

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

HUN-REN

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetikai Intézet

Ph.D. ÉRTEKEZÉS

Az RYBP szerepének vizsgálata a mezoderma kialakításában és axiális megnyúlásában

(Investigating the role of RYBP in mesoderm formation and axial elongation)

Kókity Lilla

Témavezető: **Dr. Pirity Melinda Katalin**

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont Genetikai Intézet

**HUN
REN**



Szeged

2025

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1. Össejtek.....	6
2.2. A gasztruláció folyamata.....	7
2.3. A BRACHYURY szerepe a korai embrionális fejlődésben	10
2.4. A mezoderma kialakulásának vizsgálata <i>in vitro</i> modellek segítségével	12
2.4.1. 3D-s embrionális testek képzése	12
2.4.2. 2D-s kardiális differenciáció	14
2.4.3. Gasztruloidok mint modell rendszerek	15
2.5. A mezoderma kialakulás és a kardiális elköteleződés nyomon követése marker gének segítségével	18
2.6. Az RYBP és a Polikomb represszív komplexek szerepe a korai embrionális fejlődésben és a kardiális elköteleződésben	21
3. Célkitűzések.....	24
4. Anyagok és módszerek.....	25
4.1. Alkalmazott sejtvonalak és tenyésztési körülmények	25
4.2. <i>In vitro</i> embrionális testképzés és kardiális differenciáció	26
4.3. <i>In vitro</i> gasztruloidok létrehozása	27
4.4. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR).....	28
4.5. Immuncitokémia (ICC).....	29
4.6. Áramlási citometria (FC)	31
4.7. Western blot analízis	32
4.8. Egysejtes RNS szekvenálási adatok (scRNA-Seq) újra elemzése	32
4.9. A <i>prk7-Brachyury</i> túltermeltető konstruktt létrehozása	33
4.10. $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ transzfekció	34
4.11. Ko-immunprecipitáció (CoIP)	34
4.12. Statisztikai analízis.....	35
5. Eredmények.....	37
5.1. Az <i>Rybp</i> ^{-/-} kardiális telepekben kevesebb szív endotél sejt alakul ki, mint a vad típusban	37
5.2. <i>Rybp</i> hiányában a kardiális progenitor marker gének alacsony expressziót mutatnak	41
5.3. <i>Rybp</i> hiányában a fő csíralemezek kialakulása zavart szenved.....	45

5.4. <i>Rybp</i> hiányában a 3D-s embrionális testekben az endodermális és mezodermális rétegek alulreprezentáltak.....	49
5.5. <i>Rybp</i> és a <i>Brachyury</i> együttesen fordul elő a primitív csíkban, naszcens mezodermában és a kardiális mezodemában.....	53
5.6. Az <i>Rybp</i> ^{-/-} gasztruloidok axiális irányú megnyúlása zavart szenved, ami megrövidült törzsi és farki fenotípust eredményez.....	56
5.7. Az RYBP képes fizikai interakcióba lépni a BRACHYURY fehérjével.....	62
6. Eredmények megvitatása	65
7. Köszönetnyilvánítás	73
8. Irodalomjegyzék.....	75
9. Eredmények összefoglalása	91
10. Summary.....	94
11. Publikációk listája.....	97

1. Rövidítések jegyzéke

2D	– kétdimenzió
3D	– háromdimenzió
A-P tengely	– anterior-poszterior tengely
AUTS2	– Activator Of Transcription And Developmental Regulator AUTS2
BMP	– Bone Morphogenetic Protein Signaling Pathway (csont morfogénikus fehérje szignalizációs útvonal)
CBX	– Chromobox
CDKN2A	– Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CMC	– kardiomiocytes (szívizomsejtek)
CoIP	– Co-immunoprecipitation (ko-immunoprecipitáció)
cPRC1	– canonical Polycomb Repressive Complex 1 (kanonikus Polikomb Represszív Komplex 1)
d	– day (nap)
DAPI	– 4',6-diamidino-2-phenylindole
DEDAF	– Death Effector Domain (DED)-Associated Factor
dKO	– double knockout (két génre nézve null mutáns)
DMEM	– Dulbecco's modified eagle's medium
E	– embryonic day (embrionális nap)
EB	– embryoid body (embrionális test)
EMT	– epithelial-mesenchymal transition
Eomes	– Eomesodermin
FC	– Flow cytometry (áramlási citometria)
FGF	– Fibroblast Growth Factor
Flk-1	– Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (<i>Kdr</i> , <i>Vegfr</i>)
GATA4	– GATA Binding Protein 4
H2AK119ub1	– H2A hiszton 119. lizinjének ubikvitinációs jele
H3K27ac	– H3 hiszton 27. lizinjének acetilációs jele
Hand1	– Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 1
HD	– Hanging drop (függő csepp)
HEK293T	– Human Embryonic Kidney 293T
ICC	– Immunocytochemistry (Immuncitokémia)

ICM	– Inner cell mass (a hólyagcsíra megvastagodott sejtrétege)
<i>in vitro</i>	– az élő szervezetben
<i>in vivo</i>	– az élő szervezeten kívül (petri csészében)
ISL-1	– Insulin Gene Enhancer Protein ISL-1
Kat.	– katalógus szám
<i>Mef2c</i>	– Myocyte-specific enhancer factor 2C
MESP1	– Mesoderm posterior 1
<i>Myh6</i>	– Myosin Heavy Chain 6
<i>Nanog</i>	– Nanog Homeobox
ncPRC1	– non-canonical Polycomb Repressive Complex 1 (nem kanonikus Polikomb Represszív Komplexek)
NEFM	– Neurofilament Medium Chain
<i>Nkx2-5</i>	– Homeobox Protein Nkx-2.5
NMP	– neuromezodermális progenitor sejtek
NODAL	– Nodal Signaling Pathway (Nodal szignalizációs útvonal)
Obj.	– Objektív
<i>Oct4</i>	– POU Class 5 Homeobox 1 (<i>Pou5f1</i>)
p300	– E1A Binding Protein P300
PBS	– Phosphate buffered saline (foszfáttal pufferelt sóoldat)
PcG -	– Polycomb group proteins (Polikomb csoport fehérjék)
PCGF	– Polycomb Group Ring Finger
<i>Pecam1</i>	– Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31)
RING1	– Ring Finger Protein 1
RNF2	– Ring Finger Protein 2 (RING1B)
RYBP	– RING1B and YY1 binding protein
SMMHC	– Smooth Muscle Myosin Heavy Chain 11
scRNA-Seq	– Single-cell RNA sequencing (sejtes RNS szekvenálás)
<i>Sox2</i>	– SRY-Box Transcription Factor 2
T	– T-box transkription factor T (TBXT)
<i>Tnnt2</i>	– Cardiac Troponin T2
<i>Vcam1</i>	– Vascular cell adhesion protein 1
WNT	– Wnt/ β -caternin Signaling Pathway (Wnt szignalizációs útvonal)
YAF2	– YY1 Associated Factor 2

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Össejtek

Az embrionális fejlődés során a megtermékenyített petesejt elkezd osztódni, kialakul a kétsejtes és szedercsíra állapot, majd létrejön az ún. hólyagcsíra (blasztociszta) (1. ábra A). A hólyagcsíra külső sejtjeiből alakul ki a méhlepény, míg a belső megvastagodott sejtrétegéből (inner cell mass (ICM)) fejlődik ki az embrió. A belső sejtréteget pluripotens össejtek alkotják, melyek képesek mindhárom csíralemez (endoderma, mezoderma és ektoderma) létrehozására, ezáltal a szervezet valamennyi sejttypusának kialakítására (Marikawa és Alarcón 2009). Az embriókból származó pluripotens össejtek számos olyan hasznos tulajdonsággal rendelkeznek, amelyek előnyössé teszik őket a kutatás számára. Így pl. a pluripotens össejtek megfelelő körülmények mellett folyamatos osztódásra és önmegújulásra képesek és sejtenyészetekben korlátlan ideig fenntarthatóak. A tenyésztési körülményeik megváltoztatásával belőlük különböző testi sejttypusok pl. szívizom, endotél, neurális sejtek stb. differenciálthatók (Zakrzewski és mtsai. 2019). Az össejt alapú *in vitro* differenciációs rendszerek széles körben elterjedtek. Fő alkalmazási területük a szövet és szervfejlődés korai eseményeinek vizsgálata, és az ezekhez kapcsolódó kóros elváltozások, betegségek *in vitro* tanulmányozása (Dushnik-Levinson és Benvenisty 1995; Keller 1995). Továbbá az össejtekből differenciáltatott progenitor sejtek felhasználhatók még a regeneratív medicinában a sérült vagy beteg szövetek pótlására (Hoang és mtsai. 2022). Az *in vitro* össejt alapú modellek alkalmasak olyan, a fejlődésben fontos szerepet játszó gének tanulmányozására, melyek hiánya *in vivo*, egér modellekben, a korai letalitás miatt nehezen vizsgálható.

A pluripotens össejtek egy másik nagyon fontos tulajdonága az önszerveződési képesség. Megfelelő körülmények között az össejtek képesek összetett és funkcionális háromdimenziós (3D) szövetekké szerveződni (Brassard és Lutolf 2019). Ezen képességüket kihasználva a közelmúltban nagy fejlődésnek indultak a 3D-s gastruloid (bővebb leírás a 2.4.3. fejezetben) és organoid modellek, melyekkel egyedülálló lehetőség nyílik a komplex embriológiai események részletes és kvantitatív tanulmányozására. Az organoid modellek új megközelítést jelentenek a kutatásban, mivel bennük a sejtek egy réteg helyett több sejtrétegbe rendezetten helyezkednek el, így sokkal pontosabban képesek modellezni az élő szervezetben lejátszódó eseményeket. Az organoidokat az adott szervnek megfelelő sejttypusok alkotják, melyek

funkcióképesek és az élő szervezethez hasonlóan szervezett struktúrákat alakítanak ki (Arias és mtsai. 2022; Simunovic és Brivanlou 2017; Yang és mtsai. 2023).

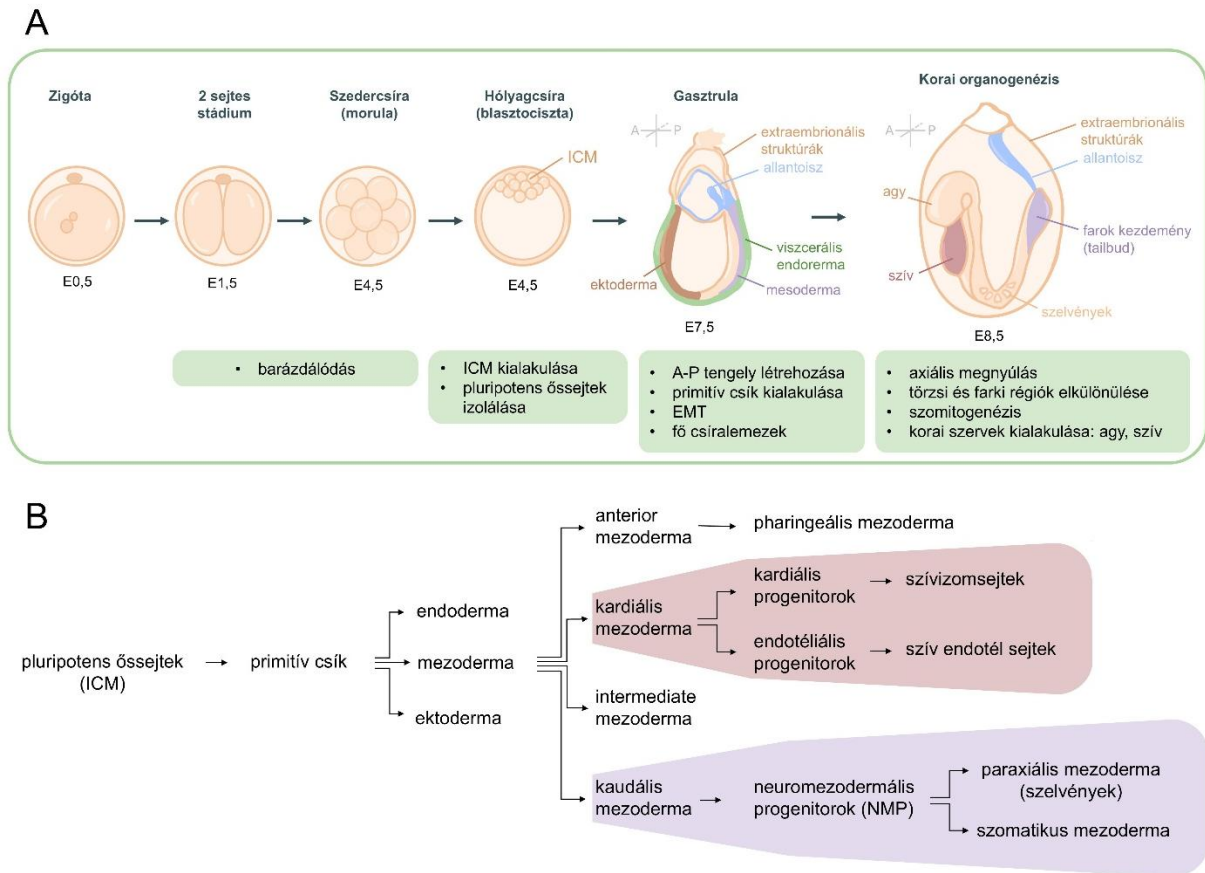
2.2. A gasztruláció folyamata

A hólyagcsíra állapotot követi az embrionális fejlődés egyik legfontosabb stádiuma az ún. gasztruláció (1. ábra A). A gasztruláció egy összetett, szigorúan szabályozott folyamat, mely során az embrióban rövid időn belül nagy változások mennek végbe. A gasztruláció során a ICM össejtjei kilépnek a pluripotens állapotból és átalakulnak, hogy létrehozzák a három fő csíralemezt: az endodermát, a mezodermát és az ektodermát (Arnold és Robertson 2009; Tam és Loebel 2007). A gasztruláció során bármilyen hiba nagymértékben kihat az embrió későbbi fejlődésére és súlyos következményekkel járhat, melyek gyakran összeegyeztethetetlenek az étellel és az embrió pusztulásához vezetnek.

Habár a különböző fajok embrionális fejlődése eltér egymástól, a gasztruláció és annak tér- és időbeli szabályozásban részvevő transzkripciós faktorok és szignalizációs útvonalak evolúciósan nagyfokú konzerváltságot mutatnak (Solnica-Krezel 2005). Az egérben a gasztruláció mindössze három napot vesz igénybe, az embrionális fejlődés (E) 6,25 napjától az E8,0 napjáig tart. A gasztruláció kezdete előtt (E5,5) a fejlődő embrióban kialakul az elülső-hátsó (anterior-posterior (A-P)) tengely, mely meghatározza a fejlődő embrió feji és farki régióját (Takaoka és mtsai. 2007). Az A-P tengely létrehozása kulcsfontosságú a sejtek megfelelő térbeli specifikációjához, továbbá a tengelyinformációk határozzák meg a gasztruláció kezdetének helyét: az ún. primitív csíkot. A primitív csík nem más, mint egy hosszúka sejtsáv, amely az embrió tengelye mentén alakul ki a gasztruláció korai szakaszában az oldalsó sejteknek a tengely felé történő mozgása révén. Ezen sejtsáv a középvonal mentén egy barázdát alakít ki, amelyen keresztül a sejtek az embrió belseje felé mozognak, hogy kialakítsák a mezodermát (Beddington és Robertson 1999; Rivera-Pérez és Magnuson 2005).

Az A-P tengely és a primitív csík létrehozásában kritikus szerepet játszanak a különböző szignalizációs útvonalak, mint pl. a WNT, BMP, NODAL és FGF jelátviteli útvonal (Arnold és Robertson 2009; Bardot és Hadjantonakis 2020; Oki és mtsai.2010; Perea-Gomez és mtsai. 2004). A primitív csíkban a sejtek a szignálok hatására megváltoznak, epiteliális-mezenchimális átmeneten (epithelial-mesenchymal transition, (EMT)) mennek keresztül, mely során a sejtek közötti kapcsolatok lazulnak, ami lehetővé teszi a sejtek migrációját, ezzel együtt a fő csíralemezek kialakulását (Ismagulov, és mtsai. 2021; Nakaya és Sheng 2008). A szignalizációs útvonalak közül a gasztrulációs folyamat során a legkritikusabb szerepet a WNT

útvonala tagjai: a *Wnt3a* és a β -kateninnek töltik be. Funkcionális *Wnt3a* vagy β -kateninnek nélkül egérembriókban nem alakul ki sem az A-P tengely, sem pedig a primitív csík. A *Wnt3a*^{-/-} és β -katenin^{-/-} mutáns embriók fejlődése már a gasztruláció előtt leáll, így ezekben nem tudnak kifejlődni endoderma és mezoderma rétegek sem (Haegel és mtsai. 1995; Huelsken és mtsai. 2000; Liu és mtsai. 1999; Rivera-Pérez és Magnuson 2005).



1. ábra: Az *in vivo* egér embrió fejlődésének korai stádiumai

(A) Az egér embrionális fejlődése a zigótától a korai embrió organogenezisig. (B) A különböző mezodermális sejt populációk kialakulása. E: az egér embrionális fejlődés napja, ICM: a hólyagcsíra megvastagodott sejtrétege (inner cell mass), A-P: anterior-poszterior, EMT: epitéliális-mezenchimális átmenet. NMP: neuromezodermális progenitorok

A fő csíralemezek közül a legbelső az endoderma. Az endodermából fejlődik ki a légző- és emésztőrendszer, valamint az ahhoz kapcsolódó szervek, mint például a máj és a hasnyálmirigy (Wlizla és Zorn 2015). A három csíralemez közül a középső a mezoderma, melyet naszcens

mezodermának is neveznek, mivel belőle eredeztethetők a fejlődés későbbi stádiumában kialakuló mezeoderma populációk (1. ábra B). A mezoderma szabályozásában fontos szerepet játszanak a T-box családhoz tartozó DNS-kötő transzkripciós faktorok pl. *Brachyury*, *Eomes* (Rivera-Pérez és Magnuson 2005; Smith 1999), melyek expressziója már a primitív csíkban megkezdődik (Ciruna és Rossant 1999; Wilkinson, és mtsai. 1990). A mezodermából alakul ki a szív- és érrendszer, a vázizomzat, a gerinc, a bordák és a végtagok csontjai, valamint a nemi szervek. A külső csíralemez az ektoderma, melyből fejlődik ki a központi és a környéki idegrendszer, a bőr és annak származékai és a szem (Gilbert és Barresi 2017). A csíralemezek kialakulása után a gasztruláció késői szakaszában (E8) létrejönnek a dorzo-ventrális és jobbal tengelyek is, így a gasztruláció végére kialakul az embrió teljes koordináta-rendszere. A kialakuló koordináta-rendszer a fejlődő embrióban biztosítja, hogy minden embrionális szövet és szerv térben megfelelő helyre kerüljön (1. táblázat).

endoderma	mezoderma	ektoderma
• Az emésztőrendszer belső hámja • A légzőrendszer belső hámja • A húgycső, a húgyhólyag belső hámja • A reproduktív rendszer belső hámja • Máj • Hasnyálmirigy • Csecsemőmirigy (thymus) • Pajzsmirigy és mellékpajzsmirigyek	• Szív és érrendszer • Gerincúr (notochord) • Csontvázrendszer • Vázizomzat • A gyomor és a bél simaizom rétegek • Kiválasztó és nyirokrendszer • Reprodukciós rendszer (kivéve a csírasejteket) • A bőr irha (dermis) réteg • A testüregek belső szövetei • Mellékvese kéreg	• Idegrendszer (központi és környéki) • A bőr felhámja és származékai (verejtékmirigyek, szőrtüszők) • Felhám receptorok • A száj és a végbélnyílás hámrétegek • Szaruhártya és szemlencse • Mellékvesekéreg • Fogzománc • A tobozmirigy és az agyalapi mirigy hám

1. táblázat: A fő csíralemezek (endoderma, mezoderma, ektoderma) származékai (Gilbert és Barresi 2017)

A gasztrulációt követően az embriók kaudális mezoderma populációja (egyes cikkekben korai neuromezoderma populációként vagy neuromezoderma kompetens sejtekként is emlegetik)

gyors osztódásba kezd, poszterior irányba tovább nyúlik és megkezdődik a szegmentálódás, azaz a szomitogenezis (Martins-Costa, és mtsai. 2024; Tzouanacou és mtsai. 2009). A szegmensek kialakítása több lépcsőben történik, először a kaudális mezoderma sejtek tovább differenciálódnak és kialakítják a neuromezodermális progenitor sejteket, melyekből párhuzamosan fejlődik ki a paraxiális mezoderma a szelvényekkel és az idegcső (Martins-Costa és mtsai. 2024; Sambasivan és Steventon 2021). Ezzel egyidőben a kardiális mezoderma és ektoderma sejtei tovább differenciálódnak, hogy kialakítsák az embrió legelső szerveit, a szívet és az agyat, ezzel megkezdődik az embrió organogenezise. Az embrionális fejlődés 8,5 napjára (E8,5) az egér embrióban jól elkülöníthető feji, törzsi és farki régiók (farokkezdemény (tailbud)) mellett, összetett hálózatokat tartalmazó agy és dobogó szív figyelhető meg (1. ábra B).

2.3. A BRACHYURY szerepe a korai embrionális fejlődésben

A *Brachyury* a gerincesek embrionális fejlődésében fontos szerepet játszó gén, melynek funkcióvesztéses mutációját először 1927-ben Nadine Dobrovolskaïa-Zavadskaïa írta le. Dobrovolskaïa-Zavadskaïa egerekben mutációt indukált, mely során azonosított egy rövid fark (sort-tail) fenotípust. A fenotípusért felelős gént a görög brachus (rövid) és oura (fark) szavakból *Brachyury*-nak nevezte el (Korzh és Grunwald 2001). Munkájából kiindulva később kimutatták, hogy az egerek farkának hossza eltérő a különböző *Brachyury* heterozigóta mutációk esetében (Chesley 1935), továbbá az egerekben leírt fenotípust más gerinces fajokban is megfigyelték (Buckingham és mtsai. 2013; Han és mtsai. 2019; Kemmler és mtsai. 2023). Egy nemrég publikált cikkben azonosították, hogy egy inszerció felelős a *Brachyury* gén alternatív átírásáért, ami az emberszabásúak, többek között az emberek farkának elvesztését eredményezte (Xia és mtsai. 2024). Dobrovolskaïa-Zavadskaïa úttörő munkája fontos mérföldkőnek számított a gerincesek fejlődésgenetikájában és az általa azonosított *Brachyury* gén a mai napig a tudományos érdeklődés tárgya (Korzh 2024), és a PhD disszertációm egyik kiemelt szereplője.

A *Brachyury* mRNS az egér embrionális fejlődés során nagyon korán, már a gasztruláció kezdetén, a primitív csíkban megjelenik, majd a gasztruláció alatt a mezoderma populációkban detektálható. Ezért az embriológiában az egyik kulcsfontosságú mezoderma markergénként tartják számon. A gasztrulációt követően az E8,5 egér embriókban a *Brachyury* expressziója csak a gerinchúrra (notochord) és a farokkezdeményre (tailbud) korlátozódik (Wilkinson és mtsai. 1990). Születés után a *Brachyury* gén kikapcsolódik, és jelenléte felnőtt szövetekben

nem detektálható. Kóros esetben azonban előfordulhat, hogy a *Brachyury* mRNS mégis termelődik, ami a felnőtt szövetekben tumoros elváltozásokhoz vezet pl. csonttrák (chordoma), tüdőrák, mellrák és prosztata rák (Chen és mtsai. 2020). A *Brachyury* expresszióját gasztruláció és axiális megnyúlás alatt a WNT3A/ β -katenin szignalizációs útvonal szabályozza. A WNT3A közvetlen módon hat a *Brachyury* gén termelődésére, hiányában a mutáns embriókban (*Wnt3a*^{-/-}) alacsony a *Brachyury* expresszió és az axiális megnyúlás teljes hiánya figyelhető meg (Arnold és mtsai. 2000; Yamaguchi és mtsai. 1999).

A *Brachyury* homozigóta (*Brachyury*^{-/-}) mutáns egerek az embrionális fejlődés 9-10. napja között (E9-E10) elpusztulnak. A E7 *Brachyury*^{-/-} embriókban a mezoderma kialakulását tekintve nagyfokú rendellenességek mutatkoztak. Bennük alacsony mezoderma/ektoderma arány és késleltetett endoderma kialakulás figyelhető meg (Yanagisawa és mtsai. 1981). A mutáns embriók axiális irányú megnyúlása sérül, ami a null mutáns egerekben gerinchúr hiányához és abnormális szelvényezettséghez vezet (Chesley 1935; Showell és mtsai. 2004). Továbbá a *Brachyury*^{-/-} embriókban nem fejlődik ki az embrionális fejlődés során a magzati gázcsérét és a maternális összeköttetést biztosító allantoisz sem, mely az embriók korai letalitását idézi elő (Chesley 1935).

A *Brachyury* gén a BRACHYURY másnéven TBXT (T-box transcription factor T (T)) sejtmagi fehérjét kódolja. A BRACHYURY egy 435 aminosavból álló T-box transzkripció faktor, mely egy DNS kötő doménnel rendelkezik. A BRACHYURY DNS kötő doménjén keresztül kapcsolódik a T-box 5'-TTCACACCTAGGTGTGAA-3' palindrom szekvenciáihoz, melyen keresztül szabályozni tudja a mezoderma kialakításában, a korai kardiális elköteleződésben és az axiális megnyúlásban fontos gének expresszióját (Kispert és Herrmann 1993). A BRACHYURY fehérje funkciójának egy része átfed a T-box család egy másik tagjával, az EOMES-el (Eomesodermin). Kimutatták, hogy a BRACHYURY és az EOMES kolokalizációt mutat a naszcens és a kaudális mezodermaiban, és közösen szabályozzák a sejtek pluripotens állapotból való kilépését és a fő csíralemezek szegregációját (Tosic és mtsai. 2019). Ezen felül mindkét fehérjéről korábban leírták, hogy képesek közvetlenül szabályozni a *Mesp1*, a kardiális elköteleződés legkorábbi génjének termelődését (David és mtsai. 2011), így jelenlétük meghatározó a kardiális elköteleződésben. Habár a két fehérje több közös célgénen is osztozik, funkciójuk nem teljesen fed át, az EOMES az anterior és definitív endoderma kialakításához, míg a BRACHYURY a kaudális mezoderma kialakításához elengedhetetlen (Schüle és mtsai. 2023). *In vitro* vizsgálatokban a *Brachyury* és *Eomes* kettős mutáns (dKO) sejtek nem voltak

képesek semmilyen típusú mezoderma vagy definitív endoderma kialakítására (Tosic és mtsai. 2019).

