

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

című doktori értekezés tézisei

készítette: Sutus Enikő

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és
Informatikai Kar, Biológia Doktori Iskola

Témavezetők: Dr. Pirty Melinda, tudományos főmunkatárs

ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet



Szeged, 2022

Bevezetés

Az Rybp (Ring1 and Yy1 Binding Protein) a polikomb represszor fehérjék családjába tartozik, ezek a fehérjék fontos szerepet játszanak az embrionális őssejtek pluripotenciájának fenntartásában, valamint a sejtek differenciációjában is. Korábban leírtuk, hogy az *Rybp null* mutáns egerek beágyazódás kori letális fenotípust mutatnak, ugyanakkor az *Rybp* heterozigóta egereknél központi idegrendszeri fejlődési rendellenességek figyelhetők meg, ilyen a kisagy hiánya, az előagy túlzott növekedése, a velőcső záródásának elmaradása, valamint az agykéreg megfelelő rétegződésének zavara. További *in vitro* vizsgálatok során fény derült arra is, hogy az *Rybp null* mutáns őssejtek bár képesek voltak neurális őssejteket és progenitorokat létrehozni, azok nem voltak képesek érett neurális sejteket képezni a differenciáció későbbi szakaszában. Ezek alapján elmondható, hogy az RYBP fehérje esszenciális szerepet játszik mind az embriogenezis, mind a neurális fejlődés során.

Az *in vitro* vizsgálatok során megfigyeltük még a korai neurális markerek emelkedett expresszióját az *Rybp null* mutáns neurális kultúrákban a vad típushoz viszonyítva. Az egyik ilyen korai neurális marker, ugyanakkor fontos transzkripciósfaktor a PAX6,

melynek kifejeződését a retinsav (RA) jelátviteli útvonal szabályozza. A kísérletek során az őssejtek neurális indukciója retinsav kezelés segítségével történt. Az embrionális fejlődés során a retinsav morfogénként viselkedik és fontos szerepet játszik az idegrendszer fejlődésében. Felmerül a kérdés, hogy az *in vitro* körülmények között megfigyelt jelenség, miszerint az Rybp hiányában a korai neurális folyamatok túlzott mértékben játszódnak le, köthető-e a retinsav jelátviteli útvonal megváltozásához vagy attól független folyamatról van szó. A továbbiakban tehát ennek vizsgálatát végeztem el.

Célkitűzések

PhD dolgozatomban a RYBP és a retinsav jelátviteli útvonal kapcsolatát vizsgáltam egér embrionális őssejtek *in vitro* neurális differenciációja során.

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.

Alkalmazott módszerek

1. Egér eredetű embrionális őssejtek tenyésztése, embrionális test képzés retinsav jelenlétében és hiányában és *in vitro* neurális differenciáció.
2. A retinsav, valamint az apoptózis és nekrosis jelátviteli útvonalak tagjainak génexpressziós vizsgálata valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakcióval.
3. Az RYBP, PAX6 és Kaszpáz 3 fehérjék lokalizációjának vizsgálata immuncitokémia segítségével.
4. Apoptózis és nekrosis kimutatása apoptózis/nekrosis jelölő kit segítségével.
5. Apoptózis és sejtciklus vizsgálata áramlási citometriával
6. A Pax6 gén P1 promóterének molekuláris klónozása pGL4.20 vektorba.
7. Az RYBP szerepének vizsgálata a *Pax6* gén kifejeződésének szabályozásában luciferáz riporter próba segítségével.
8. Konfokális fluoreszcens mikroszkópia.

Eredmények

1. A retinsav jelátviteli útvonal tagok génexpressziójának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a retinol és retinsav kötő, valamint metabolizáló enzimek génexpressziója megemelkedik, míg a lebontásban szerepet játszó gének szintje lecsökken az *in vitro* neurális differenciáció során *Rybp* hiányában a vad típushoz képest.
2. Immuncitokémia segítségével kimutattuk, hogy a retinsav jelátviteli útvonal szabályozása alatt is álló PAX6 mennyisége retinsav kezelés hiányában is megemelkedik az *Rybp null* mutáns sejtekből képzett embrionális testekben.
3. Az RYBP és PAX6 fehérjék kifejeződése dinamikusan változik az *in vitro* neurális differenciáció során, mivel 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.
4. Az RYBP *Pax6* gén szabályozásában betöltött szerepét luciferáz riporter próbával vizsgálva kimutattuk, hogy az

RYBP polikomb függő módon represszálja a *Pax6* kifejeződését a *PI*-es promóterén keresztül.

