RYBP képes-e fizikai kölcsönhatásra a BRACHYURY korai mezodermális fehérjével.

Módszerek

1. Egér embrionális őssejt alapú *in vitro* szív irányú differenciáció, *in vitro* embrionális testek és *in vitro* gasztuloidok képzése.
2. A vad típusú és *Rybp*^{-/-} sejtvonalak közötti génexpressziós eltérések vizsgálata valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (qRT-PCR) segítségével.
3. A marker fehérjék RYBP-vel való kolokalizációjának és kifejeződési mintázatának immunocitokémia (ICC) analízise és a minták konfokális fluoreszcens mikroszkópiai vizsgálata.
4. Az RYBP⁺/BRACHYURY⁺ és az RYBP⁺/GATA4⁺ sejtek arányának kvantifikálása áramlási citometria (FC) segítségével.
5. A MESP1, ISL-1 és BRACHYURY fehérjék szintjének meghatározása western blot segítségével.
6. A *Brachyury* cDNS prk7 túltermeltető vektorba való klónozása restriktációs enzimekkel.
7. Az RYBP és a BRACHYURY fehérjék közötti fizikai interakció ellenőrzése Ko-immunprecipitáció (CoIP) segítségével.

Eredmények

1. Immuncitokémiai analízis segítségével kimutattuk, hogy PLAGL1 fehérje jelen van a simaizom, mezenchimális és neurális sejtekben, de jelenléte nem volt kimutatható az endotéliális sejtekben.
2. Immuncitokémiai analízis segítségével kimutattuk, hogy az RYBP szükséges a megfelelő endotéliális elköteleződéshez, hiányában a kardiális telepekben alacsony GATA4 korai és PECAM1 késői endotéliális marker szint figyelhető meg.
3. A vad típusú és az *Rybp*^{-/-} kardiális telepek génexpressziójának összehasonlításával megállapítottuk, hogy *Rybp* hiányában a kardiális progenitor és endotéliális marker gének expressziója szignifikánsan lecsökkent.
4. Kimutattuk, hogy *Rybp* hiányában a fő csíralemezek kialakulása zavart szenved, a mezodermális és az endodermális rétegek alulreprezentáltak, míg az ektodermális réteg többlete figyelhető meg.
5. Áramlási citometria segítségével megállapítottuk, hogy a vad típusú 4 napos kardiális progenitor sejtek 74,27%-a RYBP és BRACHYURY kettős pozitív.

6. A vad típusú és az *Rybp*^{-/-} embrionális testek immuncitokémiai analízisével kimutattuk, hogy az RYBP fehérje kolokalizációt mutat a BRACHYURY mezodermális és GATA4 endodermális marker fehérjékkel.
7. Áramlási citometriával kimutattuk, hogy RYBP+/GATA4+ sejtek száma az embrionális testek differenciációja során fokozatosan növekedést mutat, és 14. napra a kettős pozitív sejtek száma eléri 63,23%-ot.
8. *In vitro* gasztruloid modell segítségével bizonyítottuk, hogy az *Rybp*^{-/-} gasztruloidok axiális irányú megnyúlása is zavart szenved, ami a mutánsokban megrövidült törzsi és farki fenotípust eredményez.
9. Immuncitokémiai analízis segítségével kimutattuk, hogy *Rybp* hiányában a vad típushoz képest gasztruloidokban kevesebb BRACHYURY+ sejt detektálható, továbbá a vad típusú gasztruloidok kaudális régiójában az RYBP és a BRACHYURY kolokalizáció figyelhető meg.
10. Ko-immunprecipitáció segítségével igazoltuk, hogy a RYBP képes fizikai interakcióba lépni a BRACHYURY fehérjével, ami arra utal, hogy a két fehérje képes lehet komplexet alkotni és a fejköcsés során együttes génszabályozó funkciókat ellátni.

Summary

Early embryonic gastrulation is a complex process where undifferentiated cells lose their pluripotency and start to form the three germ layers. This process is regulated by transcription factors and epigenetic regulators, including non-canonical polycomb repressive complex 1s (ncPRC1s). Previously, we reported that ncPRC1-member RYBP (RING1 and YY1 binding protein) is crucial for embryonic implantation and cardiac lineage commitment in mice. However, the role of RYBP in gastrulation and mesoderm formation has not yet been defined. In this study, we used 2D and 3D *in vitro* model systems, to analyze the role of RYBP in mesoderm formation. First, we showed that the presence of RYBP is required for two mesoderm derived for cardiac and for endothelial progenitor populations. In the absence of RYBP, the formation of major germ layers was disrupted, and the expression of mesoderm (*Brachyury*, *Eomes*, and *Gsc*) and endoderm (*Sox17*, *Gata4*) genes was significantly downregulated, while the ectoderm (*Map2*,

Fgf5) genes were increased. We showed that RYBP can co-localize with mesoderm marker BRACHYURY and endoderm marker GATA4 in *wt* embryonic bodies (EBs). In the same system *Rybp*^{-/-} EBs exhibit low BRACHYURY and GATA4 levels and showed altered distribution. By analysing *wt* and *Rybp*^{-/-} gastruloids we demonstrated that RYBP is also important for axial elongation. In the absence of RYBP, gastruloids exhibited shortened tails and low BRACHYURY levels in the tailbud. Finally, we identified BRACHYURY as a novel binding partner of RYBP which suggests cooperative function of the two proteins. Together, our results demonstrate the previously unknown role of RYBP in mesoderm formation and axial elongation. We believe our findings will contribute to better understanding of the highly conserved process of gastrulation.