2.4. A mezoderma kialakulásának vizsgálata *in vitro* modellek segítségével

A gasztruláció az embrionális fejlődés egy alapvető és kritikus folyamata, melyre az utóbbi években számos összejtalapú 2D-s és 3D-s modell jelent meg. Az *in vitro* modellek előnye, hogy nagy mennyiségben előállíthatók és alkalmazhatók olyan fejlődésbiológiai kérdések megválaszolására is, melyek az embriók estében etikai akadályokba ütközhetnek. Az egyik legrégebb óta jelen lévő és gyakran használt *in vitro* gasztrulációs modellek az ún. embrionális testek (embryoid body (EB)) (Keller 1995). Az embrionális testek viszonylag könnyű előállításuk miatt az elmúlt 30 évben nagyon népszerű modellnek számítottak. A rajtuk végzett kísérletek pedig nagyszámú fejlődésbiológiai és technikai kérdésre adtak választ, melyek lehetővé tették a közelmúltban megjelenő komplexebb modellek, a gasztruloidok (van den Brink és mtsai. 2020; Veenvliet és mtsai. 2020) és a szintetikus embriók (Tarazi és mtsai. 2022; Xu és mtsai. 2021) megjelenését. Az új modellek az embrionális testektől összetettebb struktúrák kialakítására is képesek, és bennük a gasztrulációt követő embrionális lépések pl. axiális megnyúlás, a szomitogenezis és a legkorábban megjelenő szervek kialakítása is megfigyelhető.

2.4.1. 3D-s embrionális testek képzése

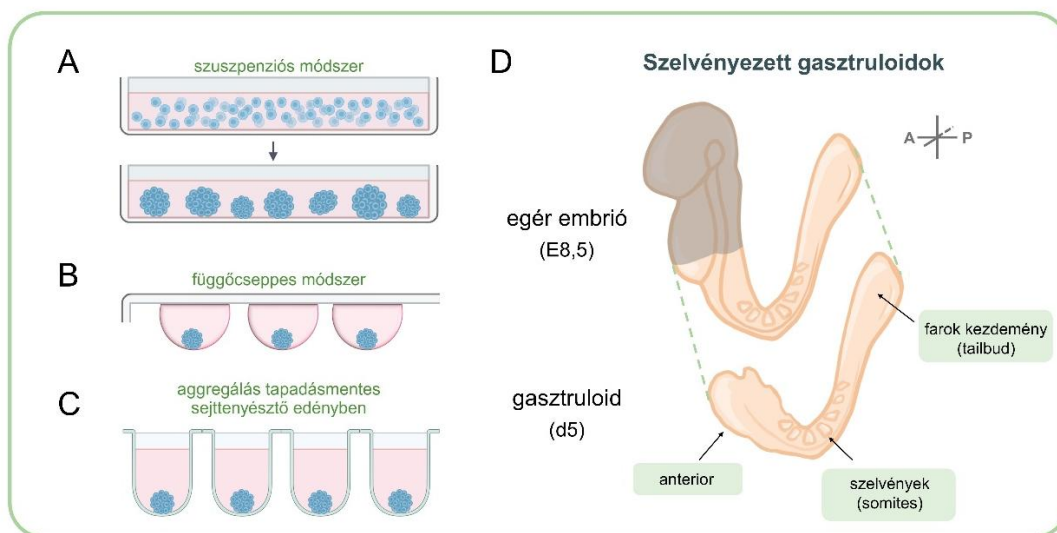
Az embrionális testek a pluripotens összejtekből *in vitro* létrehozott 3D-s szuszpenziós sejt aggregátumok. Bennük mindhárom fő csíralemez (endoderma, mezoderma és ektoderma) képes kialakulni, és szerveződésük az embriók gasztrulációs stádiumához hasonló. Az embrionális testek, a 2D-s adherens tenyészethez viszonyítva, sokkal hatékonyabban képesek reprodukálni a gasztruláció folyamatát. Az embrionális testek differenciációjakor a homogén pluripotens összejt-kolóniákból néhány nap alatt kialakulnak a fő csíralemezek, melyekből a test különböző sejtípusai differenciáltathatók (Brickman és Serup 2017; Keller 1995). A szuszpenzióban tartott EB-k sejtjei az embrióhoz hasonlóan sokrétű sejt-sejt kölcsönhatások kialakítására és epitéliális-mezenchimális átmenetre képesek (Zeevaert és mtsai. 2020). Továbbá az előállított embrionális testek közepén lévő sejtek, az embriókhoz hasonlóan, apoptózison mennek keresztül, ami a legtöbb EB közepén egy sejtekkel körülvett, folyadékkal töltött, tisztas üreget eredményez (Choi és mtsai. 2005; Coucouvanis és Martin 1995; Kim és mtsai. 2011). Az embrionális testek amellet, hogy régóta használt és megbízható gasztrulációs modellek, fontos kezdeti lépést jelentenek az irányított differenciálási protokollokban is. Az

egér 2D-s szív- és neurális irányú differenciációs protokollok még mindig a kezdeti EB-lépésre támaszkodnak. Az embrionális testek hátránya azonban, hogy az *in vitro* létrehozott EB-k nagyrészt heterogének. Bennük mind a fő csíralemezek, mint pedig a differenciált sejttípusok kísérletenként eltérő mintázatot mutathatnak (Wilson és mtsai. 2014). További hátrányuk, hogy az embrionális testek önmagukban nem képesek az anterio-posterior, dorzo-ventrális és jobbal-tengelyek kialakítására, ezért nem alkalmasak a gasztruláció térbeli vizsgálatára (ten Berge és mtsai. 2008; Brickman és Serup 2017).

Az embrionális testek előállítására többféle megközelítés ismert:

a) Szuszpenziós módszer:

Az őssejtekből egy sejtszuszpenziót hozunk létre, melyet egy tapadásmentes petri csészébe (pl. baktriális csészébe) helyezünk, ahol a pluripotens őssejtek spontán módon egymáshoz tapadnak, azaz önszerveződnek (2. ábra A). A szuszpenziós módszer viszonylag egyszerű, és egyszerre sok embrionális test létrehozását teszi lehetővé. A módszer hátránya azonban, hogy az előállított embrionális testek nagyon heterogének, mind méretükben, mind összetételükben nagy eltérések lehetnek. Általában a nagyobb embrionális testekben több endoderma, míg a kisebbekben több mezoderma képződik (Livigni és mtsai. 2009).



2. ábra: Az EB képzés típusai és a szelvényezett gasztruloid modell sematikus ábrázolása

Az EB-k előállításának típusai: (A) szuszpenziós módszer; (B) függőcseppes módszer; (C) aggregálás 96 lyukú tapadásmentes sejtenyésző edényben. (D) A szelvényezett gasztruloidok (gastruloids with somites) sematikus ábrázolása. E: embrionális nap, d: nap

b) A függőcseppes módszer:

A függőcseppes módszer (Hanging drop (HD)) során pluripotens őssejteket tartalmazó szuszpenzióból kis térfogatú cseppeket készítünk a petri csésze tetejére, majd a tetőt megfordítva a gravitáció hatására a lelógó cseppek alján a sejtek aggregálódnak és embrionális testeket hoznak létre (2. ábra B) (Wang és Yang 2008). A kialakított EB-k aggregáció után összegyűjthetők és tapadásmentes petri csészében tovább tenyésztethetők. A módszer előnye, hogy a cseppekben a sejtek száma szabályozható, ami meghatározza az embrionális testek méretét és biztosítja azok uniformitását. Hátránya viszont, hogy nagy számú minta esetében a cseppek kirakása, illetve összegyűjtése sok időt és erőforrást igényel.

c) Aggregálás tapadásmentes sejttenyésztő edényben:

Ennél a módszernél az őssejteket 96-lyukú „U” aljú tapadásmentes sejttenyésztő edényben aggregáltatjuk, mely egyszerű és szabványosított megközelítést jelent nagyszámú minta esetében is (2. ábra C). A tapadásmentes edények egységes méretű és alakú EB-k előállítását teszik lehetővé, továbbá lehetőséget biztosítanak az automatizált EB képzésre és a keletkező 3D-s aggregátumok automatizált monitorozására (Yasuda és mtsai. 2009).

2.4.2. 2D-s kardiális differenciáció

Az embrionális testek a gasztrulációs modellként való alkalmazásuk mellett az irányított differenciálási protokollokban is alkalmazhatók. Az egér 2D-s szív- és neurális irányú differenciációs protokollok még mindig a kezdeti EB-lépésre támaszkodnak (Abranches és mtsai. 2009; Maltsev és mtsai. 1993). PhD munkám során a kardiális progenitorok kialakulásának tanulmányozásához egy ilyen embrionális testeken alapuló 2D-s kardiális modellt alkalmaztunk. A kardiális differenciációhoz első lépésként, az EB képzéshez hasonlóan, az őssejteket aggregáltattuk, viszont az embrionális testképzéssel ellentétben itt a kialakuló EB-ket letapasztottuk és 2D-s tenyészetben növesztettük tovább a dobogó szívizomtelepek kialakulásáig (lásd: Anyagok és módszerek 4.2.) (Wang és Yang 2008). Az általunk alkalmazott kardiális protokoll nem tartalmaz olyan indukáló faktorokat (citokineket), amelyek befolyásolhatják a szívizom-irányú elköteleződést, itt a mezoderma képződését és a kardiális progenitor sejtek differenciációját az embrionális testek letapadása indukálja. Az előállított telepekben a differenciáció késői időpontjára (14. nap) kialakulnak a szívizomsejtek (kardiomiociták) és a szív felépítésében résztvevő egyéb sejtípusok pl. endotél,

mezenchimális, aorta simaizom és neurális sejtek. A felsorolt sejttípusok kialakulása kulcsfontosságú a fejlődő szív szerkezetének és pumpa funkcióinak fenntartásában. Ezenfelül korábban kimutatták, hogy a szív fejlődése során a sejtek differenciációját nagymértékben befolyásolják a szomszédos sejttípusoktól érkező szignálok, melyek hatással vannak a fejlődésben lévő szív morfogenezisére és funkciójára (Mensah és Gowher 2024). Korábban kimutatták, hogy a szív endotél

sejtjei nélkülözhetetlenek a megfelelő kardiomiocita differenciációhoz, és hiányukban a szomszédos szívizomsejtek teljesítményének csökkenése figyelhető meg (Brutsaert 2003). Hasonló kapcsolat volt megfigyelhető a szívizomsejtek és a szimpatikus neuronok között is, ahol a neurális sejtek olyan faktorokat bocsátottak ki melyek képesek voltak indukálni a szívizomsejtek érését (Atkins és mtsai. 1997; Kowalski és mtsai. 2022). A különböző kardiális sejttípusok párhuzamos kialakulása alkalmassá teszi a sejtvonalak elköteleződésének együttes vizsgálatát, továbbá a progenitor és az érett sejttípusok kollektív tanulmányozását.

Az *in vitro* 2D-s kardiális differenciációs modellek lehetővé teszik a szív-irányú elköteleződés, és a kialakuló köztes progenitor sejttípusok pl. kardiális és endotéliális progenitorok kialakulásának tanulmányozását. Így kiváló modellek a sejtek elköteleződésében szerepet játszó transzkripciós faktorok és a molekuláris mechanizmusuk vizsgálatára (Fijnvandraat és mtsai. 2003; Hescheler és mtsai. 1997).

2.4.3. Gasztruloidok mint modell rendszerek

Az *in vitro* létrehozott 3D-s gasztruloidok lényegében az embrionális testek tovább fejlesztett változatai (2. táblázat), melyek új megközelítést jelentenek gasztruláció és a gasztrulációt követő fejlődési lépések pl. axiális megnyúlás modellezésében. A gasztruloidokat az embrionális testekhez hasonlóan pluripotens őssejtek aggregálásával hozzuk létre, de az aggregáltatott sejtek száma a gasztruloidokban az embrionális testekhez képest lényegesen alacsonyabb. Az embrionális testeknél a kiindulási sejtszám 500-5000 sejt között mozog és protokollonként nagy variabilitást mutat.

Ehhez képest a gasztruloidok esetében az aggregációhoz mindössze 200-300 sejtet használnak (Baillie-Johnson és mtsai. 2015; Van Den Brink és mtsai. 2014; Veenvliet és mtsai. 2020). Az alacsony kiindulási sejtszám megfelel a fejlődő korai embriók ICM sejtszámának, és kulcsfontosságú tényezőt jelent a megfelelő gasztruloid modell létrehozásakor. A másik fontos különbség a gasztruloidok és az embrionális testek között a testtengelyek szervezett kialakítása.

modell neve	előnyei	hátrányai
2D-s kardiális differenciáció	• előállításuk egyszerű és olcsó • alkalmas a kardiális progenitor populációk és a különböző kardiális sejttípusok vizsgálatára	• kevésbé hasonlítanak az <i>in vivo</i> környezetre • bennük a sejtek közötti kommunikáció és szignalizáció nem teljes • a sejtek ellaposodott morfológiát mutatnak • korlátozott ideig dobognak
embrionális testek (EB)	• előállításuk egyszerű és olcsó • a sejtek morfológiája jobban hasonlít az <i>in vivo</i> sejtekhez • bennük mindhárom csíralemez kialakul • előállításukhoz nem szükséges citokinek alkalmazása	• a stádiumnak megfelelő embrióhoz képest több sejtet tartalmaznak • a csíralemezek EB-en belüli elhelyezkedése változó • bennük nem alakulnak ki az anterior-poszterior, dorso-ventrális és jobb-bal tengelyek
gasztruloidok	• előállításuk egyszerű • a gasztrulával megegyező sejtszámot tartalmaznak • bennük kialakul mindhárom fő csíralemez • bennük létrejönnek a anterior-poszterior, dorso-ventrális és jobb-bal tengelyek	• nem alkalmasak az anterior szövetek modellezésére • bennük indukálódik a WNT szabályozása alatt álló gének expressziója, ami megnehezíti a teljes fenotípus vizsgálatát
szelvényezett gasztruloidok	• bennük kialakul mindhárom fő csíralemez • bennük létrejönnek a anterior-poszterior, dorso-ventrális és jobb-bal tengelyek • bennük kialakul az embriókra jellemző szelvényezettség (somitogenesis)	• nem alkalmasak az anterior szövetek modellezésére • bennük indukálódik a WNT szabályozása alatt álló gének expressziója, ami megnehezíti a teljes fenotípus vizsgálatát
kiméra gasztruloidok	• genetikailag kevert modell előállítására alkalmasak • bennük kialakul mindhárom fő csíralemez • bennük létrejönnek a anterior-poszterior, dorso-ventrális és jobb-bal tengelyek. • alkalmasak a sejt autonóm és nem autonóm hatások megkülönböztetésére	• nem alkalmasak az anterior szövetek modellezésére • bennük indukálódik a WNT szabályozása alatt álló gének expressziója, ami megnehezíti a teljes fenotípus vizsgálatát • bennük a vad típusú és mutációt hordozó sejtek endogén jelöléssel különíthetők el
Szintetikus embriók	• képesek a teljes poszt-gasztrulációs egér embrió (E8,5) modellezésére	• előállításuk bonyolult és költséges • létrehozásuk extraembrionális sejtek jelenléte nélkül vagy az őssejtek endogén módosítása nélkül nem lehetséges

2. táblázat: A mezoderma kialakulásának vizsgálatára alkalmazott *in vitro* modellek előnyei és hátrányai

Az EB-kel ellentétben a gasztruloidokban létrejönnek az anterior-poszterior, dorzo-ventrális és jobb-bal tengelyek. Az aggregációt követően a gasztruloidok CHIR (CHIR99021, Chiron) kezeléssel mennek keresztül. A CHIR közvetett módon egy WNT inhibitor, a GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase 3) szerin/treonin protein kináz gátlásával képes aktiválni a WNT (Wnt/ β -catenin Signaling Pathway) szignalizációs útvonalat. A WNT szignalizáció pedig indukálja az embrió szimmetriájának felbontását (symmetry breaking) és a gasztruloidok axiális megnyúlását, ezzel kialakítva a gasztruloidok anterior-poszterior tengelyét (ten Berge és mtsai. 2008; Van Den Brink és mtsai. 2014; Takada és mtsai. 1994). A WNT szignalizáció az embrió szimmetriájának megszüntetése mellett képes aktiválni a *Brachyury* expresszióját, továbbá mezodermális és endodermális rétegek képződését (Yamaguchi és mtsai. 1999). A WNT-agonista kezelés (GSK-3-inhibitor) után, a gasztruloid differenciáció korai időpontjaiban (d3, d4), magasabb BRACHYURY fehérje szint figyelhető meg. Ezzel ellentétben a BRACHYURY szintje a differenciáció 5. napjára már csak enyhe CHIR függést mutatott (Suppinger és mtsai. 2023). A CHIR kezelés hatására a gasztruloidokban indukálódik a poszterior szövetek differenciációja, mellyel párhuzamosan a neuroektodermális progenitorok gátlása figyelhető meg. A gátlás következtében a gasztruloidokból hiányoznak az anterior szövetek, többek között nem fejlődik ki az embrionális agy. Ezért a gasztruloidok kizárólag a 8,5 napos embriók törzsi és farki részének modellezését teszik lehetővé. Ilyen típusú gasztruloid modelleket már néhány esetben alkalmaztak null mutáns fenotípusok jellemzésére, továbbá nemrégiben kiméra gasztruloid előállítására alkalmas módszert is publikáltak (Cermola és mtsai. 2021; Turner és mtsai. 2017; Wehmeyer és mtsai. 2022). A kiméra gasztruloidok alkalmasak a sejt autonóm és nem autonóm hatások megkülönböztetésére, pl. vad típusú sejt-környezetbe korlátozott számú genetikailag módosított sejtet helyezve tanulmányozhatók a gének sejt-autonóm hatásai. Hátrányuk, hogy bennük a vad típusú és mutációt hordozó sejtek megkülönböztetése szükséges, melyhez az alkalmazott sejtvonalak endogén módosítása szükséges (2. táblázat).

A gasztruloidok hiányosságainak kiküszöbölésére, illetve speciális kérdések megválaszolására már több módosított gasztruloid modellt is létrehoztak. Léteznek olyan gasztruloidok, melyekben különböző citokinek segítségével képesek voltak indukálni az anterior régió kialakulását (Suppinger és mtsai. 2023), vagy a kardiális differenciációt (Argiro és mtsai. 2024; Rossi és mtsai. 2021). Érdekes módon nemrégiben két egymástól független tanulmány a gasztruloid modellek továbbfejlesztésével kapcsolatban ugyanarra a konklúzióra jutott. Észrevették, hogy egér gasztruloidok alacsony százaléku matrigélbe ágyazásával, bennük indukálni tudják a szomitogenezis és idegszövet struktúrák kialakulását (van den Brink és

mtsai. 2020; Veenvliet és mtsai. 2020). A matrigél nem más, mint egér szarkóma sejtekben termeltetett extracelluláris mátrix fehérjék keveréke, mely képes modellezni az *in vivo* extracelluláris teret és az abból érkező szignálokat. Mivel a matrigél biogél és nem ártalmas a sejtekre, számos biotechnológiai módszerben alkalmazzák (Kim és mtsai. 2022). Az egér embriókhoz hasonlóan a matrigélbe ágyazott gasztruloidokban szelvényezettség (somites) figyelhető meg, mely a gasztruloidok poszterior irányú növekedéskor ritmikusan alakul ki, és meghatározott anterior-poszterior polaritást mutat (van den Brink és mtsai. 2020; Veenvliet és mtsai. 2020). A matrigélbe ágyazott gasztruloidokban jól elkülöníthetők az embrióra emlékeztető szevényeket tartalmazó törzs, továbbá a kaudális mezoderma (korai NMP) és a neuromezodermális progenitor (késői NMP) sejteket tartalmazó farok (2. ábra D). Ugyanakkor a hagyományos gasztruloidokhoz hasonlóan nem képesek az embrió anterior részének, azaz a feji struktúrák kialakítására (Arias és mtsai. 2022). Ennek fő oka mindkét esetben az extraembrionális szövetekből (pl. placentából) érkező szignálok hiánya. A kérdés azonban megoldódott az ún. szintetikus embriók (sEmbryos) megjelenésével. A szintetikus embriók létrehozásához a pluripotens őssejteket együtt aggregáltatják vagy az extraembrionális sejtekkel (Xu és mtsai. 2021), vagy olyan endogén módosításon átesett (Dox indukált *Gata4* és *Cdx2* gén tartalmazó) pluripotens őssejtekkel, melyek képesek átvenni az extraembrionális struktúrák szerepét (Amadei és mtsai. 2022; Tarazi és mtsai. 2022).

Habár a gasztruloidok és a szintetikus embriók kiváló modellt jelentenek a korai embrionális fejlődés tanulmányozására és új vagy már meglévő gyógyszerek tesztelésére (Amadei és mtsai. 2022), mint minden modellnek ezeknek is vannak korlátai. Az ilyen típusú 3D-s modellek minden esetben citokinek hozzáadását igénylik. A hagyományos és a szevényekkel rendelkező gasztruloidok esetében CHIR-t adnak a sejtekhez, míg a komplexebb modellek esetében ehhez további citokinek társulnak (Amadei és mtsai. 2022; Tarazi és mtsai. 2022; Xu és mtsai. 2021). A citokineken keresztül különböző jelátviteli útvonalak aktiválása vagy gátlása menekítheti a szignalizációs folyamatokban részt vevő gének fenotípusát, és megakadályozhatja azok teljes fejlődésbiológiai szerepének vizsgálatát.

2.5. A mezoderma kialakulás és a kardiális elköteleződés nyomon követése marker gének segítségével

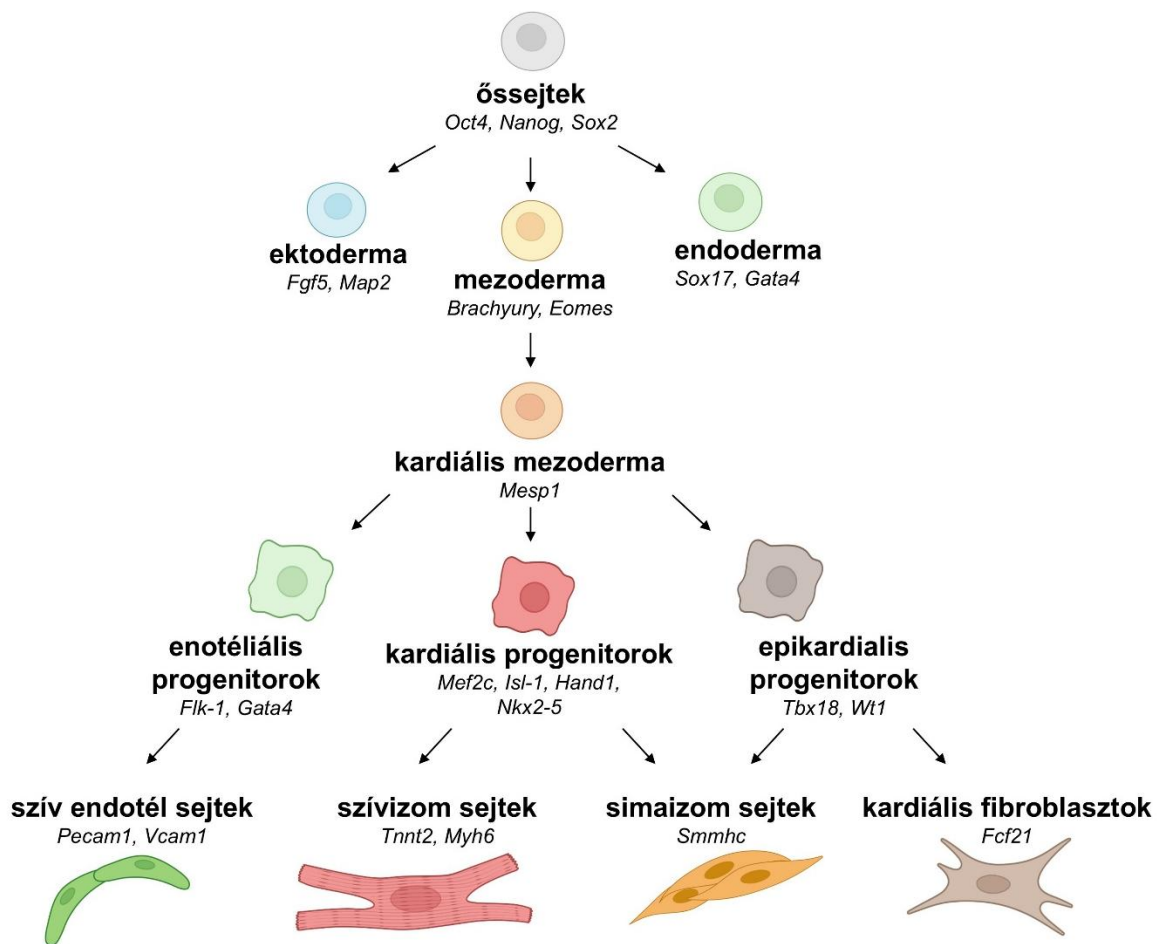
Az embrionális fejlődés során ahhoz, hogy egy pluripotens őssejt képes legyen a szív sejtípusainak kialakítására, először különböző progenitor stádiumokon kell végighaladnia. Az *in vitro* differenciációs modellekben az élő szervezethez hasonló progenitor sejtek figyelhetők

meg, melyek fejlődés és stádium specifikus marker gének ill. fehérjék segítségével követhetők nyomon (Forough, Scarcello, és Perkins 2011; Wu, Chien, és Mummery 2008). A kardiális differenciáció tanulmányozására PhD munkám során olyan a korai fejlődésben fontos szerepet betöltő transzkripciós faktorok és strukturális fehérjék expresszióját vizsgáltuk, amelyek a progenitor sejtpopulációkra specifikus kifejeződést mutatnak. A legtöbb ilyen korai transzkripciós faktor evolúciósan nagyfokú konzerváltságot mutat. DNS-hez kötődve elősegítik vagy gátolják egy-egy kardiális sejttípus kialakítását.