5. Lentivírus által mediált génbeviteli módszerrel előállított, ektópikus *Rybp* expressziójára képes sejtvonalakat használatával megállapítottuk, hogy az *Rybp* sejtekbe történő visszavitele csak részlegesen állítja helyre a retinsav jelátviteli útvonal tagok, valamint a *Pax6* kifejeződését.
6. Az *in vitro* neurális differenciáció során megemelkedik mind az apoptózis, mind a nekrozis mértéke az *Rybp null* mutáns sejtekben. Továbbá, azt is megállapítottuk, hogy az apoptózis mértéke összefügg nem csak az *Rybp* hiányával, de a *PAX6* magasabb szintjével is.
7. Áramlási citometria segítségével kimutattuk, hogy retinsav kezelés hatására megváltozik a sejtciklus fázisok eloszlása az *in vitro* neurális differenciáció során.

Summary

RYBP is a core member of the non-canonical Polycomb Repressive Complexes 1 (ncPRC1s), which are essential epigenetic regulators of cell identity. We have previously reported that RYBP is important for central nervous system development in mice and *Rybp null* mutant (*Rybp*^{-/-}) mouse embryonic stem cells has an impaired differentiation ability *in vitro* as they form more progenitor and less terminally differentiated cells. Moreover, the increased neural progenitor pool formation was linked with the elevated level of the neural progenitor marker gene *Pax6*.

Since *Pax6* stands under the regulation of the retinoic acid (RA) signalling pathway, I have investigated whether *Rybp* can regulate the RA pathway with special focus on *Pax6* during the time course of *in vitro* neural differentiation of mouse ES cells. The results showed that all the examined RA signaling pathway members were overexpressed in the *Rybp*^{-/-} neural cultures. By utilising luciferase reporter assays, we also demonstrated that RYBP was able to repress the *Pax6* gene through its *P1* promoter, and the repression is attenuated when the other ncPRC1 member, Ring Finger Protein 1 was present, suggesting that RYBP repress

Pax6 in a Polycomb dependent manner, via the ncPRC1. We also demonstrated that there were an increased rate of apoptosis and necrosis in the *Rybp*^{-/-} neural cultures. *Rybp* can function both as a pro and anti-apoptotic gene, depending on the given cell type and context. Our results suggest that *Rybp* exerts an anti-apoptotic function during neural differentiation and that in the lack of *Rybp* neural progenitors are prone to die, which is likely lead to the impaired terminal differentiation.

Taken together, in my PhD work I demonstrated that RYBP regulate the gene expression of *Pax6* via ncPRC1, and in the lack of *Rybp* the RA pathway increased, due to cells undergo apoptosis and necrosis, which can be one of the causatives of the impaired terminal differentiation towards neuronal lineages from progenitors.

Publikációk listája

MTMT azonosító: 10071413

Összesített impact factor: 11,379

A fokozatszerzési eljárás alapját képező közlemény:

Sutus, E., Henry, S., Adorján, L., Kovács, G., Purity, 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.**, Purity, 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., Purity, 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**

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek **Dr. Purity Melinda** 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.

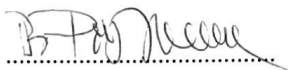
Szeretném megköszönni Dr. Erdélyi Miklósnak, hogy az ELKH Genetikai Intézetében írhattam PhD tézisemet, Dr. Endre Gabriellának a qRT-PCR kísérletekben nyújtott segítségét, Dr. Kozma-Bognár Lászlónak, hogy segített a luciferáz riporter próbák kivitelezésében, Dr. Ayaydin Ferhan-nak, Dr. Steinbach Gábornak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

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

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Dr. Purity Melinda, mint a közlemények felelős szerzője igazolom, hogy Sutus Enikő PhD jelölt jelentős mértékben hozzájárult a dolgozat alapjául szolgáló tudományos publikáció létrehozásához. Az értekezésében 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.

2022. 04. 05.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Purity Melinda', written over a horizontal dotted line.

Dr. Purity Melinda

témavezető