Publikációk listája

MTMT azonosító: 10087158

Összesített impakt faktor: 9,1

A fokozatszerzési eljárás alapját képező

közlemények:

Lilla Kokity, Zsolt Czimmerer, Bernadett Benyhe-Kis, Anna Poscher, Emese Belai, Gabor Steinbach, Zoltan Lipinszki, Melinda K. Pirity. BRACHYURY co-operates with polycomb protein RYBP to regulate gastrulation and axial elongation *in vitro*. Front. Cell Dev. Biol. 12:1498346. (2024). doi: 10.3389/fcell.2024.1498346

(Q1, IF: 4,6)

Surya Henry, **Lilla Kokity**, Melinda K. Pirity. Polycomb protein RYBP activates transcription factor *Plagl1* during *in vitro* cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells. Open Biol. Feb 8;13(2):220305. (2023) doi: 10.1098/rsob.220305

(Q1, IF: 4,5)

Konferenciákon való részvétel:

- Külföldi tudományos előadás:

Role of the epigenetic regulator RYBP in mammalian cardiac lineage commitment, 3rd Meeting of Visegrád Group Society for Developmental Biology, Faculty of Biology of Warsaw, Miecznikowa 1, 02-096 Warsaw 2023.09.8-10

- Hazai tudományos előadások:

Egy Polikomb fehérje (RYBP) szerepe a szív-irányú differenciációba, V. Sejt-, Fejlődés- és Össejtbiológiai (SFB) Konferencia, Budapest, 2023.10.27

Investigating the role of RYBP in mesoderm formation and axial elongation of gastruloids in vitro, VI. Sejt-, Fejlődés- és Össejtbiológiai (SFB) Konferencia, Budapest, 2024.11.08 (flash talk)

In the lack of polycomb protein RYBP mouse gastruloids fail to elongate axially, V4SDB Student Winter School, Budapest, 2025.01.28. (flash talk)

- Díjak:

Poszter szekció díjazott, VI. Sejt-, Fejlődés- és Össejtbiológiai (SFB) Konferencia, Budapest, 2024.11.08

- Poszterek:

Lilla Kókity, Surya Henry, Melinda Katalin Pirity, Lack of RYBP disrupts mesoderm and cardiac progenitor cell formation, 2nd V4SDB Meeting, 2021 (szeptember 24), Szeged

Lilla Kókity, Surya Henry, Melinda Katalin Pirity, Lack of RYBP disrupts mesoderm and cardiac progenitor cell formation, XX. Genetikai Műhelyek Magyarországon, 2021, Szeged

Lilla Kókity, Surya Henry, Melinda Katalin Pirity, Mouse RYBP is important for cardiac mesoderm and progenitor formation in vitro, Hungarian Molecular Life Science Conference, 2021.11.05., Eger

Lilla Kókity, Melinda Katalin Pirity, Cell fate defining role of RYBP in early stage of cardiac differentiation, Straub Napok 2022.05.25, Szeged

Lilla Kókity, Melinda Katalin Pirity, Cell fate defining role of RYBP in early stage of cardiac differentiation, XXI. Genetikai Műhelyek Magyarországon, 2022, Szeged

Lilla Kókity, Surya Henry, Melinda Katalin Pirity, Role of epigenetic regulator RYBP in cardiac lineage commitment, 4th Danube Conference on Epigenetics, 2022.10.18., Budapest

Lilla Kókity, Melinda Katalin Pirity, Lack of RYBP impairs cardiac endothelial lineage commitment , XXII. Genetikai Műhelyek Magyarországon, 2023.09.15, Szeged

Lilla Kókity, Melinda Katalin Pirity, RYBP determines cardiac cell fates by regulating mesoderm formation, Straub napok, 2023.05.25, Szeged

Lilla Kókity, Melinda Katalin Pirity, Investigating mesoderm and endoderm formation in vitro, Straub napok, 2024.05.30-31, Szeged

Lilla Kókity, Zoltán Lipinszki, Gábor Steinbach, Melinda Katalin Pirity, BRACHYURY co-operates with Polycomb protein RYBP to regulate gastrulation and axial elongation in vitro, XXIII. Genetikai Műhelyek Magyarországon, 2024.09.6, Szeged

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott Dr. Purity Melinda, mint a közlemények felelős szerzője igazolom, hogy Kókity Lilla PhD jelölt jelentős mértékben hozzájárult a dolgozat alapjául szolgáló tudományos publikációk létrehozásához. Az értekezésben bemutatott eredményeket más PhD értekezésben nem használjuk fel. Kijelentem, hogy a jelölt által végzett kísérletek eredményét a további társszerzők a tudományos fokozat megszerzéséhez nem használták fel, és ezt a jövőben sem fogják megtenni.

1. **Lilla Kókity**, Zsolt Czimmerer, Bernadett Benyhe-Kis, Anna Poscher, Emese Belai, Gabor Steinbach, Zoltan Lipinski, Melinda K. Purity. BRACHYURY co-operates with polycomb protein RYBP to regulate gastrulation and axial elongation *in vitro*. Front. Cell Dev. Biol. 12:1498346. (2024). doi: 10.3389/fcell.2024.1498346
2. Surya Henry, **Lilla Kókity**, Melinda K. Purity. Polycomb protein RYBP activates transcription factor *Plagl1* during *in vitro* cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells. Open Biol. Feb 8;13(2):220305. (2023) doi: 10.1098/rsob.220305

Szeged, 2025.02.27.



Dr. Purity Melinda