A mezodermális elköteleződés vizsgálatához használt legkorábbi marker gének a T-box transzkripciós faktorok családjába tartozó *Brachyury* és *Eomes* (3. ábra). Kimutatták, hogy a BRACHYURY és az EOMES képes kötődni és gátolni a pluripotencia fenntartásához szükséges gének, többek között az *Oct4* (*Pou5f1*, POU Class 5 Homeobox 1), *Nanog* (Nanog Homeobox) és *Sox2* (SRY-Box Transcription Factor 2), expresszióját (Tosic és mtsai. 2019). A pluripotencia gátlása a sejtek őssejtes állapotából való kilépését és a mezoderma kialakulását eredményezi. A kardiális differenciáció során a *Brachyury* és az *Eomes* a mezodermális sejtekben termelődik, majd a differenciáció előrehaladtával expressziójuk megszűnik (Wilkinson és mtsai. 1990).

Kimutatták, hogy mind a BRACHYURY, mind pedig az EOMES képes aktiválni a legkorábbi kardiális mezoderma marker gén, a *Mesp1* (Mesoderm posterior 1) expresszióját (3. ábra) (Saga és 1996; David et al., 2011). A MESP1 egy helix-loop-helix transzkripciós faktor, ami fontos szerepet játszik a szív- és érrendszer kialakulásában. A *Mesp1*-ra mezodermális génekhez hasonlóan szűk expressziós ablak jellemző. A MESP1 fehérje rövid jelenléte alatt képes több kardiális transzkripciós faktor pl. *Mef2c* (Myocyte-specific enhancer factor 2C), *Hand1* (Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 1), *Isl-1* (Insulin Gene Enhancer Protein ISL-1) és *Nkx2-5* (Homeobox Protein Nkx-2.5) expresszióját indukálni (Saga és mtsai.1996; Bondue és mtsai. 2008), melyek a kardiális progenitor sejtek azonosítására is alkalmasak (3. ábra).

Ezenfelül olyan fontos endotéliális progenitor gének termelődését is aktiválja, mint pl. a GATA transzkripciós faktorok családjába tartozó *Gata4* (GATA Binding Protein 4). A *Gata4* az egér embrionális fejlődés során először az endodermális rétegekben (primitív-, viscerális és definitív endodermában) termelődik, majd a gasztrulációt követően expressziója a fejlődő embrió szív endotél sejteire korlátozódik (Heikinheimo és mtsai. 1994).



3. ábra: A kardiális elköteleződés progenitor stádiumai és a stádiumnak megfelelő marker gének

A különböző kardiális sejttípusok pl. szív endotél, szívizom, simaizom és kardiális fibroblaszt sejtek és a köztes progenitor sejtek kialakulása nyomon követhető stádium specifikus markergének segítségével.

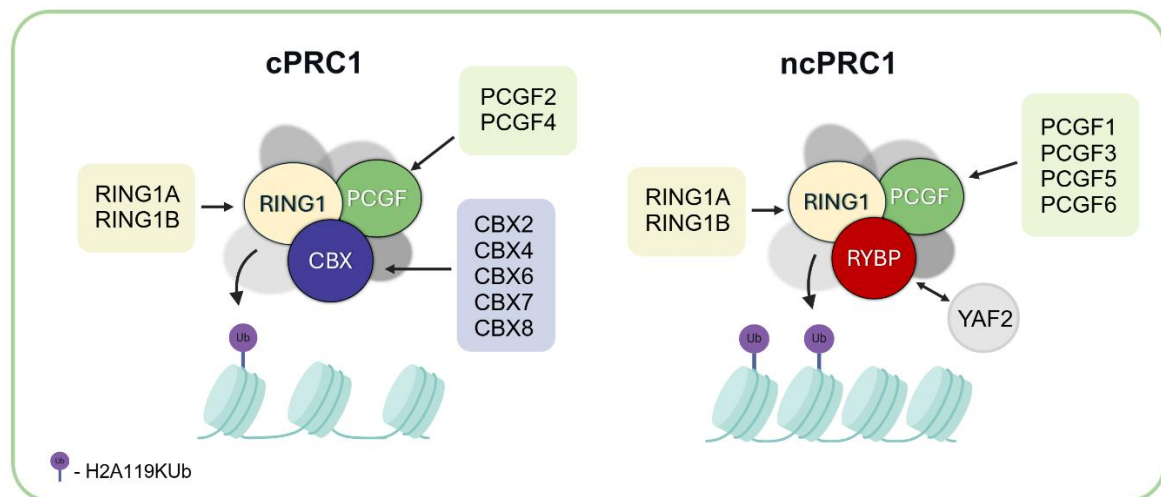
Ezért a *Gata4*-et a korai embrionális fejlődésben endoderma markerként és a differenciáció későbbi stádiumaiban szív endotél markerként is használják (3. ábra). A GATA4 fontos szerepét leírták (Heikinheimo és mtsai. 1994) a szív fejlődés során szívbélhártya (endocardium) és koszorúérrendszer endotél sejtjeinek kialakításában (Crispino és mtsai. 2001; Rivera-Feliciano és mtsai. 2006; Zhou és mtsai. 2022). Az endotél progenitor sejtek jelölésére a *Gata4* mellett gyakran használják még a *Flk-1*-et (*Kdr*, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (*Vegfr*)) is, ami az endotéliális sejtekben a VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) növekedési faktor receptoraként funkcionál (Yamaguchi és mtsai. 1993).

A progenitor stádiumokon áthaladva végül létrejönnek a szív érett sejtípusai. A szív- és simaizom sejtek esetében a marker gének lehetnek a szarkomer felépítésében résztvevő strukturális fehérjék. A szívizomsejtekben ilyenek pl. a *Tnnt2* (Cardiac Troponin T2) vékony, és a *Myh6* (Myosin Heavy Chain 6) vastag filamentum marker gének (Morimoto 2008), ill. a simaizomban a miozin lánchoz tartozó *Smmhc* (Smooth Muscle Myosin Heavy Chain 11) (Tsuchio és mtsai. 2000). Az érett sejtípusok jelölésére használhatunk még sejtadhéziós fehérjéket is, pl. kardiális endotél sejtek esetében gyakran alkalmazzák a *Pecam1* (Platelet endothelial cell adhesion molecule 1, CD31) és *Vcam1* (Vascular cell adhesion protein 1) markergéneket (3. ábra) (McCormick és mtsai. 2015; Pickett és mtsai. 2023).

2.6. Az RYBP és a Polikomb represszív komplexek szerepe a korai embrionális fejlődésben és a kardiális elköteleződésben

A transzkripciós faktorok mellett az embrionális fejlődés szabályozásában fontos funkciót töltenek be a Polikomb csoport fehérjék (PcG, Polycomb group proteins) (Gould 1997). A PcG fehérjék komplexeket alkotva epigenetikai módosításokon keresztül képesek a génexpresszió aktiválására és gátlására. Összetételük alapján, két fő csoportot különböztetünk meg a Polikomb Represszív Komplexek 1-t (PRC1) és Polikomb Represszív Komplexek 2-t (PRC2). Mindkét csoportnak van egy állandó fehérjéből álló központi része, melyhez változó fehérje alegységek csatlakozhatnak, lehetővé téve a gének stádium és szövetspecifikus szabályozását (Gao és mtsai. 2012). A PRC1 komplexeket központi alegységeik alapján feloszthatjuk kanonikus és a nem kanonikus Polikomb Represszív Komplexekre (cPRC1 és ncPRC1). A kanonikus PRC1 komplexek központi része egy RING1 (Ring Finger Protein 1), egy PCGF (Polycomb Group Ring Finger) és egy CBX (Chromobox) fehérjéből épül fel. Míg a nem kanonikus PRC1 komplexek CBX fehérjék helyett RYBP-t (RING1 and YY1 Binding Protein) vagy YAF2-t (YY1 Associated Factor 2) tartalmaznak (4. ábra) (Vidal 2019). A RING1 fehérjék a PRC1 komplexek katalitikus alegységei, melyek E3 ubikvitin ligáz aktivitással rendelkeznek és képesek a H2A hiszton 119. lizinjének ubikvitinálására (H2AK119ub1) (de Napoles és mtsai. 2004). A PRC1 komplexekben a RING1 fehérjéből jelen lehet a RING1A vagy a RING1B (RNF2 (Ring Finger Protein 2)), melyek egy ring finger motívumon keresztül kötődnek a PCGF fehérjékhez. A PRC1 komplexekben hat PCGF-et különböztetünk meg (Geng és Gao 2020). A PCGF2 és PCGF4 a kanonikus, míg a PCGF1, PCGF3, PCGF5 és PCGF6 a nem kanonikus PRC1-ek tagja (4. ábra). A CBX fehérjék (CBX2, CBX4, CBX6, CBX7, CBX8) kromodoménjükön keresztül képesek kapcsolódni a metilált hiszton

fehérjékhez (H3K27me₃), ami biztosítja a kanonikus PRC1 komplexek kromatinhoz való rögzítését (Connelly és Dykhuizen 2017). A nem kanonikus PRC1 komplexekben azonban a CBX fehérjék helyett RYBP vagy YAF2 van, melyek nem rendelkeznek kromodoménnel, így ezekben a komplexekben az RYBP és a YAF2 mellett további kromatin vagy DNS-kötő transzkripció faktorok toborzása is szükséges (Liu és mtsai. 2023).



4. ábra: A Polikomb Represszív Komplex 1-ek (PRC1s) felépítése

A kanonikus (cPRC1) és a nem kanonikus PRC1 (ncPRC1) komplexek sematikus ábrázolása a központi komplementagok feltüntetésével. RING1: Ring Finger Protein 1, PCGF: Polycomb Group Ring Finger, CBX: Chromobox protein, RYBP: RING1 and YY1 Binding Protein, YAF2: YY1 Associated Factor 2, H2A119Ub: H2A hiszton 119. lizin ubikvitináció.

A PhD munkám során az RYBP, másnéven DEDAF (Death Effector Domain (DED)-Associated Factor), szerepét vizsgáltuk a mezoderma kialakításában és a korai kardiális elköteleződésben. Az RYBP az ncPRC1 központi tagjaként fontos feladatot lát el olyan biológiai folyamatokban, mint pl. a pluripotencia fenntartása, differenciáció szabályozása és az embrionális fejlődés (Boyer és mtsai. 2006; Calés és mtsai. 2016; Simon és Kingston 2013). Csoportunk korábban közölte, hogy az RYBP polikomb függő módon képes represszálni a *Pax6* gén termelődését, ezáltal képes szabályozni a neurális elköteleződést (Sutus és mtsai. 2022). Habár az RYBP leginkább ncPRC1 komplexek tagjaként karakterizált, emellett Polycomb független funkciói is ismertek. Az OCT4 pluripotencia faktorról ill. az E2F és YY1 transzkripció faktorokkal együttműködve képes aktiválni különböző gének expresszióját (Li

és mtsai. 2017; Schlisio és mtsai. 2002). Ezenfelül az RYBP fontos szerepet tölt be a sejtsorsok kialakításában pl. RYBP hiányában a vérsejtek differenciációja során a B1/B2 progenitorok aránya eltolódik, ami szintén egy polikomb független mechanizmuson keresztül valósul meg (Calés és mtsai. 2016).

Csoportunk korábban kimutatta, hogy az RYBP nélkülözhetetlen a kardiomiociták fejlődéséhez. *In vitro* egér őssejteket differenciáltatva RYBP hiányában, a vad típussal ellentétben, nem alakulnak ki dobogó szívizom telepek (Ujhelly és mtsai. 2015). Továbbá a szarkomerek felépítésében szerepet játszó fehérjék termelődése is zavart szenved (Henry és mtsai. 2020). Kimutattuk, hogy a *PLAGL1* kardiális transzkripció faktor elvesztése legalább részben hozzájárulhat a megfigyelt fenotípushoz. Vad típusú sejtekben az RYBP az NKX2-5 kardiális progenitorral együtt képes aktiválni a *Plagl1* P1 és P3 promóterét, ami az RYBP egy ncPRC1 független mechanizmusán keresztül valósult meg (Henry és mtsai. 2023). Azonban az RYBP az NKX2-5-el való kölcsönhatása nem adott választ a teljes fenotípusra. Előzetes eredményeink azt mutatták, hogy az NKX2-5 megjelenésétől korábbi gének expressziója is sérül, ami az RYBP az NKX2-5-nél korábbi szerepére utal. Ezt megerősíti, hogy az egér korai fejlődése során az embrionális szövetekben kiterjedt *Rybp* expresszió figyelhető meg, továbbá az *Rybp* null mutáns egerek még a gasztruláció előtt (E5,5 - E6) beágyazódási letalitást mutatnak (Pirity és mtsai. 2005). Mindezek arra utalnak, hogy az RYBP szabályozó funkcióját valószínűleg már a korai kardiális progenitor stádiumban, vagy még annál is korábban, a gasztruláció alatt fejt ki.

3. Célkitűzések

A PhD munkám során az RYBP mezoderma kialakulásában és axiális megnyúlásban betöltött szerepét vizsgáltam egér embrionális őssejt alapú 2D-s és 3D-s modell rendszerekben.

Előzetes eredményeink azt mutatták, hogy *Rybp* null mutáns kardiális kolóniákban nem alakulnak ki dobogó szívizomtelepek, továbbá a szarkomerek felépítésében résztvevő fehérjék termelődése is zavart szenved. Kísérleteinkkel választ szerettünk volna találni arra a kérdésre, hogy *in vitro* kardiális elköteleződés során mi az a legkorábbi progenitor állapot, melyhez az RYBP szabályozása szükséges. Ezenfelül célunk volt azonosítani és jellemezni olyan korai transzkripciós faktort/faktorokat, mellyel az RYBP képes szabályozni a kardiális sejtvonalak elköteleződését.

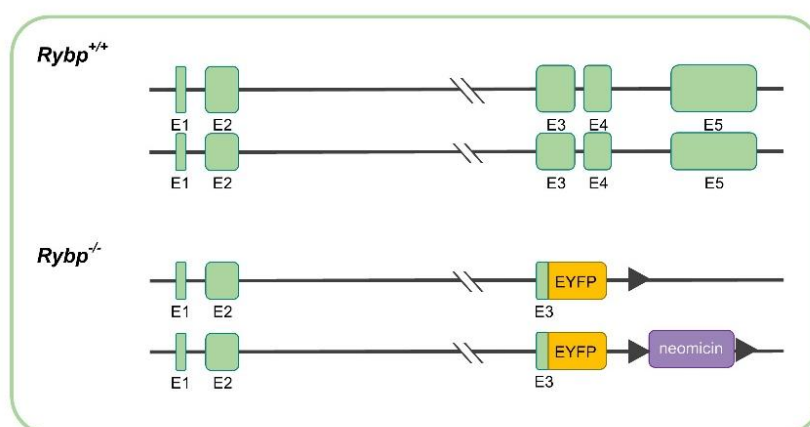
A PhD munkám során az alábbi célokat tűztük ki:

1. Megvizsgálni, hogy a szívizomsejteken kívül van-e más kardiális sejtípus 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.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Alkalmazott sejtvonalak és tenyésztési körülmények

Az *in vitro* differenciációkhoz R1 vad típusú (*Rybp*^{+/+} vagy vad típus) (Nagy és mtsai. 1993), és az *Rybp* génre nézve null mutáns D11 (*Rybp*^{-/-} vagy null mutáns) egér embrionális őssejtvonalakat használtunk (5. ábra) (Pirity és mtsai. 2005). Az őssejteket egér fibroblaszt sejtrétegre (MEF) növesztettük, melyeket előzetesen sejtosztódást gátló mitomycin C (Mitomycin C; Sigma, Kat.: M0503) kezelésnek vetettünk alá, ezt követően a sejteket 0.1%-os zselatinnal (Sigma, Kat.: G-9391) bevont sejttenyésztő csészékben növesztettük. Az őssejteket DMEM (DMEM (1x) + Gluta MAX^{TM-1} Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Kat.: 31966047) médiumban tartottuk fenn melyhez 15% FBS (Fetal Bovine Serum, HyClone, Kat.: SH30071.03E), 0.1 mM nem esszenciális aminosavakat (MEM Non-Essential Amino Acids, Gibco, Kat.: 11140-068), 0.1 mM β-merkaptóetanolt (2-Mercaptoethanol, Gibco, Kat.: 31350-010), 1% nátrium-piruvátot (Sodium Pyruvate (100mM) (100x), Gibco, Kat.: No 11360-039), 1% glutamint (L-Glutamine (200 mM) Gibco, Kat.: 25030-024), 50 U/ml penicillin/sztreptomycin antibiotikumot (Penicillin/ Streptomycin (100x), Gibco, Kat.: 15140-122) és 100 U/ml s leukémia- gátló faktort (ESGRO Recombinant Mouse LIF Protein, Merck Milipore, Kat.: ESG1107) adtunk.



5. ábra: Az *Rybp* gén struktúrája a vad típusú és az *Rybp* null mutáns őssejtvonalakban

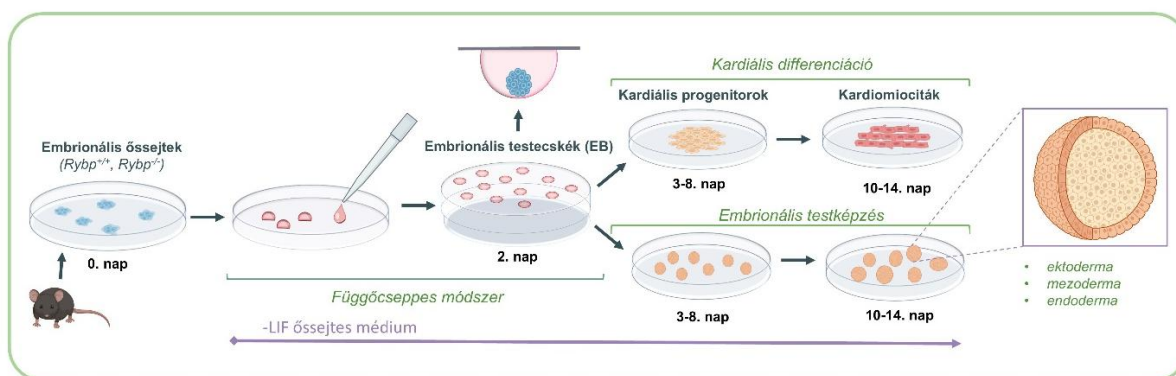
Az *Rybp* gén lokuszának sematikus ábrázolása (A) vad típusú (*Rybp*^{+/+}) és *Rybp* null mutáns (*Rybp*^{-/-}) őssejtekbe (Pirity és mtsai. 2005). E: exon, EYFP: Sárga fluoreszcens fehérje, ►: *loxP* hely.

Az őssejteket 5% CO₂ mellett 37 °C-on, inkubátorban (Contherm Mitre Series 4000) tartottuk, a sejteken naponta cseréltünk médiumot és a tenyészeteket kétnaponta passzáltuk ügyelve arra, hogy a kolóniák konfluenciája ne haladja meg a 70%-ot.

A fehérje-fehérje kölcsönhatási vizsgálatához HEK293T sejteket (Human Embryonic Kidney (HEK) 293T) használtunk. HEK293T sejteket DMEM (Dulbecco's modified eagle's mediumban, Gibco, Kat.: 31966047) médiumban növesztettük, melyhez 10% FBS (PanBiotech Kat.: 3702), 0.1mM nem esszenciális aminosavakat (MEM Non-Essential Amino Acids (100x), GIBCO, Kat.: 11140-068), 1% nátrium-piruvátot (Sodium Pyruvate (100 mM), Gibco, Kat.: 11360-039) és 50 U/ml penicillin/sztreptomicint (Penicillin/Streptomycin (100x), GIBCO, Kat.: 15140-122) adtunk. A HEK293T sejteket szintén 37 °C-os inkubátorban neveltük 5% CO₂ mellett. A sejteken kétnaponta cseréltünk médiumot és a tenyészeteket 2-3 naponta passzáltuk ügyelve arra, hogy a kolóniák konfluenciája ne haladja meg a 90%-ot.

4.2. *In vitro* embrionális testképzés és kardiális differenciáció

Az *in vitro* embrionális testképzéshez és kardiális differenciációhoz Keller csoportja által leírt függőcseppekes módszert (Keller 1995) alkalmaztuk. A módszer során az egér őssejtekből 0.05% tripszin (Trypsin-EDTA (1x) 0,05%, GIBCO, Kat.: 15400-054) segítségével sejtszuspenziót készítettünk, majd Bürker-kamrával meghatároztuk a sejtszámot. Ezt követően a sejteket LIF mentes őssejtes médiummal 50 sejt/ μ l sűrűsége hígítottuk (lásd: Anyagok és módszerek 4.1.) és 10 ml PBS-t tartalmazó bakteriális csészék tetejére (100 mm, Kat.: 633181) 20 μ l-es cseppeket helyeztünk. A tetőt megfordítva, a cseppek alján gravitáció hatására összegyűlt hozzátételegesen 1000 sejt ún. embrionális testeket (Embryoid body, EB) formál. Az így létrehozott embrionális testeket ezután eltérő körülmények között differenciáltattuk tovább. A fő csíralemezek vizsgálatához a sejteket a második napon letapadását gátló bakteriális csészében háromdimenziós tenyészetben növesztettük tovább, míg a kardiális differenciációhoz a sejteket 0.1%-os zselatinnal bevont sejtenyésző csészékben (60 mm, SPL Life Sciences, Kat.: 20060) tapasztottuk le (6. ábra). Mindkét esetben a sejteket LIF mentes őssejtes médiumban 14 napig növesztettük, a médiumot kétnaponta cseréltük. További vizsgálatok céljából a differenciációk meghatározott időpontjaiban mintát gyűjtöttünk. A kardiális differenciáció során a 0. nap az őssejtes állapotot, a 2. nap az embrionális testképzést, a 3-8. nap a kardiális progenitor sejteket, míg a 10.-14. nap az érett szívmuscletelepeket reprezentálja.

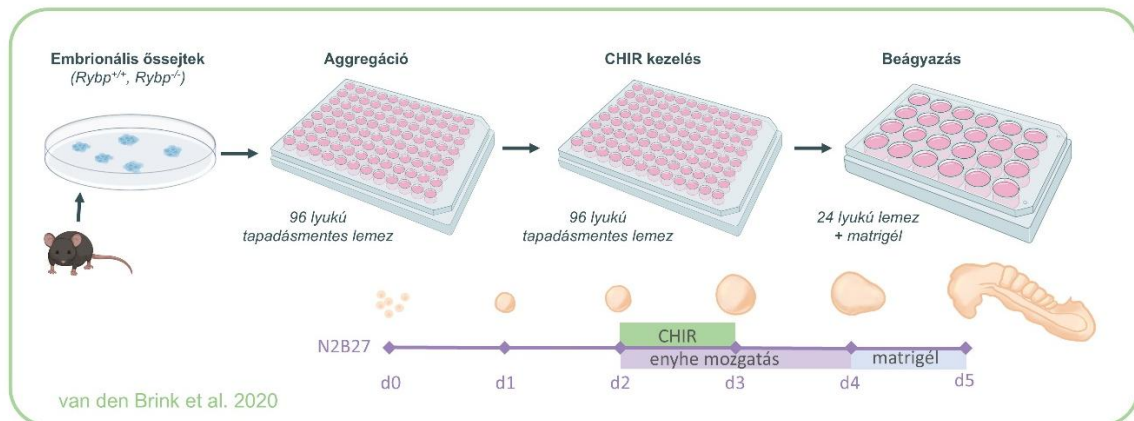


6. ábra: Az in vitro szív irányú differenciáció és EB képzés lépései

Az in vitro kardiális differenciáció és EB képzés során az őssejteket függőcseppes módszer segítségével aggregáltattuk, majd a differenciáció 2. napján az EB-eket a kardiális differenciációhoz letapasztottuk, míg a 3D-s vizsgálataikhoz szuszpenzióban növesztettük tovább. LIF: Leukemia Inhibitory Factor; EB: embrionális testek (embryoid bodies)

4.3. In vitro gasztruloidok létrehozása

A gasztruloidok létrehozásához a van den Brink és társai által 2020-ban publikált módszert alkalmaztuk (7. ábra) (van den Brink és mtsai. 2020). A vad típusú és *Rybp*^{-/-} őssejteket N2B27 tápoldatba vettük fel, majd 96 lyukú „U” aljú tapadásmentes lemezek (Corning, Kat.: 7007) alján 300-300 sejtet aggregáltattunk. A mezoderma és az axiális megnyúlás indukálásához a mintákat a differenciáció második napján 24 órás 3 μ M CHIR90021 (CHIR) (Selleck Chemicals, Kat.: S1263) kezelésnek vetettük alá. A kezelés után a CHIR-t tartalmazó médiumot lecseréltük N2B27 médiumra. A 2. naptól a 4. napig a mintákat enyhe rázatás mellett neveltük, ezzel is gátolva a növekvő gasztruloidok letapadását. A 4. napon a gasztruloidokat 24 lyukú sejtenyészítő lemezekbe gyűjtöttük (Corning, Kat.: 3524) és 10% matrigél (Corning, Kat.: 356230) és 90% N2B27 médium keverékébe ágyaztuk. A matrigél a sejtek számára biztosítja a megfelelő extracelluláris közeget, és képes modellezni az implantációt, ezzel elősegítve a gasztruloidok szomitogenezisét. A mintákat immuncitokémiai analízishez a differenciáció különböző időpontjaiban (d3, d4, d5) 4%-os paraformaldehiddel (PFA, Sigma, Kat.: 158127) fixáltuk. A gasztruloidok immuncitokémiai analízését pedig a 4.5. fejezetben leírtak alapján végeztük.



7. ábra: A gasztruloid képzés sematikus ábrázolása

Az őssejteket 96 lyukú tapadásmentes lemezben aggregáltattuk és 24 órás CHIR kezelésnek vetettük alá majd differenciáció 4. napján a gasztruloidokat 10%-os matrigélbe ágyaztuk. N2B27: Szérum mentes neurális differenciációs médium, d: nap, CHIR: CHIR99021

4.4. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

A relatív génexpressziós vizsgálatokhoz qRT-PCR-t alkalmaztunk. A csíralemez marker gének elemzéséhez sejtlizátumot az *in vitro* kardiális differenciáció (lásd: Anyagok és módszerek 4.2.) 2. napjától a 8. napig naponként gyűjtöttük, a lizátumokból total RNS izolálást végeztünk a gyártó által mellékelt leírás alapján (GeneJET RNA PurificationKit, Thermo Scientific, Kat.: K0732). Az izolált RNS-ek koncentrációját spektrofotométerrel (WPA Photometer UV 110) határoztuk meg, majd az RNS mintákból 2 μ g-ot reverz transzkripció segítségével a gyártó által megadott protokoll szerint cDNS-é írtuk át (Applied Biosystems High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Invitrogen Life Technologies, Kat.: 4368814). A qRT-PCR reakciókat Rotor Gene Q készülékben végeztük SYBER Green módszer segítségével a gyártó utasításait követve (SYBR Select Master Mix for CFX, Applied Biosystems, Kat.: 4472942). A relatív génexpressziós változásokat $\Delta\Delta C_t$ módszer segítségével határoztuk meg. A C_t értékeket a *Hprt* (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase) háztartási gén kifejezéséhez és a vad típusú őssejtes állapothoz (0. nap) normalizáltuk. Az alkalmazott primereket a 3. táblázatban tüntettük fel.

Gén név	Forward primerek	Reverz primerek
<i>Brachyury</i>	TACACCTCTAATGTCTCCCTTG	CCATACAGTTGACTTCCCAACAC
<i>Eomes</i>	ACCGCCCACTACAATGTTTT	TGCCCTGCATGTTATTGTCC
<i>Fgf5</i>	CAAAGTCAATGGCTCCCACGAAG	CTACAATCCCCTGAGACACAGCAAATA
<i>Flk-1</i>	TGTGTTTCCTTAGATCGCGC	CAAAGAAGTCACAGAGGCGG
<i>Gata4</i>	CTCTATCACAAGATGAACGGCATCAAC	TCTGGCAGTTGGCACAGGAGAG
<i>Hand1</i>	CCAAGGATGCACAAGCAGGTGAC	TGCGCCCTTTAATCCTCTTCTCG
<i>Hprt</i>	AGTCCCAGCGTCGTGATTAG	GCAAGTCTTTCAGTCTGTCC
<i>Isl-1</i>	GGGATGGGAAAACCTACTGTAAAAGAGA	GTCGTTCTTGCTGAAGCCTATGCTG
<i>Map2</i>	AAAGAGAACGGGATCAACGG	TTGTGTTGGGCTTCCTTCTC
<i>Mef2c</i>	GGTGCTGACGGGAACAACCTT	CACTTCTTCACTGCCACAGC
<i>Mesp1</i>	GATCCCCGCCTGCCTA	CTGAAGAGCGGAGATGAGG
<i>Nkx2.5</i>	TACACCTCTAATGTCTCCCTTG	CCATACAGTTGACTTCCCAACAC
<i>Pecam1</i>	CATGGGAGGTGATGAATGGG	TGCATTGTACTTCCCGGAG
<i>Sox17</i>	GCCAAAGACGAACGCAAGCG	TTCTCTGCCAAGGTCAACGCCT
<i>Vcam1</i>	TTCTGGGGCAGGAAGTTAGA	CAATTAAGGTGAGGGTGGCA

3. táblázat: Az alkalmazott qRT-PCR primer szekvenciák listája

4.5. Immuncitokémia (ICC)

Az immuncitokémiai vizsgálatokhoz a kardiális tenyészeteket üveg fedőlemezen növesztettük 24 lyukú sejtenyésző csészékben (24 well Tissue Culture Testplate, SPL Life Sciences, Kat.: 30024), míg az embrionális testeket és gastruloidokat 500 µl-es Eppendorf csövekbe gyűjtöttük majd két PBS (Dulbecco's PBS Ca²⁺Mg²⁺ (1x), Gibco, Kat.: 14190-094) mosást követően 4% paraformaldehiddel (PFA, Sigma, Kat.: 158127) 20 percig fixáltuk és a festésig PBS-ben tároltuk. A mintákat PBS-ben oldott 0.2%-os Triton X-100-el (Triton X-100, Sigma, Kat.: T8787) 20 percig permeabilizáltuk, majd 5%-os szarvasmarha szérumalbuminban (BSA) enyhe mozgatás mellett 1 órán keresztül blokkoltuk. A sejteket elsődleges antitesttel (4. táblázat) egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. Másnap a mintákat 5x 10 percig PBS-ben mostuk majd 1 órán keresztül BSA-ban blokkoltuk, amit 1 órás fluoreszcensen jelölt másodlagos antitest inkubálás követett (5. táblázat). Ezután a mintákat 3x 10 percig PBS-ben mostuk, majd 20 percig inkubáltuk DAPI interkaláló festéket tartalmazó PBS-ben (Vector Laboratories, Kat.: H-1200, hígítás: 1:2500). A mintákat újra PBS-ben mostuk 2x 10 percen keresztül majd Fluoromount-G (Invitrogen, Kat.: 00-4958-02) segítségével tárgylemezre rögzítettük. A mintákról a mikroszkópos felvételeket Olympus LSM konfokális mikroszkóp segítségével készítettünk (Olympus Corporation, Japán).

Ellenanyag	Gyártó	Katalógus szám	Hígítás	Kísérlet
Anti-DEDAF antibody	Merck Millipore	AB3637	1:2000	ICC, FC
Anti- Human/Mouse Brachyury antibody	R&D Systems	AF2085	1:1000	ICC, FC, WB
Anti-MESP1 antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-130461	1:1000	WB
Anti-GATA4 antibody	Thermo-Fisher	14-9980-82	1:1000	ICC, FC
Anti- ISLET1 antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-390793	1:1000	WB
Anti-PECAM1 antibody	DSHB	P2B1-c	1:10	ICC
Anti- CD31 antibody	Invitrogen	PA5-32321	1:1000	ICC
Anti- VIMENTIN antibody	DSHB	40E-C	1:1000	ICC
Anti- ZAC1 antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-166944	1:1000	ICC
Anti-TNNT2	Abcam	ab8295	1:1000	ICC
Anti-neurofilament	DSHB	2H3	1:1000	ICC
Anti- SMMHC antibody	DSHB	Na8-s	1:50	ICC
Anti- PLAGL1 antibody (C-7)	Santa Cruz Biotechnology	sc-166944	1:2000	ICC
Anti-OCT-3/4 antibody (C-10)	Santa Cruz Biotechnology	sc-5279	1:100	ICC
Anti-GAPDH antibody	Bio-Rad Laboratories	AHP1628T	1:1000	WB

4. táblázat: A disszertációban felhasznált elsődleges ellenanyagok listája

ICC: Immuncitokémia, FC: Flow cytometry (áramlási citometria), WB: Western blot

Ellenanyag	Gyártó	Katalógus szám	Hígítás	Kísérlet
Anti- Mouse Goat HRP IgG Secondary Antibody	Bio-Rad Laboratories	1721011	1:2000	WB
Anti Rabbit Goat HRP IgG Secondary Antibody	Merck Millipore	AP132P	1:2000	WB
Donkey anti-Goat IgG Secondary Antibody	Invitrogen	A15999	1:2000	WB
Alexa Fluor 488 Donkey anti-Rabbit	Invitrogen	A21206	1:2000	ICC, FC
Alexa Fluor 647 Donkey anti-Mouse	Invitrogen	A31571	1:2000	ICC, FC
Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse	Life Technologies	A10667	1:2000	ICC
Alexa Fluor 647 Goat anti-Rabbit	Invitrogen	A21244	1:2000	ICC, FC
Alexa Fluor 488 Donkey anti-Rat	Invitrogen	A21208	1:2000	ICC, FC
Alexa Fluor 568 Donkey anti-Rabbit	Invitrogen	A10042	1:2000	ICC

5. táblázat: A disszertációban felhasznált másodlagos ellenanyagok listája

ICC: Immuncitokémia, FC: Flow cytometry (áramlási citometria), WB: Western blot

4.6. Áramlási citometria (FC)

A differenciáció során a vizsgált időpontokban az embrionális testekből és kardiális tenyészetekből 1x Tripszin-EDTA segítségével egysejtes szuszpenziót képeztünk, és a sejteket PBS mosást követően 20 percen keresztül 70%-os etanollal fixáltuk. A fixált sejteket 0,5% BSA tartalmú mosó pufferrel mostuk, majd elsődleges antitestet (4. táblázat) tartalmazó hígító pufferben (hígító puffer: 0,5% BSA és 0,5% Tween 20 (Sigma Tween 20, Kat.: P9416-100ML) 24 órán keresztül inkubáltuk. Másnap a sejteket 0,5% BSA-val mostuk és 20 percig inkubáltuk másodlagos antitestet (5. táblázat) tartalmazó hígító pufferben. A sejtek fluoreszcencia jelét ismételt mosást követően CytoFLEX áramlási citométerrel (Beckman Coulter, Inc.) mértük majd a mért értékeket BD CytExpert 2.4 programmal analizáltuk. A mérések során 3 technikai párhuzamossal dolgoztunk, és eredményeinket a csak másodlagos antitestet tartalmazó kontrollokra normalizáltuk. Az áramlási citometriákból 3 biológia minta készült, a dolgozatban a reprezentatív ábrát tüntettük fel.

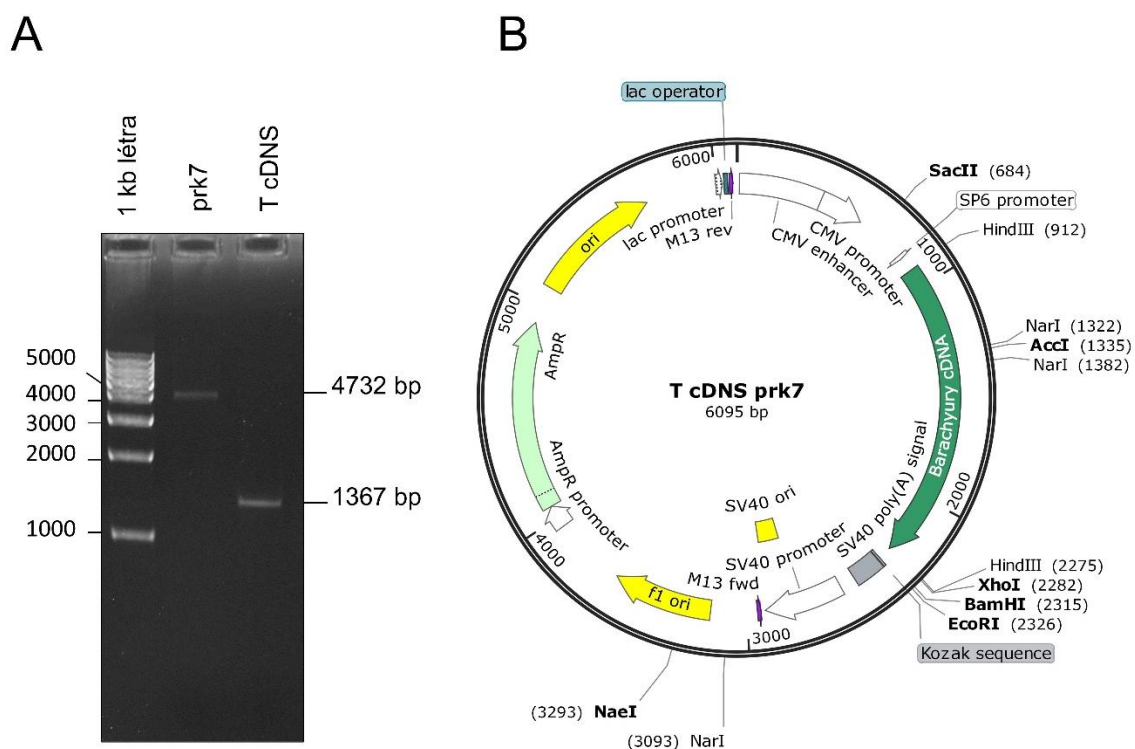
4.7. Western blot analízis

A kardiális differenciáció során a vizsgált időpontokban a sejteket RIPA pufferrel (150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% DOC, 0,1% SDS, 50mM Tris pH 7,4) feltártuk és teljes fehérje lizátumot gyűjtöttünk. A fehérjekoncentrációkat Bradford módszerrel határoztuk meg (Bradford 1976), és felhasználásig 6x Laemmli pufferben tároltuk (Laemmli 1970). A Western blot-hoz a fehérje mintákat 100 °C-on 10 percig forraltuk, majd mintánként 20 µg összfehérjét vittünk fel 12%-os SDS tartalmú poliakrilamid gélre. A fehérjéket gélelektroforézissel méret szerint elválasztottuk (Bio-Rad Mini-Protean® 3 cell, Kat.: 67S/11919), majd Polivinilidén-fluorid membránokra ((PVDF transfer membrane, Immobilon®-P, Millipore, Kat.: IPVH00010) vittük át. A membránokat 5%-os tejoldatban egy órán át blokkoltuk, majd elsődleges antitesteket tartalmazó (4. táblázat) 5%-os tejoldatban egy éjszakán keresztül hibridizáltuk. A következő napon a membránokat 5x 5 perc TBST mosást (20mM Tris Base (Kat.: T1503S), 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20 (Kat. P5927)) követően ismét egy órán keresztül blokkoltuk, majd a membránokat másodlagos antitestet (5. táblázat) tartalmazó tejoldatban egy órán keresztül inkubáltuk. 5x 5 perc TBST mosást követően a membránok felszínén hidrogén-peroxid és luminol 1:1 arányú keverékét oszlattuk szét (Immobilon Western, Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore, Kat.: WBKLS0500) és a keletkező kemilumineszcens jelről felvételeket készítettünk (Alliance Q9, UVITECH). A western blot képek intenzitását Image J-vel program segítségével kvantifikáltuk, a GAPDH belső kontrolhoz normalizáltuk és a vad típusú összeítes állapothoz (d0) képet ábrázoltuk.

4.8. Egysejtes RNS szekvenálási adatok (scRNA-Seq) újra elemzése

A 6,5-8,5 napos egér embriókból származó scRNS-Seq adatokat az ArrayExpress-ről töltöttük le (hozzáférési szám: E-MTAB-6967, fájl név: atlas_data.tar.gz). Az elemzést az RStudio (v.2024.04.02) program Seurat csomagjával (v.5.1.0) végeztük és az eredeti pipeline által generált metaadatokat használtuk fel (Pijuan-Sala és mtsai. 2019). Az adathalmot úgy szűrtük, hogy csak azokat a sejteket tartalmazza, melyek sejttípusa egyértelműen beazonosítható majd a Pijuan-Sala és munkatársai által azonosított klaszterezési koordináták és információk alapján reprodukáltuk az UMAP (uniform manifold approximation and projection) ábrát a Seurat csomag (v.5.1.0.) DimPlot függvényével. A 116 312 azonosított sejtet 37 klaszterbe soroltuk, és a további elemzéseket ennek megfelelően végeztük. Az oszlopdiagramot a korábban azonosított 37 klaszter *Rybp* és *Brachyury* pozitív sejteinek felhasználásával készítettük. A kétszeresen pozitív sejteket a 0-nál nagyobb normalizált expressziós érték alapján

osztályoztuk. A grafikon elkészítéséhez ggplot2-ot (v.3.5.1) használtunk. A markergének génexpressziós mintázatának elemzéséhez primitív csík és mezoderális klasztereket választottunk ki. Az átlagos génexpressziós értékeket a Seurat csomag (v.5.1.0) DotPlot függvényével elemeztük ki és a vizualizáláshoz ggplot2-ot (v.3.5.1) használtunk. Az scRNA-Seq adatok elemzése a Makrofág Polarizáció Csoporttal együttműködésben készült. A scRNA-Seq adatok kiértékelését és vizualizálását Dr. Czimmerer Zsolt, Benyhe-Kis Bernadett és Poscher Anna végezte.



8. ábra A *prk7*-*Brachyury* cDNA vektor létrehozása

(A) A gélképen 4732 bp *prk7* túltermeltető vektor (lineáris formában *HindIII* emésztés után) és a 1367 bp *Brachyury* cDNS látható ligálás előtt. (B) A *prk7*-*Brachyury* overexpressziós konstrukt sematikus ábrázolása.

4.9. A *prk7*-*Brachyury* túltermeltető konstrukt létrehozása

A *prk7*-*Brachyury* vektor létrehozásához első lépésként összejetek kardiális irányba differenciáltattuk (lásd: Anyagok és módszerek 4.2.), és a differenciáció 4. napján, mikor a

Brachyury mRNS szint a legmagasabb teljes RNS izolálást végeztünk. Az izolált RNS templárról PrimeSTAR GXL DNS-polimerázzal (Takara Bio, Kat.: R050Q) teljes hosszúságú *Brachyury* cDNS-t amplifikáltunk fel 5'-TATAAAGCTTTGTTGGGTAGGGAGGAGTC-AAGA-3' és 5'-TTTAAAGCTTATAGATGGGGGTGACACAGGT-3' HindIII restrikciós helyet tartalmazó primerek segítségével. A felamplifikált cDNS-t ezután 1%-os agaróz gélen (Sigma, Kat.: A4718-100G) futtattuk meg majd a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Kat.: 28706) segítségével a gyártó által megadott protokoll alapján tisztítottuk. Ezután a prk7 vektort és a *Brachyury* cDNS-t HindIII restrikciós enzimmal (New England Biolabs, Kat.: R3104T) hasítottuk majd a *Brachyury* cDNS-t T4 ligáz (New England Biolabs, Kat.: M0202S) enzim segítségével vektorba klónoztuk (8. ábra). A cDNS-konstrukció orientációját és szekvenciapontosságát a HindIII és NarI restrikciós emésztéssel és szekvenálással is ellenőriztük.

4.10. $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ transzfekció

A transzfekcióhoz HEK293 sejteket a megfelelő sejtszám eléréséig növesztettük (lásd: Anyagok és módszerek 4.1.), Bürker-kamra segítségével meghatároztuk a sejtszámot, majd 6 cm sejtenyésztő edényekbe csészénként $0,9 \times 10^6$ sejtet helyeztünk a transzfekciót megelőző napon. A sejteken 4 órával a transzfekció előtt tápoldatot cseréltünk. A transzfekciós reakció első lépésén a megfelelő plazmidokat TE (Tris-EDTA puffer (Tris Base, Kat.: T1503S; EDTA, Kat.: 40074-APO) pufferben $225 \mu\text{l}$ végtérfogatba hígítottuk, majd folyamatos rázogató mellett $25 \mu\text{l}$ 2,5 M CaCl_2 -ot (CaCl_2 , Sigma, Kat.: C-3881) adtunk hozzá. A reakcióhoz ezután cseppenként hozzáadtunk 2x Hepes pufferezt sóoldatot (HBS, Hepes buffer solution, Sigma, Kat.: H-3375). Ezt a lépést folyamatos buborékolatás mellett végeztük, így biztosítottuk a szükséges oxigént a reakcióhoz. 5 perc inkubálást követően a transzfekciós reakcióelegyből $300 \mu\text{l}$ -t adtunk a HEK293 sejtekhez. A transzfekciót követően 16 órával a sejteken tápoldatot cseréltünk majd 40 órával a transzfekció után a sejteket kétszer PBS-el mostuk és a mintákból teljes fehérje lizátumot gyűjtöttünk (Cell culture lysis 5X reagent, Promega, Kat.: E153A) és western blot segítségével vizsgáltuk (lásd: Anyagok és módszerek 4.7.).

4.11. Ko-immunprecipitáció (CoIP)

A HEK293 sejtekbe $5 \mu\text{g}$ prk7-*Brachyury* és pcDNA3.1-*Rybp*-FLAG (Stanton és mtsai. 2007) túltermeltető vektort vittünk be $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ tranziens transzfekcióval (lásd: Anyagok és

módszerek 4.10.). A transzfekció hatékonyságát EGFP-t túltermelő vektorral (pEGFP-N1 (NovoPro Bioscience, Kat.: V012021)) ellenőriztük. A mintákat két nappal a transzfekciót követően PBS-ben mostuk, majd a mintákhoz EB puffert adtunk (50mM HEPES (Merck, Kat.:1.12041), 150 mM NaCl (Sigma, Kat.:S-5886), 0.5 mM MgCl₂ (Roanal, Kat.:13007), 0,1% NP40 (Sigma-Aldrich, Kat.:74385), 5% glicerin (Sigma, Kat.:G-9012), 0.5 mM DTT (Thermo Scientific, Kat.:R0862), 1mM proteáz inhibitor koktél (Sigma, Kat.:S8830), 25 µM MG132 (Cayman, Kat.:CAYM10012628), 0,1 µl/ml benzonáz nukleáz (Merk-Millipore, Kat.:70746-3) és a mechanikus feltárást G26 tűn keresztüli szuszpendálással hajtottuk végre. A lizátumokat ezután 17000 g-n 4 °C-on 20 percig centrifugáltuk, hogy eltávolítsuk a keletkezett sejttörmeléket. A felülúszó 10%-át input kontrollként használtuk, míg a többi lizátumból ko-immunprecipitációt végeztünk. A CoIP-hez a lizátumokat anti-FLAG-M2 mágneses gyöngyökkel (Sigma-Aldrich, Kat.:M8823) 4°C-on 90 percig inkubáltuk. A precipitációt követően a kötött fehérjéket 200 µg/µl 3xFLAG peptiddel (Sigma-Aldrich, Kat.: F4799) kompetitív elúcióval választottuk el a gyöngyöktől. Az eluált fehérjékhez Laemmli puffert adtunk, majd western blot-ot végeztünk (lásd: Anyagok és módszerek 4.7.). A CoIP-kísérletekhez anti-BRACHYURY (R&D Systems, Kat.:AF2085, 1:1000) és anti-FLAG M2-IgG1-HRP (Sigma, Kat.: A8592, 1:4000) elsődleges antitesteket és donkey-anti-Goat IgG-HRP (Invitrogen, Kat.: A15999, 1:2000) másodlagos antitestet használtunk. A ko-immunprecipitáció 3 független transzfekcióval vizsgáltuk. A dolgozatban egy reprezentatív western blot-ot tüntettünk fel.

4.12. Statisztikai analízis

A qRT-PCR kísérleteket 3 biológiai ismételtsben vizsgáltuk, és minden mintához 3 technikai párhuzamost alkalmaztunk. A relatív génexpressziós változásokat $\Delta\Delta C_t$ módszer segítségével határoztuk meg. A C_t értékeket a *Hprt* (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase) háztartási gén kifejezéséhez és a vad típusú összejes állapothoz (0. nap) normalizáltuk.

Az immunocitokémiai felvételeken a pozitív sejtek számát (10. ábra B, D, E, G) az Image J (Fiji) program Cell Counter plug in segítségével 3 biológiai mintából határoztuk meg és minden biológiai mintából 3 képet kvantifikáltunk.

A GATA4 immunocitokémiai felvételek (10. ábra D, E) relatív intenzitását az Image J (Fiji) program Analyse Particle plug in segítségével határoztuk meg. Az analízishez 3 biológiai mintát elemeztünk és minden biológiai mintából 3 képet kvantifikáltunk. A vártnak

megfelelően a 0. nap nem detektáltunk jelet, ezért az intenzitás értékeket a d7 vad típusú mintára normalizálva ábrázoltuk.

Minden esetben a két sejtvonal közötti eltéréseket Microsoft Excel program segítségével kétmintás t-próbával értékeltük ki, melyhez a szórást a kísérletek átlagaiból számoltuk. A két sejtvonal közötti szignifikánsnak a $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** eredményeket tekintettük.

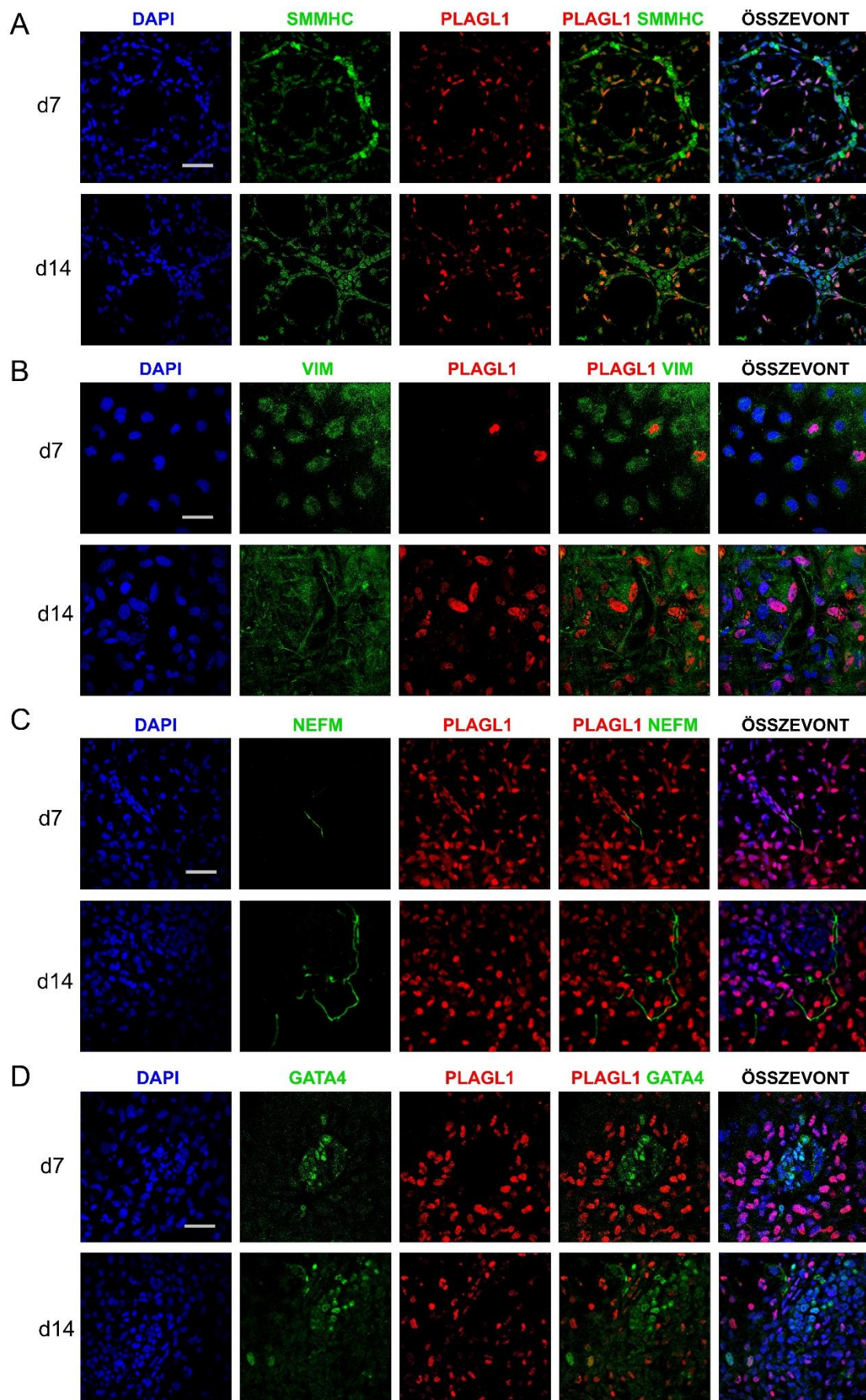
5. Eredmények

5.1. Az *Rybp*^{-/-} kardiális telepekben kevesebb szív endotél sejt alakul ki, mint a vad típusban

Korábbi eredményeinkből tudjuk, hogy az RYBP közvetlenül képes szabályozni a *Plagl1* génexpresszióját és hiányában a PLAGL1 fehérje nem termelődik a kardiális telepekben. Továbbá csoportunk korábban kimutatta, hogy a PLAGL1 fehérje közvetlenül szabályozza a szívizomsejtek (kardiomiociták) felépítésében részt vevő szarkomer gének expresszióját. A szívizomsejtek mellett, azonban más sejttípusok is fontos szerepet játszanak a szív felépítésében, és szükségesek a szívizomsejtek normál fejlődéséhez, működéséhez. Ilyenek pl. az endotéliális, mezenchimális, neurális és simaizom sejtek. Ezért PhD munkám első lépéseként megvizsgáltuk, hogy a kardiomiocitákon kívül van-e más kardiális sejttípus is, melynek kialakulását az RYBP a PLAGL1-en keresztül szabályozhatja. Ehhez vad típusú (*Rybp*^{+/+}) egér embrionális őssejteket differenciáltattunk kardiális irányba függőcseppes módszer (Hanging drop (HD)) segítségével (lásd: Anyagok és módszerek 4.2.). A sejteket a differenciáció második napján letapasztottuk, majd 2D tenyészetekben növesztettük. A mintákat a differenciáció 7. (korai) és 14. (késői) napján gyűjtöttük be, majd immuncitokémiai módszer segítségével PLAGL1-el és sejtvonal specifikus markerekkel jelöltük.

Kimutattuk, hogy a PLAGL1 fehérje detektálható a SMMHC markerrel jelölt simaizom progenitor (d7) és terminális sejtek (d14) egy részében, azonban a PLAGL1 nem volt detektálható az összes simaizom sejtben. Azok a SMMHC pozitív sejtek melyeknél progenitor stádiumban, erősebb SMMHC fejlődés figyelhető meg nem mutattak PLAGL1 pozitivitást. A progenitor stádiumban a VIM (Vimentin) mezenchimális markerrel jelölt sejtek egy kis részében volt megfigyelhető a PLAGL1 fehérje jelenléte. Ehhez képes a késői stádiumban (d14) VIM-el jelölt sejtek nagy része PLAGL1 pozitivitást mutatott, ami arra utal, hogy a PLAGL1-nek a differenciáció késői időpontjaiban lehet szerepe a mezenchimális sejtek elköteleződésében. A késő mezenchimális sejtekhez hasonlóan a PLAGL1 a NEFM (Neurofilament Medium Chain) neurofilamentum markerrel jelölt neurális sejtvonalakban is detektálhatható volt. Mind progenitor (d7), mint terminális (d14) stádiumban minden NEFM pozitív sejt PLAGL1 pozitivitást mutatott (9. ábra A, B és C). Érdekes módon, a többi kardiális sejtvonallal ellentétben, a PLAGL1 fehérje jelenléte nem volt megfigyelhető a egyik stádiumban sem a GATA4-el jelölt endotéliális sejtekben.

Rybp^{+/+}

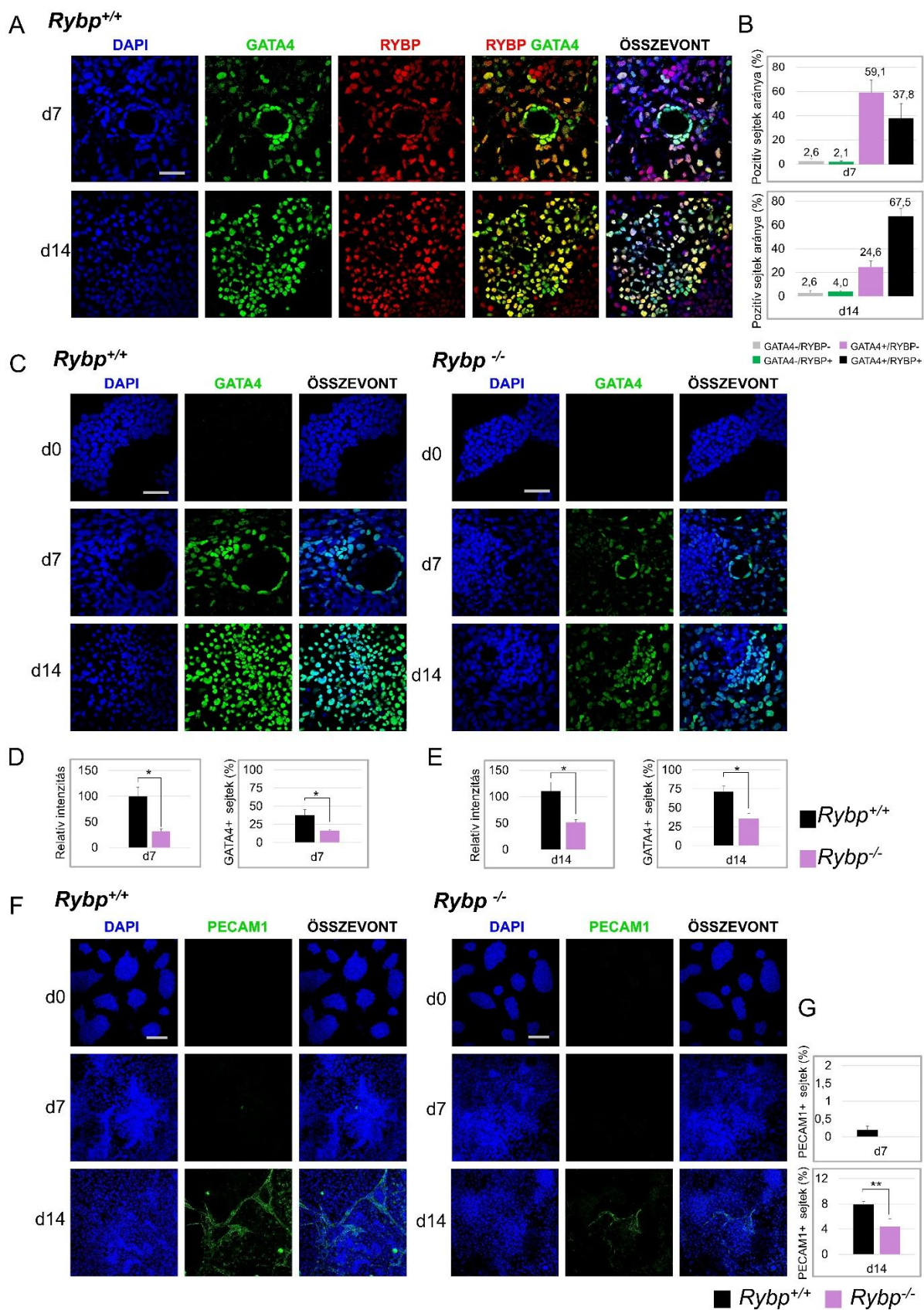


9. ábra: A *PLAGL1* fehérje jelen van a simaizom, mezenchimális és neurális sejtekben, de jelenléte nem volt kimutatható az endotéliális sejtekben

*A 7 és 14 napos vad típusú kardiális telepekben a *PLAGL1* fehérjét a (A) SMMHC simaizom, (B) VIM (VIMENTIN) mezenchimális, (C) NEFM neurofilamnet és (D) GATA4 endotéliális markerekkel festettük immuncitokémia segítségével. Olympus IX 81 konfokális mikroszkóp, Obj.: 60x, Mércse: 50 μ m, kék: DAPI, piros: *PLAGL1*, zöld: SMMHC (A), VIM (B), NEFM (C), GATA4 (D), d: nap*

Összességében eredményeink azt mutatják, hogy a *PLAGL1* potenciálisan részt vehet az egyes simaizom sejttypusok, a terminális mezenchimális sejtek és neurális sejttypusok kialakulásának szabályozásában, de valószínűleg nem szükséges az endotél sejtek kialakulásához (9. ábra D).

Mivel *PLAGL1* fehérje lokalizációja nem fedett át az endotéliális GATA4 fehérjével, ezért az endotéliális sejtekben megvizsgáltuk a GATA4 RYBP-hez viszonyított lokalizációját is. Az immuncitokémiai festésekből kiderült, hogy az RYBP a *PLAGL1*-al ellentétben, kimutatható a GATA4-el jelölt endotéliális sejtek többségében, és nagymértékű kollokalizációt mutat a GATA4-el (10. ábra A). Az immuncitokémiai képek Image J analízisével kimutattuk, hogy az RYBP és GATA4 kettős pozitív sejtek (RYBP+/GATA4+) száma már a differenciáció 7. napján 37,8 %-a, és a differenciáció 14. napjára a kettős pozitív sejtek a kardiális telep 67,5 %-t teszik ki (10. ábra B). Mivel a szív endotél sejtek közvetlenül befolyásolják a szomszédos kardiomiociták működését (Brutsaert 2003), ezért kíváncsiak voltunk, hogy vajon *Rybp* hiányában megváltozik-e az endotél sejtek elköteleződése is. Ennek vizsgálatához vad típusú (*Rybp*^{+/+}) és *Rybp* null mutáns (*Rybp*^{-/-}) őssejteket differenciáltattunk kardiális irányba, és megnéztük tapasztalunk-e eltérést a GATA4 korai és a PECAM1 késői endotéliális marker fehérje szintjében a két sejt vonal között. Eredményeinkből kiderült, hogy a GATA4 fehérje mindkét sejt vonalban jelen volt a differenciáció 7. és 14. napján is, azonban átlagosan alacsonyabb volt a megfestett sejtek száma az *Rybp*^{-/-} telepekben (10. ábra C, D). A GATA4+ sejtek aránya mellett a mutáns sejt magokban alacsonyabb GATA4 intenzitás volt mérhető mind progenitor (d7) mind pedig terminális (d14) stádiumban (10. ábra D, E). A mutáns telepekben a GATA4-hez hasonlóan a PECAM1 fehérjére pozitív sejtek száma is lecsökkent, míg a vad típusú 14. napos telep sejtjeinek 7,9 % addig az *Rybp*^{-/-} telepek mindössze 4,4 %-ban volt PECAM1 fehérje kimutatható (10. ábra F, G).



10. ábra: A vad típushoz képest *RYBP* hiányában alacsonyabb a *GATA4* és *PECAM1* szírv endothél marker fehérjék kifejeződési mintázata

(A) Az RYBP és a GATA4 kolokalizálódik a 7 és 14 napos vad típusú (*Rybp*^{+/+}) kardiális telepekben. (B) Az RYBP⁺ és GATA4⁺ sejtek százalékos aránya kardiális telepekben. (C) A vad típusú és *Rybp*^{-/-} kardiális telepek GATA4 immunocitokémiai analízise. (D)(E) A vad típushoz képest az *Rybp*^{-/-} kardiális telepekben GATA4 korai marker fehérjék szintje alacsony és a mutáns telepekben kevesebb GATA4⁺ sejt detektálható. (F) A vad típusú és *Rybp*^{-/-} kardiális telepek PECAM1 immunocitokémiai analízise. (G) *Rybp* hiányában és PECAM1 késői endotéliális markert tartalmazó sejtek száma szignifikánsan lecsökkent. Olympus IX 81 konfokális mikroszkóp, Obj.: 60x (A, C) és 20x (F) Mércse: 50 μ m (A, C) és 100 μ m (F), kék: DAPI, piros: RYBP, zöld: GATA4 (A, C), PECAM1 (F) d: nap.

Mindezek azt mutatják, hogy a szív fejlődése során az RYBP jelenléte szükséges nem csak a szívmiocytes megfelelő fejlődéséhez, de a szív endotél sejtjeinek kialakulásához is. Továbbá a kardiális endotél sejtek differenciációja, a kardiomiocitákkal ellentétben, valószínűleg az RYBP-nek egy PLAGL1-től független mechanizmusán keresztül valósul meg.

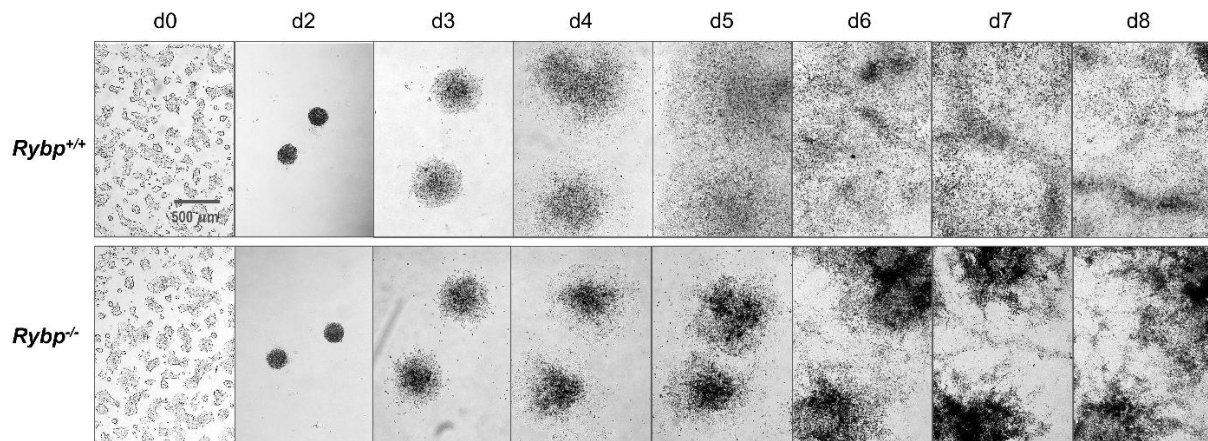
5.2. *Rybp* hiányában a kardiális progenitor marker gének alacsony expressziót mutatnak

Eredményeink azt mutatták, hogy *Rybp* hiányában mind a kardiomiociták, mind pedig a kardiális endotél sejtek kialakulása már a differenciáció 7. napján a progenitorok kialakulásakor sérül (10. ábra C, F) (Henry és mtsai. 2020). Ezért a következő lépésként vad típusú és *Rybp*^{-/-} őssejteket *in vitro* szív irányba differenciáltattuk, és a progenitor telepek morfológiai és génexpressziós szintjét is jellemeztük. A szív progenitor sejtek kialakulása során a korai transzkripciós faktorok dózisa időben dinamikusán változik és termelődésüket szűk expressziós intervallum jellemzi. A gyors expressziós változások detektálásához a mintákat a differenciáció kezdetétől (2. nap) a differenciáció végéig (8. nap) naponta gyűjtöttük.

A differenciálódó sejtek morfológiáját követve megállapítottuk, hogy két sejtvonal között igen korán, már a kardiális differenciáció 3. napján jelentkeztek eltérések, a 4. naptól kezdve a mutáns kolóniák mérete kisebb volt, a telepek vad típushoz képest sötétebbek, rendezetlenebbek és kontúrjuk kevésbé körülhatárolt (11. ábra).

A megfigyelt morfológiai eltérések eredményezhetik a csoportunk által korábban jellemzett *Rybp*^{-/-} kardiális fenotípust a differenciáció terminális stádiumában (Henry és mtsai. 2020). A korai mutáns morfológia hátterében álló molekuláris mechanizmus feltárásához kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR) segítségével összehasonlítottuk a két sejtvonal

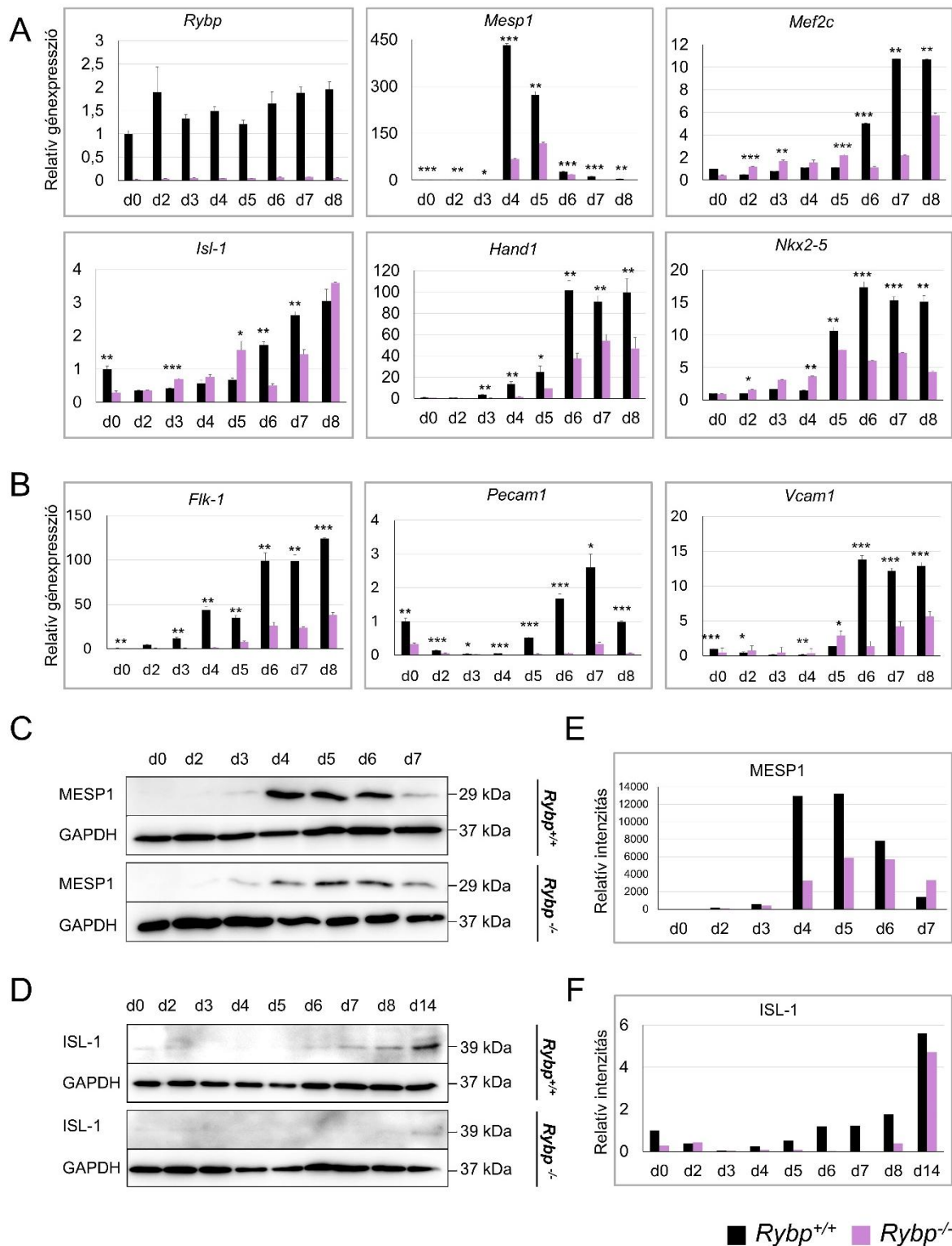
közötti génkifejeződést. Először a szívizomsejtek kialakításában részt vevő késői kardiális progenitor marker gének termelődését vizsgáltuk. A vad típusú sejtekben a *Mef2c*, *Hand1*, *Isl-1* és *Nkx2-5* mRNS szintjének fokozatos emelkedése figyelhető meg.



11. ábra: A vad típusúhoz képest RYBP hiányában a kardiális progenitor differenciáció 3. napjától észlelhető morfológiai eltérések

Sejt morfológiai változások a vad típusú és Rybp^{-/-} kolóniákról a kardiális differenciáció progenitor stádiumában, ahol a 0. nap az összejtes, 2. naptól a 6. napig a korai progenitor míg a 7. és 8. napok a késői progenitor stádiumot reprezentálják. Cell-R mikroszkóp, Obj: 4x, Mércse: 500 μm, d: nap

Ehhez képest az *Rybp^{-/-}* tenyészetekben megváltozott génexpressziót tapasztaltunk, a *Hand1* gén termelődése minden vizsgált időpontban alacsony volt a mutánsban. A *Mef2c* és az *Nkx2-5* mRNS szintje a korai időpontokban hasonló volt mindkét genotípusban, azonban az 5. ill. 6. naptól kezdve az *Rybp^{-/-}* kolóniák expressziós szintje nem tudta elérni a vad típusét. Az *Isl-1* expressziós szintje a vad típusúhoz viszonyítva csak a differenciáció 6. és 7. napján mutatott csökkenést, a többi időpontban hasonló (d2, d8) vagy magasabb (d3, d4, d5) expresszió volt detektálható (11. ábra A). Mindezek arra utalnak, hogy az *Rybp^{-/-}* telepekben sérül a késői kardiális progenitorok kialakulása. Ezért megvizsgáltuk a legkorábbi kardiális transzkripció faktor, a Mesoderm posterior 1 (*Mesp1*) gén termelődését is. A vártak megfelelően a *Mesp1* gén expressziója a vad típusú mintákban a differenciáció 4. napjára megnövekedett, és ez a magas expressziós szint rövid ideig, az 5. napig volt detektálható, majd a késői progenitor stádium előtt a szint ismét lecsökkent (12. ábra A). Ehhez képest az *Rybp^{-/-}* kardiális progenitor telepekben a *Mesp1* termelődése szignifikánsan kevesebb volt a vad típusúhoz viszonyítva.



12. ábra: Az *Rybp*^{-/-} kardiális kolóniákban a kardiális progenitorok differenciációja sérül

(A) Az qRT-PCR eredmények alapján, *Rybp* hiányában a *Mesp1*, *Mef2c*, *Isl-1*, *Hand1*, és *Nkx2-5* kardiális progenitor és (B) *Flk-1*, *Pecam1* és *Vcam1* endotéliális progenitor marker gének alacsony expressziót mutatnak. A génexpressziós változásokat a *Hprt*, háztartási gén

kifejeződéséhez normalizáltuk és a vad típusú összejtes állapothoz (d0) viszonyítva vizsgáltuk. A y tengelyen a génexpresszió mértékét, az x tengelyen a mintavételi napokat tüntettük fel. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***), Szórás: standard deviáció $\pm$ SD. (C) A western blot képekből kiderült, hogy a MESP1 és (D) az ISL-1 fehérjék szintje alacsony az *Rybp*^{-/-} kardiális kolóniákban. kDa: kilo dalton (E) A MESP1 és (F) ISL-1 fehérje intenzitását Image J-vel program segítségével kvantifikáltuk, a GAPDH belső kontrollhoz normalizáltuk és a vad típusú összejtes állapothoz (d0) képet ábrázoltuk. d: nap

Hasonló fenotípust tapasztaltunk a kardiális endotél marker gének esetében is. Az *Rybp*^{-/-} telepekben a *Pecam1* és a *Vcam1* endotél markerek alacsony mRNS szintje figyelhető meg a differenciáció késői progenitor stádiumában (12. ábra B). Ezenfelül az *Rybp*^{-/-} telepekben az endotél sejtek korai differenciációjához nélkülözhetetlen receptor tirozin kináz *Flk-1* expressziója már a differenciáció korai stádiumában (d3, d4, d5) szignifikánsan lecsökkent (12. ábra B).

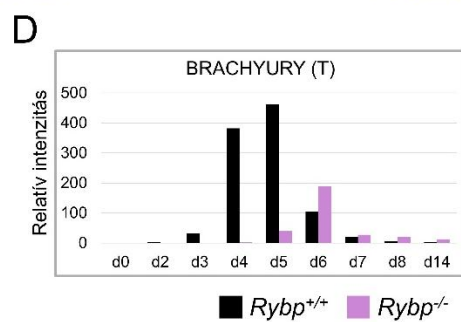
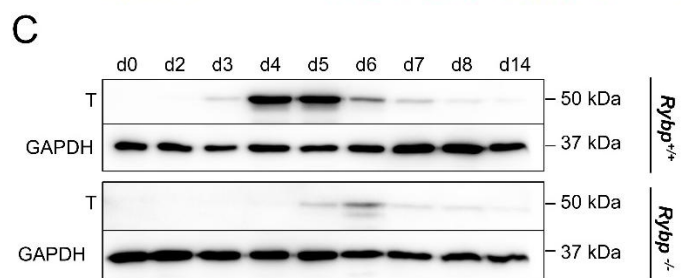
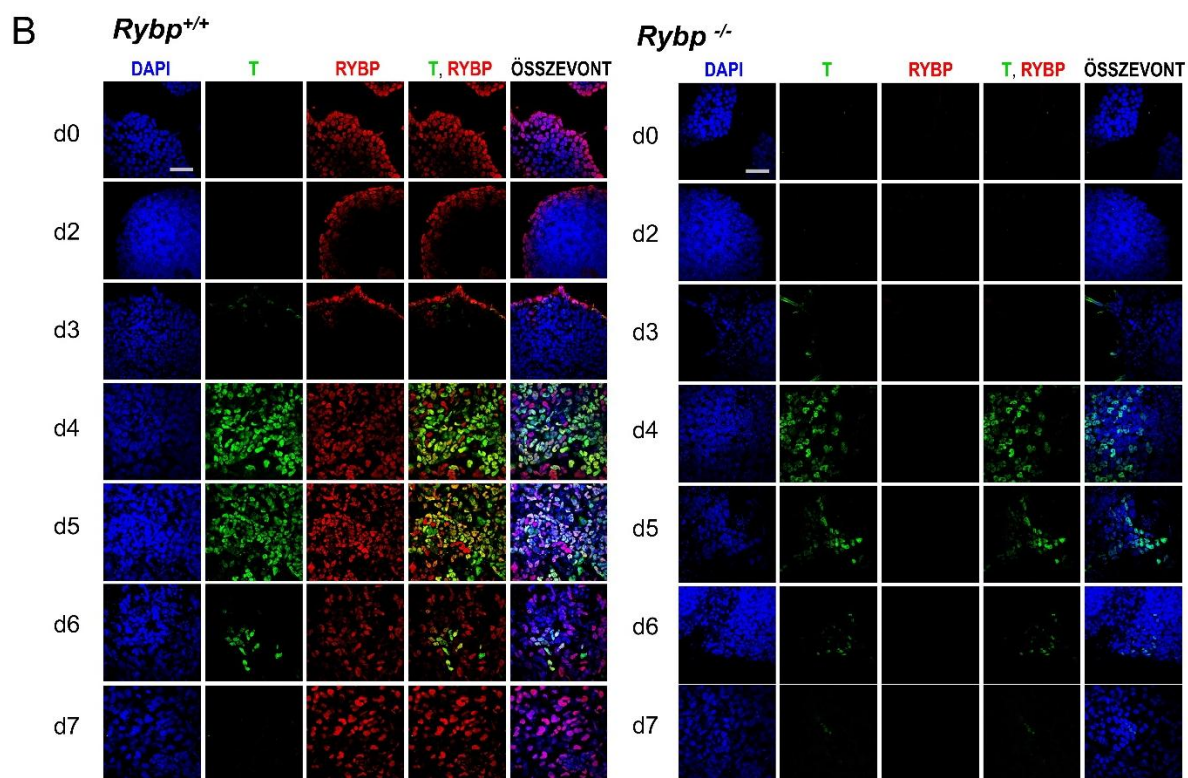
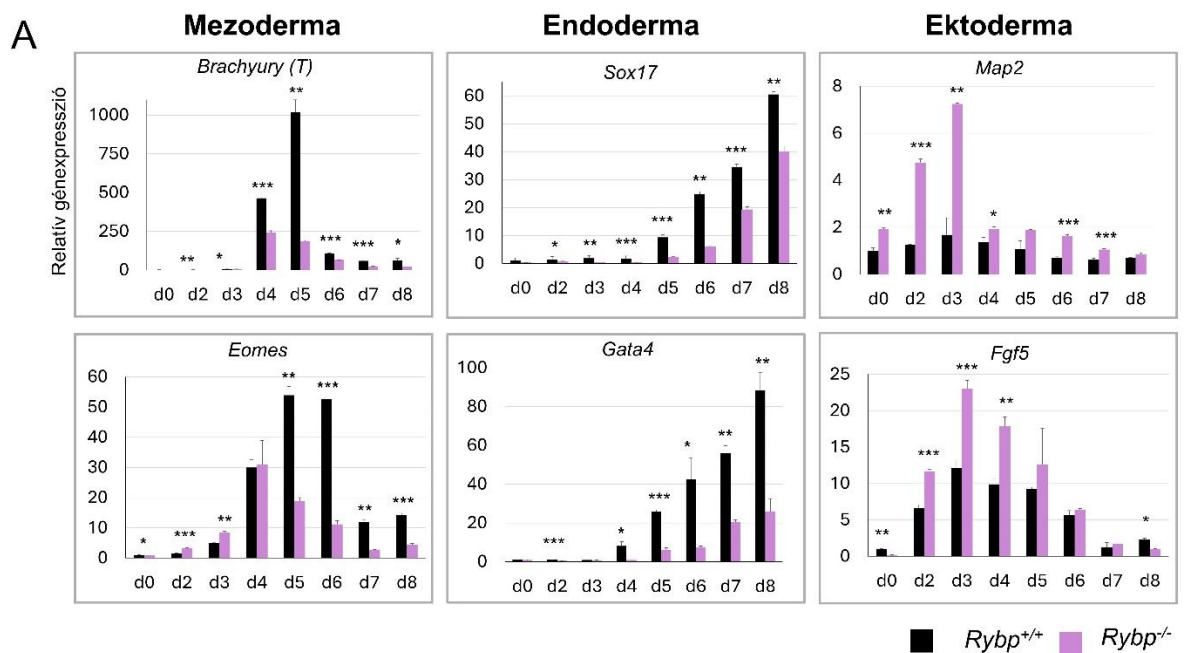
Mivel mind a késői mind pedig a legkorábbi kardiális progenitor gének expressziója a mutánsban lecsökkent, megvizsgáltuk, hogy jelentkezik-e különbség a két sejtvonal között fehérje szinten is. A MESP1 fehérje szintjét a korai progenitor szakaszban (d2, d3, d4, d5, d6 és d7), míg az ISL-1 fehérje szintjét a differenciáció korai (d2, d3, d4, d5 és d6) és késői (d7, d8 és d14) időpontjában vizsgáltuk western blot technika segítségével, majd a fehérje intenzitásokat Image J program segítségével kvantifikáltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy RYBP hiányában mindkét fehérje mennyisége szignifikánsan lecsökkent, és kinetikájukban a vad típuséhoz képest késés figyelhető meg (12. ábra C, D, E, F), ami összhangban volt az mRNS expressziós szinteknél tapasztalt változásokkal (12. ábra A). Ezek arra utalnak, hogy RYBP hiányában már a legkorábbi kardiális progenitorok kialakulása is károsodást szenved.

Eredményeinkből kiderül, hogy az *Rybp* jelenléte elengedhetetlen a kardiális és az endotéliális progenitor sejtek kialakulásához. RYBP hiányában a PLAGL1 szabályozásában részt vevő *Nkx2-5* is alacsony expressziót mutatott, továbbá a legkorábbi kardiális (*Mesp1*) és endotéliális (*Flk-1*) marker gének mRNS szintje is lecsökken. Mivel mindkét sejtvonal mezoderma eredetű, eredményeink arra utalnak, hogy az RYBP szabályozó funkcióját talán már a mezoderma kialakulásakor kifejtheti.

5.3. *Rybp* hiányában a fő csíralemezek kialakulása zavart szenved

Annak érdekében, hogy feltárjuk az RYBP potenciális szerepét a mezoderma kialakításában, a qRT-PCR technika segítségével összehasonlítottuk a fő csíralemez marker gének expresszióját a vad típusú és az *Rybp*^{-/-} sejtekben. A mintákat a kardiális progenitorokhoz hasonlóan naponta gyűjtöttük az *in vitro* kardiális differenciáció korai (d2, d3, d4, d5, d6) és késői (d7, d8) progenitor szakaszában (13. ábra A). Először az endogén *Rybp* expressziót elemeztük napi felbontásban. A differenciáció korai szakaszában szignifikáns ingadozás az *Rybp* gén kifejeződésében nem volt megfigyelhető. Ezután a mezoderma kialakításában fontos szerepet játszó markergének (röviden: mezoderma marker) expresszióját vizsgáltuk. A vad típusú kardiális telepekben a T-box transzkripciós faktorok családjába tartozó, legkorábbi mezoderma marker *Brachyury* expressziója gyors növekedést mutatott a kardiális differenciáció 4. és 5. napján, és a vártan megfelelően lecsökkent a differenciáció későbbi szakaszában (d6, d7, d8). Ezzel ellentétben *Rybp*^{-/-} sejtekben a *Brachyury* alacsony expressziója volt megfigyelhető a vizsgált időpontok mindegyikében (13. ábra A). A vad típusú sejtekben az *Eomesodermin* (*Eomes*, *Tbr2*), ami egy másik olyan mezodermális T-box transzkripciós faktor melynek génszabályozó funkciói részben átfednek a *Brachyury*-val, szintén a differenciáció korai progenitor stádiumában mutatta a legmagasabb expressziót (d4, d5, d6). Ez a differenciáció késői szakaszára (d7, d8) lecsökkent. A *Brachyury*-hoz hasonlóan az *Eomes* is alacsony expressziót mutatott a mutáns kolóniákban, ami arra utal, hogy *Rybp* hiányában a mutáns telepekben nem képződik megfelelő mennyiségű mezoderma.

A mezodermális markerekhez hasonlóan vizsgáltuk az endodermális és ektodermális marker gének termelődését is. Eredményeinkből kiderült, hogy az *Rybp*^{-/-} kolóniákban az SRY-box transzkripciós faktor 17 (*Sox17*) és a GATA kötő fehérje 4 (*Gata4*) mRNS szintje a mezodermális génekhez hasonlóan alacsonyabb (13. ábra A). Ezzel ellentétben az ektodermális gének, mint pl. a fibroblaszt növekedési faktor 5 (*Fgf5*) és a mikrotubulus asszociált fehérje 2 (*Map2*) megnövekedett expressziót mutattak a mutáns kolóniákban (13. ábra A). Mindezek arra utaltak, hogy az *Rybp* hiánya a mezodermális és endodermális génekkel ellentétben, az ektodermális gének expresszióját nem korlátozta. A génexpressziós változások után megvizsgáltuk a BRACHYURY fehérje szintjét is. Ehhez vad típusú és az *Rybp*^{-/-} mintákat *in vitro* kardiális irányba differenciáltattuk, a differenciáció különböző időpontjaiban teljes fehérje lizátumot gyűjtöttük, majd a BRACHYURY fehérje szintjét western bolt-tal vizsgáltuk.

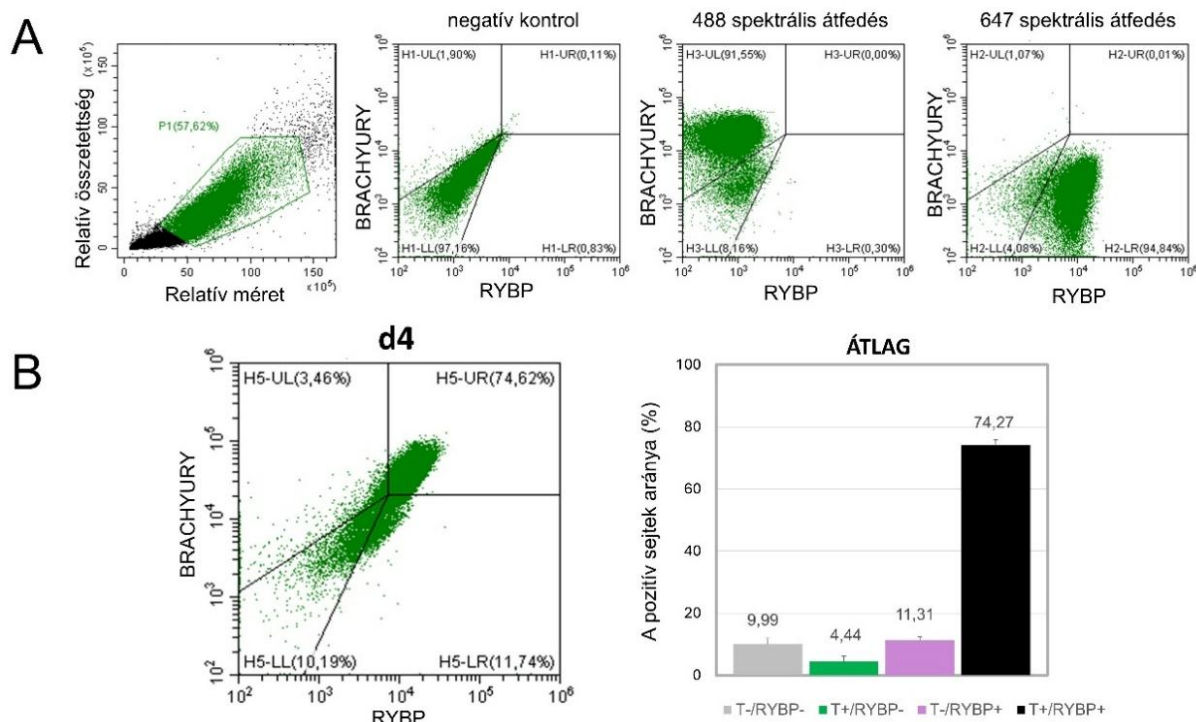


13. ábra: Rybp hiányában a fő csíralemezek kialakulása zavart szenved

(A) Rybp hiányában a mezodermális (*Brachyury*, *Eomes*) és endodermális (*Sox17*, *Gata4*) gének termelődése lecsökken míg az ektodermális (*Map2*, *Fgf5*) gének megnövekedett expressziót mutatnak. A génexpressziós változásokat a *Hprt*, háztartási gén kifejeződéséhez normalizáltuk és a vad típusú összejtes állapothoz (d0) viszonyítva vizsgáltuk. 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. **(B)** Immuncitokémiai analízissel kimutattuk, hogy a BRACHYURY korai mezodermális fehérje szintje alacsony a kardiális progenitor sejtekben. Olympus IX 81 konfokális mikroszkóp, Obj.: 60x Mércse: 50 μ m, kék: DAPI, zöld: BRACHYURY(T), piros: RYBP. **(C)** A vad típushoz képest az *Rybp*^{-/-} telepek western blot analízise is alacsony BRACHYURY szintet mutatott a kardiális differenciáció során. **(D)** BRACHYURY fehérje intenzitását Image J-vel program segítségével kvantifikáltuk, a GAPDH belső kontrolhoz normalizáltuk és a vad típusú összejtes állapothoz (d0) képest ábrázoltuk. d: nap

Az eredményekből kiderült, hogy a vad típusú mintákban a BRACHYURY fehérje a differenciáció 4. és 5. napján volt kimutatható a legnagyobb mennyiségben, majd az 5. napot követően a progenitor szakasz végére teljesen lecsökken. Ehhez képest a BRACHYURY fehérje szintje az *Rybp*^{-/-} kolóniákban a teljes differenciáció során a vad típusnál alacsonyabb volt, továbbá kinetikájában eltolódás volt megfigyelhető (13. ábra C).

Mivel a BRACHYURY fehérje alacsony mennyiségben volt kimutatható a mutánsban, kíváncsiak voltunk a két sejtvonal között van-e különbség a fehérje térbeni eloszlásában, és szubcelluláris lokalizációjában. Ennek vizsgálatához a progenitor stádiumból származó mintákat RYBP és BRACHYURY kettős immuncitokémiai festésnek vetettük alá. Mindkét sejtvonalban BRACHYURY pozitív (+) sejteket először a 3. napon detektáltuk a korai kardiális telepek szélein. A 3. napot követően a BRACHYURY+ sejtek a növekvő kolóniák nagy részében detektálhatóak voltak. A BRACHYURY+ sejtek száma a 4. napon tetőzött és 5. napot követően a pozitív sejtek száma csökkenni kezdett (13. ábra B). Az *Rybp*^{-/-} kolóniákban a BRACHYURY+ sejtek száma a vad típushoz viszonyítva a differenciáció egész időtartama alatt alacsony marad (13. ábra B), mely eredményeink összhangban vannak a fentebb említett qRT-PCR eredményekkel.



14. ábra: A vad típusú 4 napos kardiális progenitor sejtek 74,27%-a RYBP és BRACHYURY kettős pozitív

A vad típusú 4 napos kardiális progenitor sejtek RYBP és BRACHYURY áramlási citometriája (A) a kísérlethez tartozó negatív és spektrális átfedést ellenőrző kontrollokkal. (B) A kísérletből 3 biológia minta készült, a képen a reprezentatív ábrát tüntettük fel, melyen az y-tengely a BRACHYURY-val jelölt sejtek míg az x-tengely az RYBP-val jelölt sejtek fluoreszcencia intenzitásai mutatja. d: nap

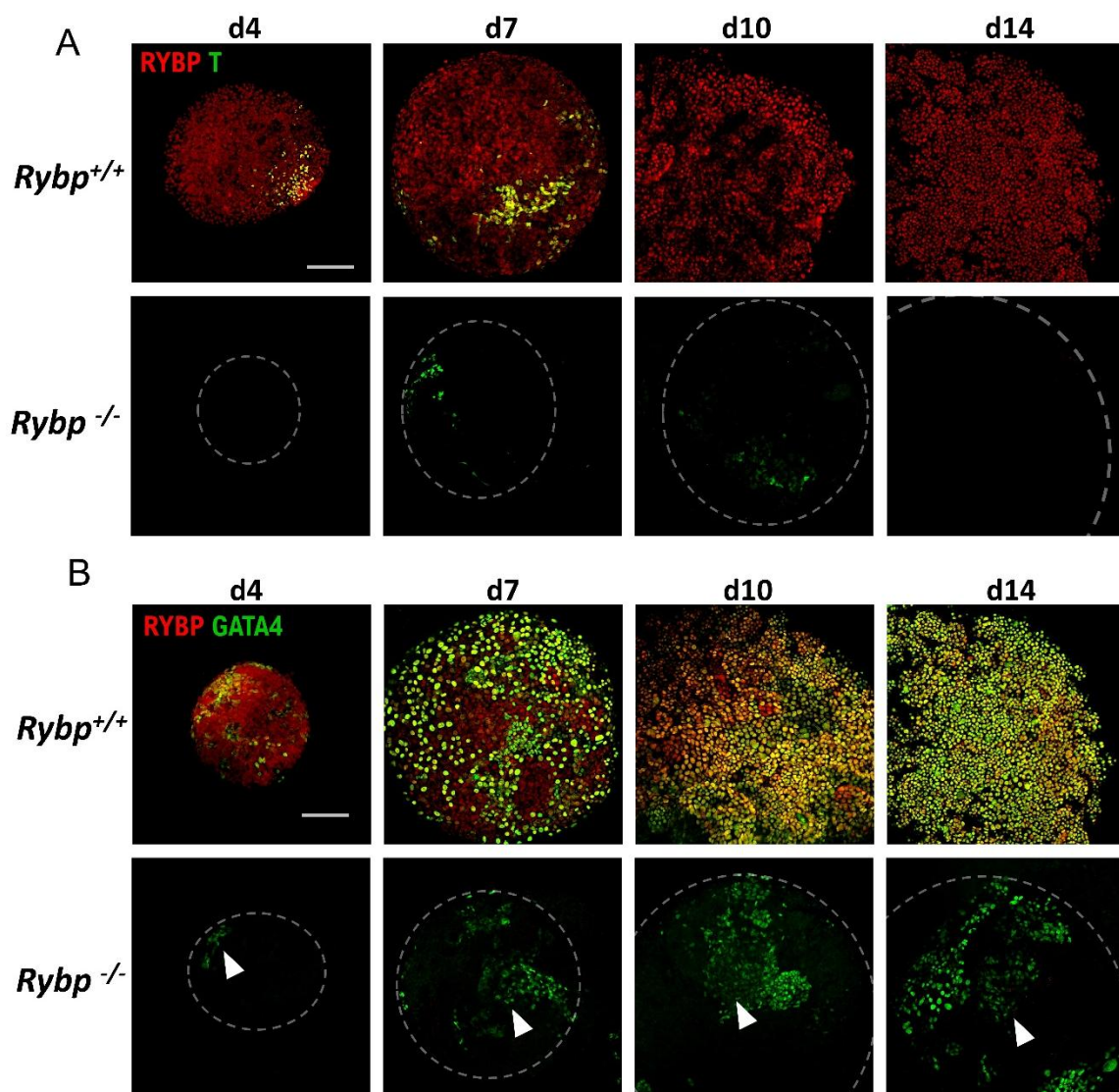
Ezután konfokális mikroszkópia alkalmazásával megvizsgáltuk a BRACHYURY fehérje szubcelluláris lokalizációját az RYBP-hez képest. A vad típusú sejtekben a BRACHYURY és az RYBP fehérje sejtmagi kolokalizációt mutatott a korai progenitor stádiumban (3., 4., 5. és 6. nap). A kettős pozitív sejtekben mindkét fehérje erős intenzitásban volt detektálható. Annak érdekében, hogy meghatározzuk ezen kettős pozitív sejtek számát, áramlási citometriával analizáltuk a vad típusú sejtekből származó mintákat (Flow cytometry (FC)). Az áramlási citometriához a mintákat a differenciáció 4. napján gyűjtöttük, mivel előzetes kísérleteinkből tudtuk, hogy a BRACHYURY+ sejtek száma ekkor éri el a legmagasabb értéket. Eredményeinkből kiderült, hogy a sejtek többsége, 74,27%-a RYBP+/BRACHYURY+, 11,31%-a RYBP+/BRACHYURY- és csak 4,44%-uk RYBP-/BRACHYURY- (13 ábra A, B).

Összességében az adataink arra utalnak, hogy az *Rybp* jelenléte szükséges mindhárom fő csíralemez megfelelő fejlődéséhez. Hiánya a csíralemez markergének kiegyensúlyozatlan termelődéséhez vezet, mely során a differenciáció a mezodermális és endodermális sejtvonalak helyett ektodermális irányba tolódik el.

5.4. *Rybp* hiányában a 3D-s embrionális testekben az endodermális és mezodermális rétegek alulreprezentáltak

A gasztruláció az embrionális fejlődés egyik legfontosabb és legösszetettebb folyamata, mely során az embrióban nagymértékű változások mennek végbe. A pluripotens sejtek differenciálódni kezdenek, a sejtek alakja és az embrióban belüli helyzete megváltozik, ami lehetővé teszi a fő csíralemezek kialakulását. A sejtmozgásokhoz és átrendeződésekhez a szignalizációs jeleket a sejtek a 3D-s térben a szomszédos sejtektől kapják. Kísérleteinkkel ezidáig kétdimenziós (2D) térben vizsgáltunk. Ahhoz, hogy az RYBP gasztrulációban játszott szerepét egy komplexebb kísérleti rendszerben is meg tudjuk vizsgálni, vad típusú és *Rybp*^{-/-} embrionális őssejtekből 3D-s embrionális testeket (embryonic body (EB)) hoztunk létre (lásd: Anyagok és módszerek 4.2.). Az EB-k létrehozásához spontán differenciációt alkalmaztunk, mely biztosítja mindhárom fő csíralemez megfelelő kialakítását. A mintákat az EB differenciáció 4., 7., 10. és 14. napjain fixáltuk. A mezoderma 3D-s vizsgálatához a vad típusú és *Rybp*^{-/-} EB-ket RYBP és BRACHYURY kettős immuncitokémiai analízisnek vetettük alá. Az RYBP fehérje a vad típusú embrionális testekben a differenciáció alatt végig hasonló intenzitásban volt jelen (15. ábra). Az RYBP pozitív sejteket főként az embrionális testek felszíni rétegeiben detektáltuk, azon a részen, ahol az endoderma kialakulását várjuk.

A vad típusú sejtekben a BRACHYURY⁺ sejtek már a 4. naptól kimutathatók voltak, a legtöbb BRACHYURY⁺ sejtet a 7. napon figyeltünk meg, míg a 10. naptól az EB-kben már nem volt BRACHYURY⁺ sejt detektálható (15. ábra A). A vad típusú sejtek többségében az RYBP és a BRACHYURY fehérjék sejtmagi kolokalizációt mutattak, ami megegyezett a 2D- *in vitro* differenciációban tapasztaltakkal. Ezzel szemben az *Rybp*^{-/-} EB-kben a BRACHYURY fehérje szintje a differenciáció során végig alacsonyabb volt, mint a vad típusban. A korai progenitor stádiumban (d4) a BRACHYURY fehérje a legtöbb mutáns EB-ben nem volt kimutatható. A mutánsban a BRACHYURY⁺ sejtek a vad típussal ellentétben csak a 7. naptól jelentek meg, a 10. napon még detektálni tudtunk pozitív sejteket, míg a 14. naptól a BRACHYURY fehérje már a mutánsban sem volt kimutatható (15. ábra A).



15. ábra: Az RYBP fehérje kolokalizál a BRACHYURY mezodermális és GATA4 endodermális marker fehérjékkel

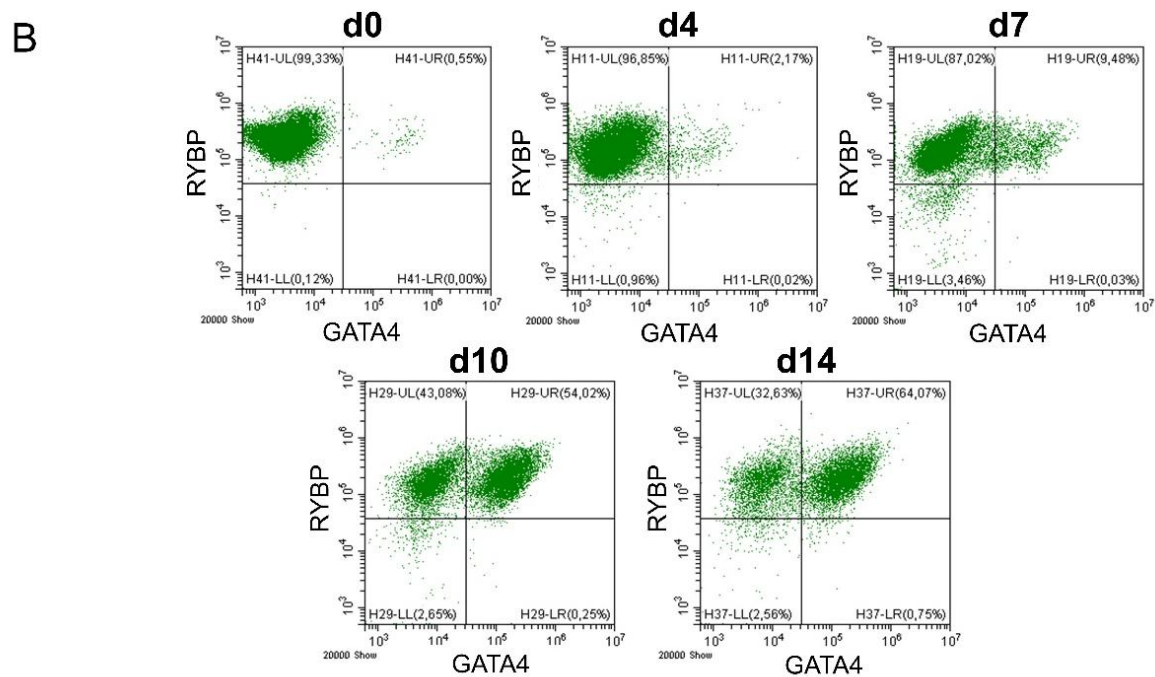
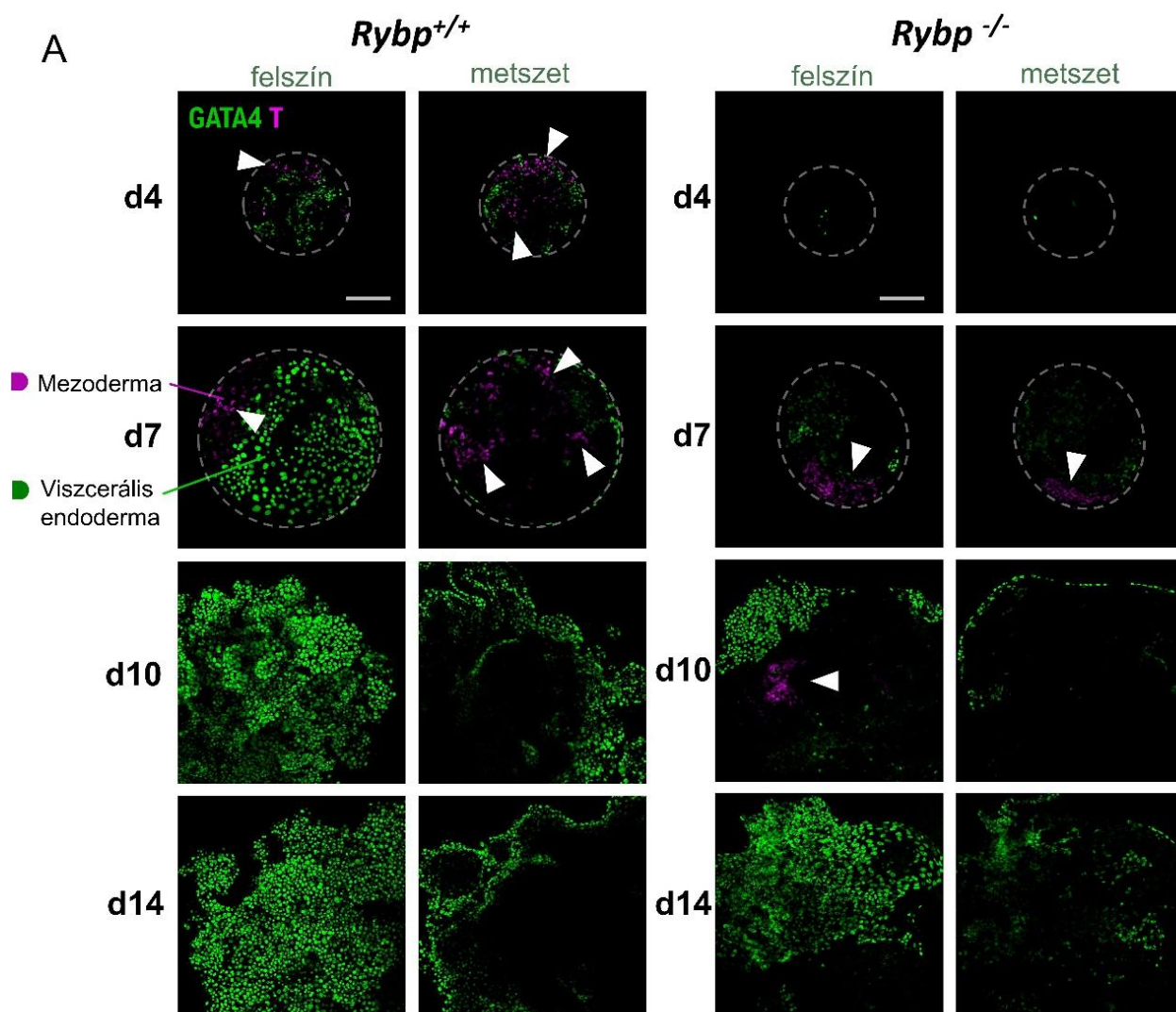
(A) A vad típusú és *Rybp*^{-/-} EB-k RYBP és BRACHYURY, illetve (B) RYBP és GATA4 immuncitokémiai festése. Olympus IX 81 konfokális mikroszkóp, Obj.: 20x Mércse: 100 μ m, (A) piros: RYBP, zöld: BRACHYURY(T), (B) piros: RYBP, GATA4 (B), d: nap, fehér nyilak: alacsony GATA4 intenzitású sejtek

Mivel az RYBP⁺ sejtek főként az EB-k felszíni rétegeiben orientálódtak, ahol az endoderma kialakulását várjuk, a következő lépésként az RYBP-t az endodermális GATA4 fehérjével együtt festettük meg (15 ábra B). A vad típusú EB-kben az első GATA4 sejteket a differenciáció 4. napján detektáltuk, és a pozitív sejtek száma a differenciáció előrehaladásával fokozatosan

növekedett. A vad típusú EB-kben az RYBP és a GATA4 sejtmagi kolokalizációt mutatott a 4. naptól a differenciáció végéig (d14), ahol az RYBP+/GATA4+ sejtek többrétegű EB felszínt alakítottak ki. Az *Rybp*^{-/-} EB-ben a GATA4+ sejtek száma a vad típushoz képest alacsonyabb volt a differenciáció teljes időtartama alatt, és a pozitív sejtek egy része sokkal alacsonyabb GATA4 jel intenzitást mutatott. A GATA4+ sejtek alacsony száma miatt a mutáns EB-k nem voltak képesek megfelelő külső GATA4+ réteg kialakítására, és az EB felszínek csak kis részét képezték GATA4+ sejtek (15. ábra B, fehér nyilak).

A mezoderma és endoderma közötti kölcsönhatás részletesebb vizsgálatához BRACHYURY és GATA4 kettős immuncitokémiát is végeztünk, és megvizsgáltuk a két fehérje egymáshoz viszonyított elhelyezkedését az EB-k felszínén és közepén (16. ábra A). Eredményeinkből kiderül, hogy a BRACHYURY és a GATA4 fehérjék minden esetben különböző sejtekben voltak jelen. RYBP hiányában egyik fehérje esetében sem figyeltünk meg változást a fehérjék EB-n belüli lokalizációjában. Progenitor stádiumban (d4 és d7) a BRACHYURY+ és a GATA4+ sejtek a vad típusú és mutáns EB-k felszínén és közepén is egyaránt detektálhatóak voltak. Mindazonáltal a vad típusú mintákban a BRACHYURY+ sejtek az embrionális testeken belül szétszórtabban helyezkedtek el a mutánshoz képest, melyben a BRACHYURY+ sejtek többnyire egy helyre korlátozódtak (16. ábra A, fehér nyilak). Mivel az embrionális testekben relatívan sok RYBP+/GATA4+ sejtet figyeltünk meg, következő lépésként áramlási citometriát végeztünk, és meghatároztuk a kettős pozitív sejtek számát az EB differenciáció különböző időpontjaiban (d4, d7, d10 és d14). Eredményeinkből kiderült, hogy a kiinduló pluripotens sejtek (d0) 99,33%-a RYBP+ volt. A differenciáció előrehaladtával az RYBP+ sejtpopuláció egyre nagyobb része GATA4+ pozitív is lett, miközben egy kisebb százaléka (4,99%) az idő múlásával elveszítette az RYBP pozitivitását. Az RYBP+/GATA4+ sejtek száma a differenciáció előrehaladtával fokozatosan növekedett, míg a 14. napra a kettős pozitív sejtek alkották az összes sejt 63,23%-át (16. ábra B).

Összességében eredményeinkből kiderül, hogy az RYBP hiánya hatással van a mezoderma és endoderma rétegek kialakulására a 3D-s EB-k differenciációja során is. Az RYBP-t nélkülöző mezoderma sejtekben amellet, hogy alacsony BRACHYURY szint figyelhető meg, a BRACHYURY+ sejtek embrionális testeken belüli elrendeződése is sérül.



16. ábra: RYBP hiányában a mutáns EB-kben nem képződik megfelelő mezoderma és GATA4+ viszcerális endoderma réteg

(A) A vad típusú és az *Rybp*^{-/-} EB-k BRACHYURY és GATA4 kettős immuncitokémiai festése. A minták mikroszkópos felvételei az embrionális testek felszínéről és közepéről készültek. Olympus IX 81 konfokális mikroszkóp, Obj.: 20x Mércse: 100 µm, magenta: BRACHYURY (T), zöld: GATA4. fehér nyilak: BRACHYURY térbeli eloszlása (B) RYBP és GATA4 áramlási citometria (FC) a differenciáció különböző időpontjaiban (d4, d7, d10 és d14). Az ábrán a y-tengelyen tüntettük fel a GATA4-al jelölt sejteken míg az x-tengelyen az RYBP-val jelölt sejteken detektált fluoreszcencia mértékét. A kísérletből 3 biológia minta készült, a képen a különböző időponthoz tartozó reprezentatív ábrákat tüntettük fel. d: nap

5.5. Rybp és a Brachyury együttesen fordul elő a primitív csíkban, naszcens mezodermaiban és a kardiális mezodermaiban

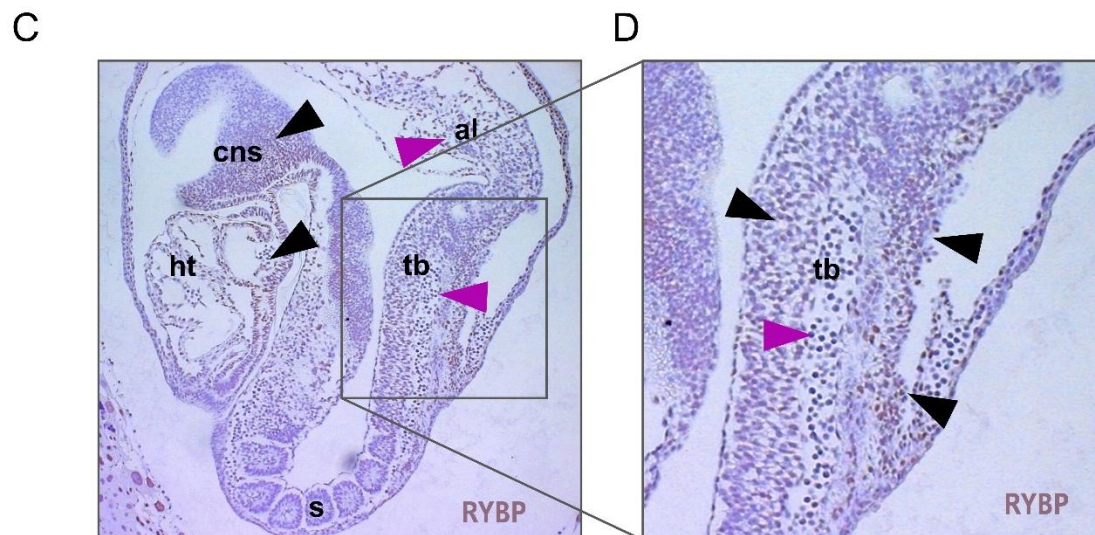
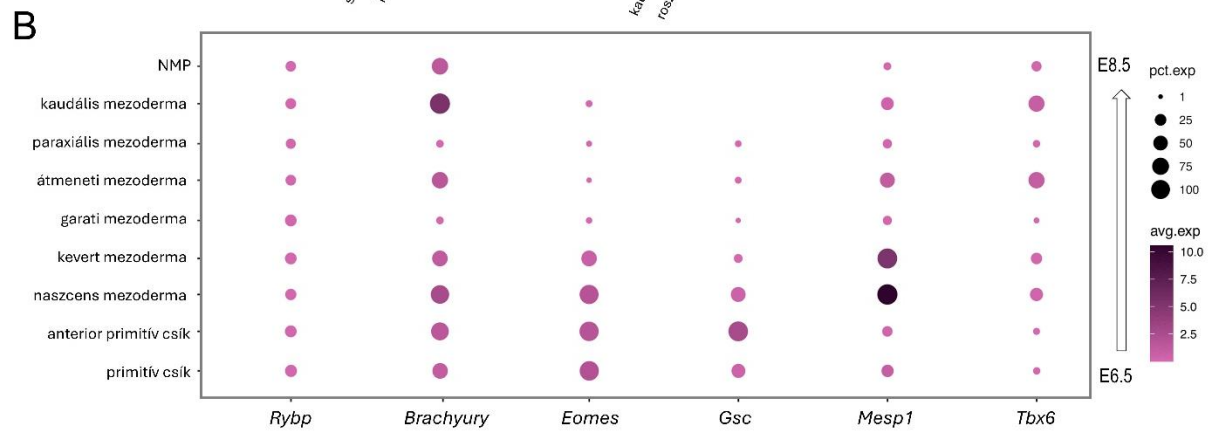
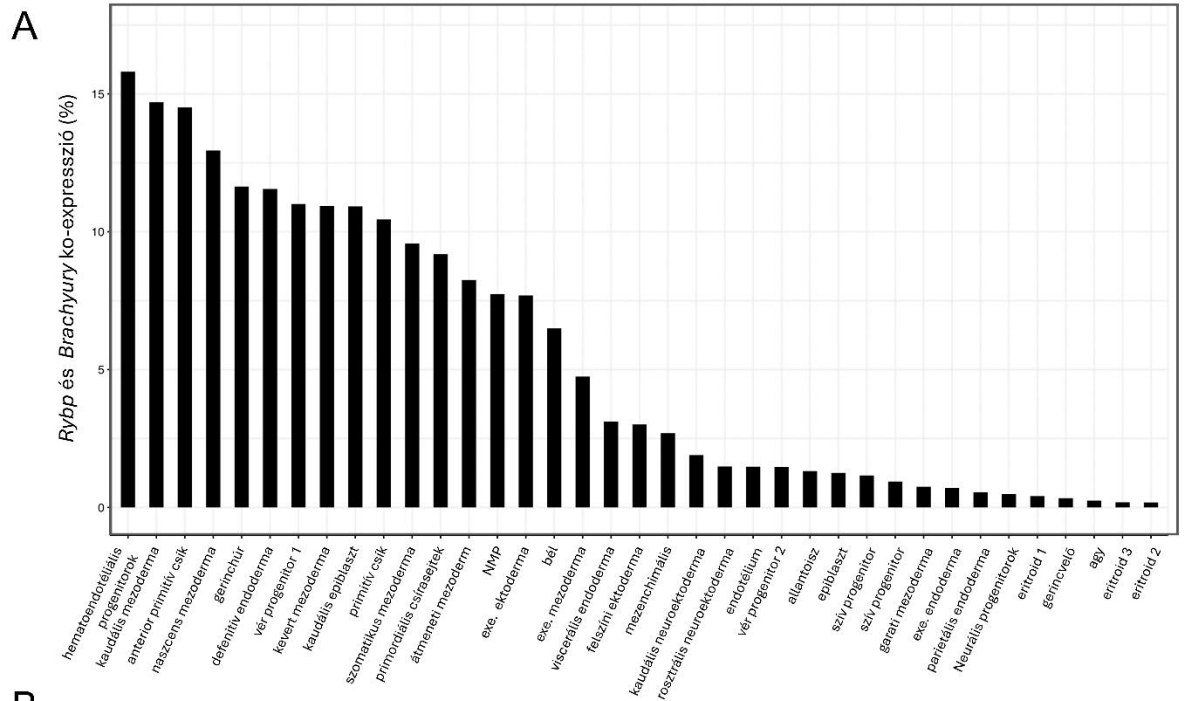
Annak érdekében, hogy az *in vitro* eredményeinket összehasonlítsuk az *in vivo* állapottal, továbbá, hogy azonosítani tudjuk az *Rybp*-t és a *Brachyury*-t együtt expresszáló sejtpopulációkat, az adatainkat összevetettük 6,5-8,5 napos egér embriókból származó egysejtes RNS szekvenálási adatokkal (single-cell RNA sequencing, scRNA-Seq). A vizsgált sc-RNA-Seq adatok nyilvános adatbázisból származtak (egér atlasz: Geo dataset: E-MTAB-6967). A letöltött atlaszban a klasztereket a Pijuan-Sala és munkatársai által 2019-ben közölték alapján azonosítottuk és elemeztük újra (Pijuan-Sala és mtsai. 2019). Az eredményeinkből kiderült, hogy az *Rybp* és a *Brachyury* nagyon korán már a primitív csík kialakulásakor koexpressziót mutat. Az egyik legmagasabb koexpresszió az anterior primitív csík sejteiben figyelhető meg (17. ábra A), melyek a későbbi definitív endoderma és a korai szelvények kialakításáért felelnek.

A primitív csík mellett, számos olyan mezodermás sejtpopulációt is azonosítottunk melyek mind a *Brachyury*-t mint pedig az *Rybp*-t képesek expresszálni. Ide tartoztak a naszcens, kevert, átmeneti (intermediate), szomitikus mezoderma populációk és a neuromezodermás progenitorok (NMP). Más mezodermás populációkban, mint pl. garati (pharyngeal) és paraxiális mezodermaiban nem tudtunk ko-expressziót detektálni (17. ábra A). Ezt követően a mezodermás klaszterekben megvizsgáltuk az *Rybp*, a *Brachyury* és további mezodermás marker gének (*Eomes*, *Gsc*, *Mesp1*, *Tbx6*) génexpressziós szintjeit is. Az irodalmi adatokhoz hasonlóan, az scRNA-Seq adatokban az *Rybp* a klaszterek többségében detektálható volt, de

relatívan alacsony expressziós szintet mutatott. Ezzel szemben a *Brachyury* ugyan minden mezodermális klaszterben jelen volt, termelődése klaszterenként eltért (17. ábra B). A legmagasabb *Brachyury* expressziót a naszcens és kaudális mezodermában detektáltuk. Más korai mezodermális markerek, mint pl. az *Eomes* és *Gsc* csak a korai mezodermális populációkban figyelhetők meg, mint pl. a primitív csík, naszcens és mixed mezoderma. A *Mesp1* kardiális és a *Tbx6* kaudális mezoderma markerek a *Brachyury*-hoz hasonlóan minden klaszterben detektálhatóak voltak. A legmagasabb *Mesp1* expressziót a naszcens és kevert mezoderma populációban, míg a legmagasabb *Tbx6* expressziót a kaudális és intermediate mezodermában figyeltük meg. Eredményeink megerősítik a korábbi megfigyelésünket, miszerint az *Rybp* és a *Brachyury* a differenciáció egy nagyon korai stádiumában, már a primitív csík kialakulásakor képes együtt termelődni, és ez a koexpresszió fennmarad a naszcens mezodermában is, melyek a későbbi kardiális progenitorok és a szívizomsejtek kialakításáért felelnek.

Érdekes módon az scRNS-Seq adatokban a legmagasabb *Rybp* és *Brachyury* koexpresszió a hematoendotéliális progenitorokban, míg a második legmagasabb koexpresszió a kaudális mezoderma populációban volt megfigyelhető. A gasztrulációt követően a kaudális mezoderma populáció sejtei (más forrásokban korai neuromezodermális progenitorok) az embrió axiális megnyúlásakor a farok irányába kezdenek vándorolni, miközben belőlük neuromezodermális progenitorok (NMP) jönnek létre. Mind a kaudális mezoderma, mind pedig neuromezodermális progenitorok a fejlődő egér embrió farok kezdeményében (tailbud) helyezkednek el (Sambasivan és Steventon 2021), és elengedhetetlenek az embriók axiális megnyúlásához és a szelvények kialakításához.

Annak érdekében, hogy több információt nyerjünk a korai embrionális fejlődés ezen stádiumáról, és megvizsgáljuk az RYBP fehérje detektálható-e a szívben és az embriók farkában, RYBP immunhisztokémiát (IHC) végeztünk a vad típusú 8,5 napos egér embriókon. A festésből kiderült, hogy az RYBP fehérje a vad típusú egérben a szív és az agy mellett (17. ábra C, fekete nyilak) kimutatható még a farokkezdeményben és az allantoiszaan is (magenta nyilak). Az RYBP elsősorban a farok külső rétegeiben volt jelen (fekete nyilak), míg a farok belső sejtei RYBP fehérjére negatívnak bizonyultak (17. ábra, nyilak). A farokban az allantoisz közelében elhelyezkedő sejtek mutattak legerősebb RYBP festődést, a proximális farki régiókban az RYBP jel fokozatos csökkenése figyelhető meg, míg a szelvényekben (somites) teljesen eltűnik.



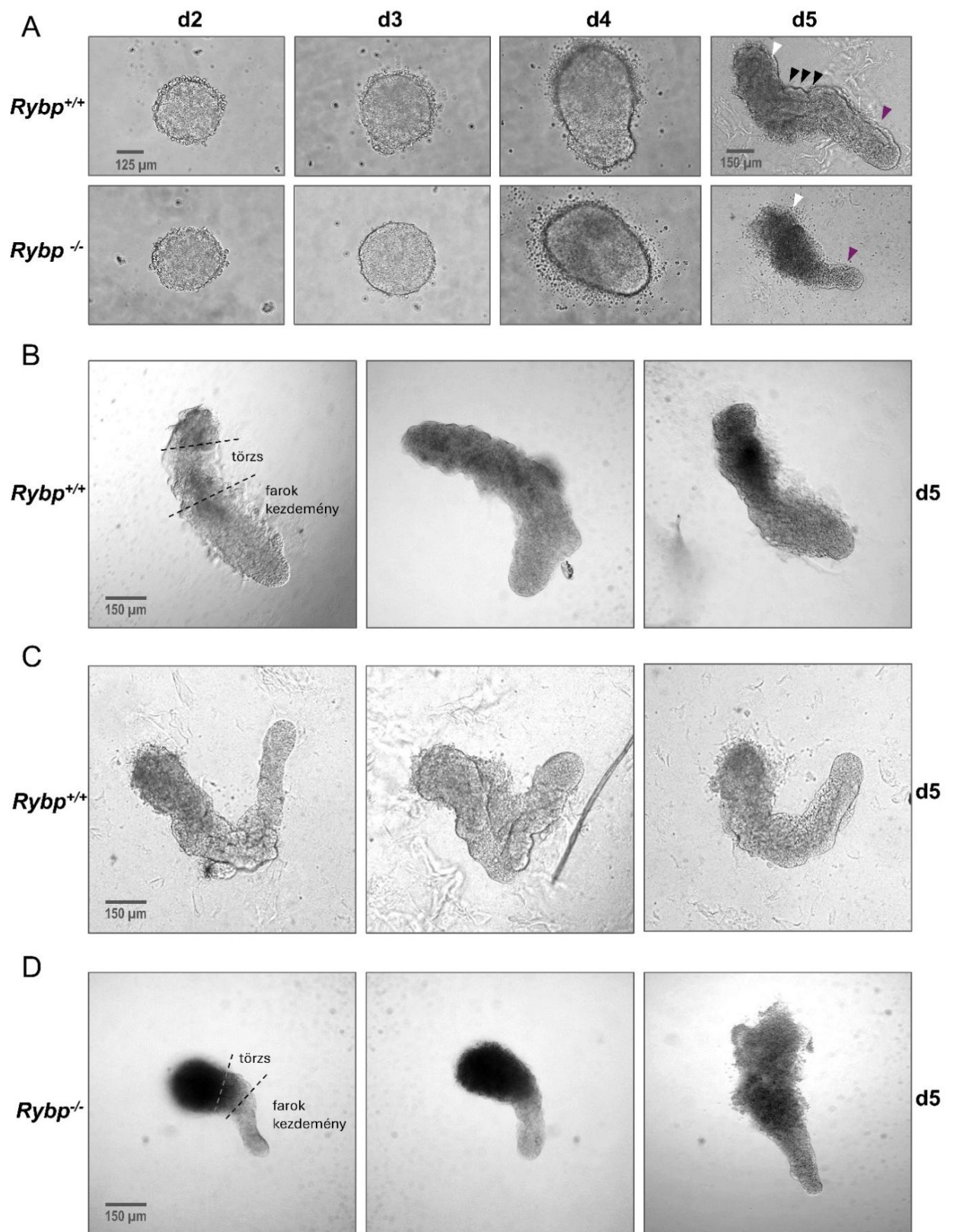
17. ábra: Az Rybp és a Brachyury koexpressziója detektálható volt több mezodermális sejt populációban is

(A) Az Rybp-t és a Brachyury-t együtt expresszáló sejtek aránya a 6,5-8,5 egér embrió különböző sejtípusaiban. (B) Az Rybp, Brachyury és más mezodermális marker gének (*Eomes*, *Gsc*, *Mesp1*, *Tbx6*) expressziója a különböző mezodermális populációkban. A pontdiagrammon a pontok színe az átlagos expresszió szintet míg a pontok mérete a géneket expresszáló sejtek százalékos arányát mutatja. NMP: neuromezodermális progenitorok, exe: extraembrionális (C) Vad típusú 8,5 napos egér embrió (E8,5) RYBP immunhisztokémiai festése RYBP fehérje jelenlétét mutatja az embrió központi idegrendszerében, a szívben, a farokkezdeményben és az allantoiszban. (D) Az RYBP⁺ sejteket a farokkezdemény felszíni sejtjeiben detektáltuk (fekete nyilak) míg a farokkezdemény belső sejt rétegei RYBP-re nézve negatívak voltak (megenta nyilak). barna: RYBP. Az immunhisztokémiai festések témavezetőm Dr. Pirity Melinda Katalin korábbi munkájából származnak. A PhD disszertációmban ezeket az általa készített felvételeket elemeztük újra. cns: központi idegrendszer, ht: szív, s: szelvények, tb: farok kezdemény (tailbud), al: allantoisz

Eredményeink azt mutatták, hogy az *Rybp* és a *Brachyury* gén koexpressziója már a primitív csík kialakulásakor megfigyelhető. Az *Rybp* és *Brachyury* mRNS-ek együttes jelenléte a legtöbb mezodermális klaszterben megfigyelhető volt, beleértve a naszcens és kaudális mezodermát is. Továbbá kimutattuk, hogy az RYBP fehérje jelen van a 8,5 napos embrió farokkezdeményben, ugyanabban a régióban, ahol a fejlődő egerekben a magas BRACHYURY szintet várjuk

5.6. Az *Rybp*^{-/-} gasztruloidok axiális irányú megnyúlása zavart szenved, ami megrövidült törzsi és farki fenotípust eredményez

A BRACHYURY gasztrulációban betöltött szerepe mellett az embrionális fejlődés során fontos szerepet játszik még az axiális megnyúlásban és a szegmentációban. A *Brachyury* génre heterozigóta mutációt hordozó egerek farka megrövidült fenotípust mutat (Stott, Kispert, és Herrmann 1993). Továbbá a különböző százalékban *Brachyury* null mutáns sejteket is tartalmazó gasztruloidokban, a mutáns sejtekkel arányosan csökken a gasztruloidok axiális megnyúlása (Wehmeyer és mtsai. 2022). A korábbi eredményeink fényében szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a *Brachyury*-hoz hasonlóan az *Rybp*-nek is lehet-e szerepe az axiális megnyúlásban.



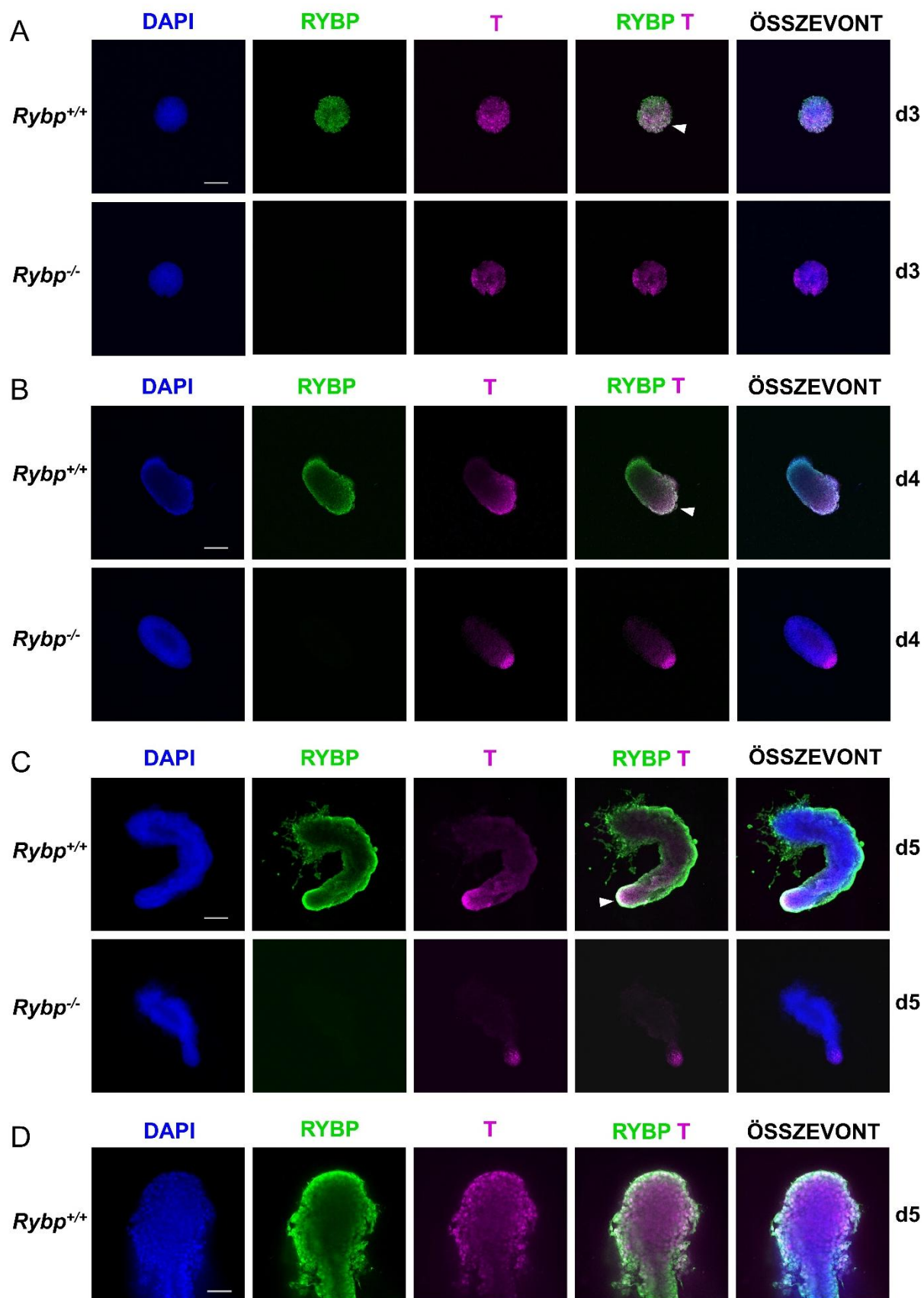
18. ábra: Az *Rybp*^{-/-} gasztruloidok csonka farok morfológiát mutatnak

(A) A fénymikroszkópos felvételeken az *Rybp*^{-/-} gasztruloidok a differenciáció 4. napjáig vad típusúhoz hasonló morfológiát mutatnak míg a differenciáció 5. napján a mutáns gasztruloidokban megváltozott morfológia és csonka farok fenotípus figyelhető meg. **(B)** A d5 vad típusú gasztruloidokban elkülöníthető a törzs és a farok kezdemény továbbá **(C)** néhány gasztruloid esetében megfigyelhető a E8,5 embriókra jellemző „V” morfológia. **(D)** A d5 *Rybp*^{-/-} gasztruloidokat a vad típusúhoz képest kevésbé strukturált törzs és abnormális anterior régió jellemzi. Spinning Disc konfokális mikroszkóp, Obj.: 20 x (d2-d4), 10x (d5), Mércse: 125 µm (d2-d4), 150 µm (d5) d: nap.

Ennek vizsgálatához PhD munkám során sikeresen adaptáltuk a van den Brink és társai által 2020-ban publikált protokollt, mely segítségével vad típusú és *Rybp*^{-/-} embrionális őssejtekből *in vitro* szelvényezett gasztruloidokat hoztunk létre.

A módszer során az őssejteket letapadás gátló sejtenyésző edényekben aggregáltattuk, majd 24 órás CHIR99021 (CHIR) kezeléssel aktiváltuk a sejtekben a WNT jelátviteli útvonalat, ami képes indukálni a mezoderma kialakulását és a gasztruloidok axiális megnyúlását. Kísérleteinkhez olyan gasztruloid rendszert választottunk, amely a 8,5 napos egér embriók törzsi és farki részét képesek modellezni, továbbá az axiális megnyúlás mellett a szelvények kialakítására is képesek (lásd: Anyagok és módszerek 4.3.). A gasztruloidokról először morfológiai képeket készítettünk.

A fénymikroszkópos képekből kiderült, hogy a vad típusú és *Rybp*^{-/-} gasztruloidok között a differenciáció 4. napjáig nem volt észlelhető morfológiai különbség (18. ábra A). A 10%-os matrigélbe ágyazást követően az 5 napos vad típusú gasztruloidokban elkülöníthetők a törzsi és farki struktúrák továbbá kialakul a szelvényezettség (18. ábra A, B). Ezenfelül a vad típusú gasztruloidok egy részében a 8,5 napos egér embriókra jellemző „V” alak is megfigyelhető (18. ábra C), ami arra utal, hogy megfelelő körülmények között a vad típusú gasztruloidok extraembrionális sejtek nélkül is képesek egy, az *in vivo* egérhez hasonló térbeli helyzet felvételére. A „V” alak kialakulását az eddig megjelent szelvényezett gasztruloidokat tartalmazó két cikkben még nem jellemezték (van den Brink és mtsai. 2020; Veenliet és mtsai. 2020).

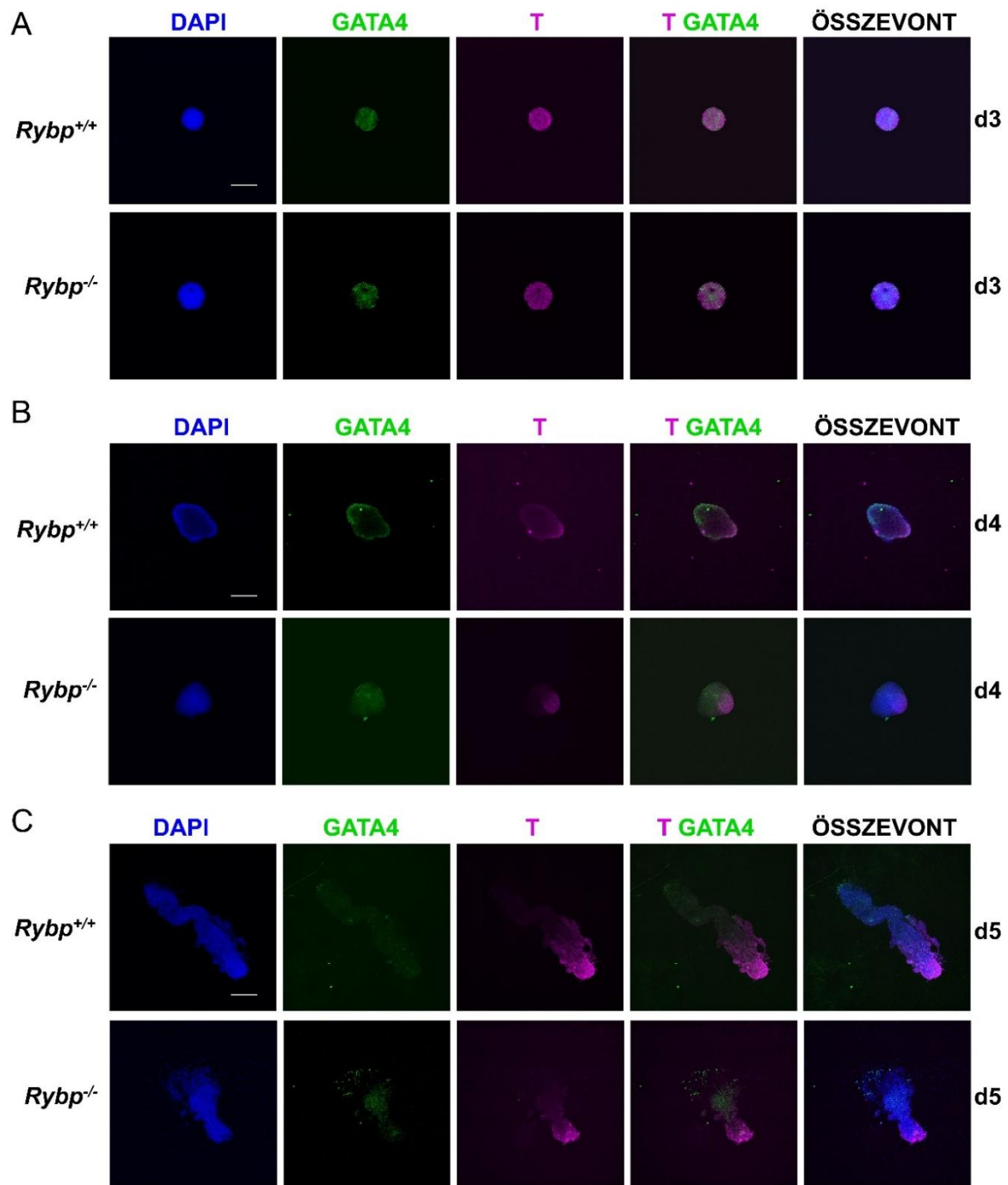


19. ábra: A vad típushoz képest az *Rybp*^{-/-} gasztruloidok kaudális régiójában alacsony BRACHYURY fehérje szint detektálható

*A vad típusú és *Rybp*^{-/-} gasztruloidok immuncitokémiai analízise a két sejtvonalban hasonló BRACHYURY fehérje szintet mutat a gasztruloid differenciáció (A)(B) korai (d3, d4) stádiumaiban és (C) alacsonyabb BRACHYURY szintet a differenciáció késői (d5) stádiumában. (D) Az RYBP és a BRACHYURY kolokalizálódik az 5 napos vad típusú gasztruloid farok kaudális régiójában. Spinning Disc konfokális mikroszkóp, Obj.: 10x (A-C), 40x (D), Mércse: 200 μm (A-C) és 50 μm (D). kék: DAPI, magenta: BRACHYURY(T), zöld: RYBP. d: nap.*

Ezzel ellentétben a mutáns gasztruloidok kevésbé tűntek fejlettnak, és a kaudális irányú megnyúlásuk elmaradt a vad típushoz képest (18. ábra A, D, magenta nyilak). Az *Rybp*^{-/-} gasztruloidok rövid farok fenotípusa nagy hasonlóságot mutat a korábban publikált *Brachyury*^{-/-} gasztruloidok fenotípusával (Wehmeyer és mtsai. 2022). Az *Rybp*^{-/-} gasztruloidok esetében viszont az *Rybp* hiánya nem csak a poszterior régiót, de az anterior régiót is érintette. Az *Rybp*^{-/-} gasztruloidok anterior része a fénymikroszkópos képeken a vad típushoz képest szélesebb, sötétebb és fragmentáltabb volt (18. ábra A, D, fehér nyilak), valószínűsíthetően a megnövekedett számú sejtpusztulás miatt. Továbbá, a kísérletek kivitelezése során a mutáns gasztruloidok a vad típushoz képest könnyebben elválnak a matrigél felszínétől, illetve az anterior régióban kevesebb letapadó sejt volt megfigyelhető.

A morfológiai képeket követően a begyűjtött gasztruloidokat RYBP és BRACHYURY immuncitokémiai festésnek vetettük alá. A fénymikroszkópos képekhez hasonlóan, a gasztruloid differenciáció korai szakaszában (3. és 4. nap) nem tudtunk észrevehető különbségeket detektálni a vad típusú és *Rybp*^{-/-} sejtvonalak között (18. ábra A, B). Mindkét sejtvonalban a sejtek többsége a 3. napon BRACHYURY+ volt, majd a 4. napon ez a pozitív populáció a gasztruloidok megnyúló részébe orientálódott. A vad típusú mintákban (d3 és d4) a BRACHYURY+ sejtek többsége RYBP+ is volt. A matrigélbe ágyazás után (d5) a BRACHYURY+ sejteket a farokkezdeményben detektáltuk míg az RYBP+ sejtek jelen voltak a farokkezdeményben, a törzs külső sejt rétegeiben és a gasztruloidok anterior matrigélhez tapadó sejtjeiben (19. ábra C). A mutáns gasztruloidokban a vad típushoz képest összességében kevesebb BRACHYURY+ sejtet detektáltunk. A BRACHYURY+ sejtek a gasztruloidokon belül, a vad típushoz hasonlóan, a farokkezdemény kaudális régiójában helyezkedtek el. Azonban míg a vad típusban a BRACHYURY+ sejtek a gasztruloid farokban szétterjedten



20. ábra: A GATA4⁺ sejtek száma lecsökkent a vad típusú és *Rybp*^{-/-} gasztruloidokban

A vad típusú és *Rybp*^{-/-} gasztruloidok immuncitokémiai analízise alapján a gasztruloid differenciáció (A)(B) korai stádiumaiban (d3, d4) a két sejtvonalban hasonló GATA4 fehérje szintet mutat. (C) A differenciáció előhaladásával a GATA4 fehérje szintje mindkét sejtvonalban csökken, azonban a késő stádiumában (d5) a mutánsban valamennyivel több

GATA4+ sejt detektálható. Spinning Disc konfokális mikroszkóp, Obj.: 10x, Mérce: 200 μ m. kék: DAPI, magenta: BRACHYURY(T), zöld: GATA4, d: nap.

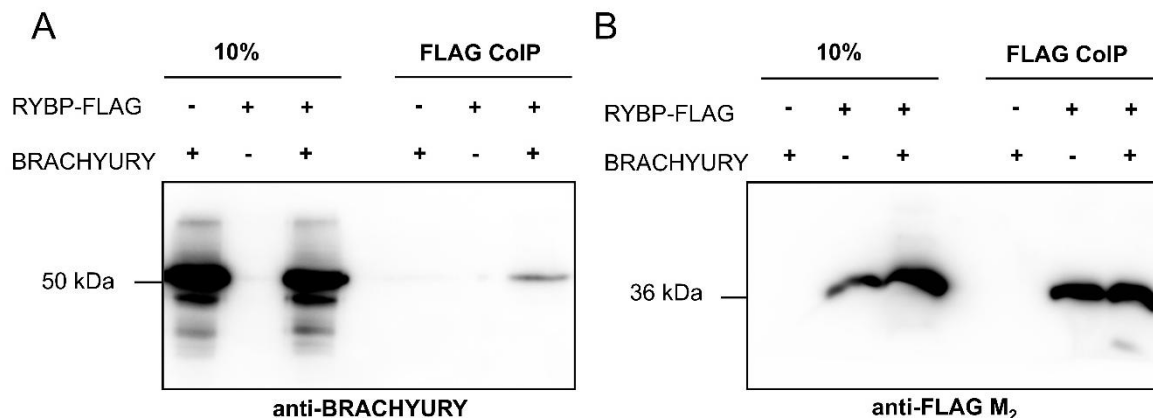
detektálhatók, a mutánsban a BRACHYURY+ sejtek a farokkezdemény csúcsára korlátozódtak. A nagyobb nagyítással készült felvételeken a vad típusú sejtekben az RYBP és a BRACHYURY a farok végében kolokalizációt mutatott (19. ábra D) abban a régióban, ahol a kaudális mezoderma és a neuromezodermális progenitor populációkat várjuk.

Az endoderma kialakulásának nyomon követéséhez a gasztruloidokon BRACHYURY és GATA4 immuncitokémiát is végeztünk. A korai időpontokban (3. és 4. nap) a vad típusú és *Rybp*^{-/-} gasztruloidok között a GATA4+ sejtek számában nem volt észlelhető különbség (20. ábra A, B). A 3. napon mindkét sejtvonalban relatív magas GATA4+ sejtszám volt megfigyelhető, azonban a gasztruloidok megnyúlásával a GATA4+ sejtek száma csökkenni kezdett.

Eredményeink azt mutatják, hogy a BRACHYURY-hoz hasonlóan az RYBP fehérje jelenléte is elengedhetetlen a gasztruloidok megfelelő axiális megnyúlásához. RYBP hiányában a gasztruloidokat megrövidült farki morfológia jellemzi, továbbá a mutáns gasztruloidokban a BRACHYURY+ sejtek száma alacsony, míg a GATA4+ sejtek száma megnövekedett a vad típushoz képes. Mindezek alapján eredmények arra utalnak, hogy *Rybp* hiányában a gasztruloidok nem képesek megfelelő differenciációra, ezért megragadnak a fejlődés egy korábbi stádiumában.

5.7. Az RYBP képes fizikai interakcióba lépni a BRACHYURY fehérjével

Kísérleteinkben a különböző differenciációs modellek az egér embrió fejlődésének eltérő stádiumait reprezentálják. Mivel ezen modellek sejtjeiben az RYBP és a BRACHYURY fehérje együttes jelenléte volt kimutatható, kíváncsiak voltunk, amellet, hogy az RYBP szükséges a *Brachyury* gén megfelelő termelődéséhez, a két fehérje képes-e interakcióba is lépni egymással és potenciálisan komplexet alkotni. Ennek vizsgálatához vad típusú egér őssejteket kardiális irányba differenciáltattuk, és a differenciáció negyedik napján (d4), amikor a legmagasabb *Brachyury* expresszió várható, teljes RNS mintát gyűjtöttünk. A begyűjtött mintákat templátnak használva 1367 bp hosszúságú *Brachyury* cDNS-t írtuk át, majd a szintetizált cDNS-t enzimek segítségével prk7 vektorba klónoztuk (21. ábra A, lásd: Anyagok és módszerek 4.9.).

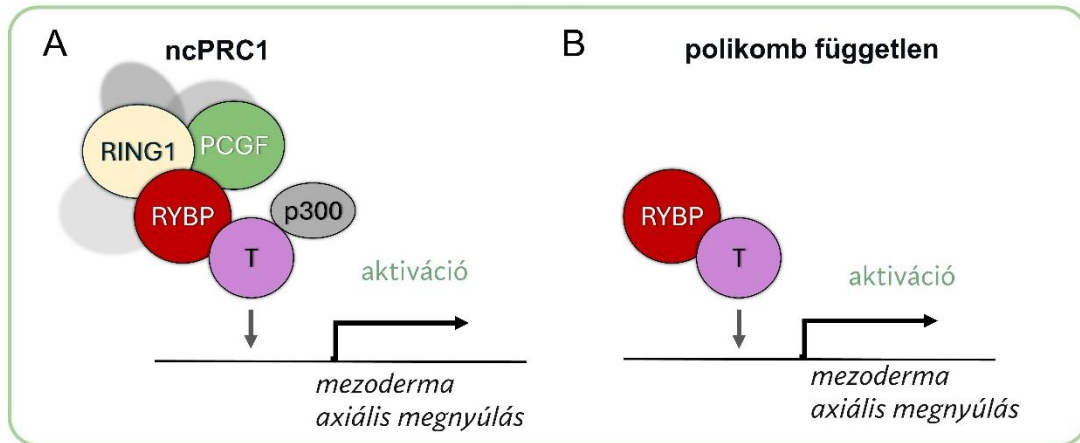


21. ábra: Az RYBP közvetlenül kapcsolódik a mezodermális BRACHYURY fehérjéhez

(A) Az ábrán a ko-immunprecipitáció FLAG-pull anti-BRACHYURY western blot és (B) a FLAG-pull anti-FLAG M2 western blot felvételei láthatók, melyből kiderül, hogy az RYBP és a BRACHYURY fehérje képes közvetlen kölcsönhatásra. kDa: kilodalton, kb: kilo bázis bp: bázis pár.

Ezután, az *Rybp-FLAG* (*Rybp*-cDNS pc.DNA3.1-FLAG vektor) és az újonnan előállított *prk7-Brachyury* vektort HEK293 sejtekbe transzfektáltuk, és ko-immunprecipitáció (CoIP) segítségével megvizsgáltuk a két fehérje közötti interakciót. A fehérjék expressziójának ellenőrzéséhez, és a ko-immunprecipitáció kimutatásához az input és precipitációs mintákról anti-BRACHYURY (21. ábra A) és anti-FLAG-M2 western blot-ot készítettünk (21. ábra B).

A CoIP eredményből kiderült, hogy az RYBP és a BRACHYURY fehérje képesek fizikai kölcsönhatásba lépni egymással. Ami arra utal, hogy a két fehérje az embrionális fejlődés során képes kapcsolódni, komplexet alkotni és egy komplexben akár együttes génszabályozó funkciókat ellátni (22. ábra). Úgy véljük a mezoderma és az axiális megnyúlás szabályozása is az RYBP és a BRACHYURY közös komplexeinek szabályozása alatt állhat, ami ncPRC1 függő (22. ábra A) és polikomb független (22. ábra B) mechanizmuson keresztül is megvalósulhat.



22. ábra: Hipotézis ábra az RYBP és a BRACHYURY polikomb függő és polikomb független mechanizmusáról

Az RYBP és a BRACHYURY potenciális (A) polikomb függő szabályozásának és (B) polikomb független szabályozásának sematikus reprezentálása. ncPRC1: nem kanonikus Polikomb Represszív Komplexek, RING1: Ring Finger Protein 1, PCGF: Polycomb Group Ring Finger, RYBP: RING1 and YY1 Binding Protein, T: BRACHYURY, p300: E1A Binding Protein P300

6. Eredmények megvitatása

A PhD munkám során az *in vitro* összejt alapú modellrendszerek széles palettáját alkalmazva mutattuk ki, hogy az RYBP, ami az ncPCR1 komplex egyik központi tagja, elengedhetetlen a fő csíralemezek fejlődéséhez és a megfelelő gasztrulációhoz.

Korábbi eredményeinkből kiindulva dolgozatomban első lépésként az RYBP PLAGL1-en, keresztüli szabályozását elemeztük tovább. Csoportunk kimutatta, hogy a késői kardiális transzkripció faktor PLAGL1 szabályozza a szarkomer fehérjék termelődését, és ez a folyamat az RYBP és az NKX2-5 közvetlen szabályozása alatt áll (Henry és mtsai. 2023). RYBP hiányában a PLAGL1 fehérje a mutáns kardiális telepekben nem termelődik, és ennek következtében a szívizomsejtek differenciációja sérül. Ezen dolgozat keretében megvizsgáltuk, hogy a szívizomsejteken kívül van-e más, a szív felépítésében részt vevő olyan sejttípus, aminek a kialakulását az RYBP a PLAGL1-on keresztül szabályozhatja. *In vitro* 2D-s kardiális differenciációs modell segítségével kimutattuk, hogy a vad típusú telepekben a PLAGL1 részt vesz a szív ereinek falában lévő simaizom sejtek, a szív regenerálásban fontos szerepet játszó mezenchimális sejtek (Chung és mtsai. 2011; Karantalis és Hare 2015; White és mtsai. 2016), és a szív neurális sejttípusainak kialakításában, viszont jelenléte nem volt detektálható a szív endotéliális sejtjeiben (9. ábra).

A PLAGL1 szerepét a gerincvelő és a központi idegrendszer fejlődésében már számos tanulmányban leírták. *Plagl1* null mutáns egerekben károsodik a kisagy neurális sejtjeinek fejlődése, *Plagl1* hiányában a neokortikális progenitorok a vad típushoz képest csökkent proliferációt mutatnak, ugyanakkor helyettük több neuron termelődik (Chung és mtsai. 2011). Továbbá kimutatták, hogy a túl magas és túl alacsony PLAGL1 szint is negatívan befolyásolja a neurális sejtek differenciációját. Mindkét esetben neurális migrációs és morfológiai hibák figyelhetők meg, ami arra utal, hogy a PLAGL1 dózis is fontos a neurális sejtek differenciációjában (Adnani és mtsai. 2015; Rakli és mtsai. 2016). A PLAGL1 jelen van a szív neurofilamentum markerrel jelölt neurális sejtjeiben, ami arra utal, hogy a PLAGL1-nek a központi idegrendszerben játszott szerepéhez hasonló funkciója lehet a szív beidegzésében is. A szív szimpatikus és paraszimpatikus neurális sejtjei szabályozzák a szív megfelelő ritmikus összehúzódását, így fontos szerepet töltenek be a szív működésben.

Habár a PLAGL1 nem detektálható a szív endotéliális sejtjeiben, ugyanez nem mondható el az RYBP-ről. Immuncitokémiai analízis segítségével kimutattuk, hogy az RYBP jelen van a vad típusú endotéliális sejtekben, és hiánya veszélyezteti a szív endotél sejtek specifikációját (10.

ábra). Mindezek arra utalnak, hogy az endotéliális sejtek elköteleződését az RYBP egy PLAGL-tól független mechanizmuson keresztül szabályozza. Kimutattuk, hogy a vad típushoz képes az *Rybp*^{-/-} telepekben mind a kardiális, mind pedig az endotéliális progenitor markergének csökkent expressziója és fehérje szintje figyelhető meg (12. ábra). Mivel mindkét progenitor sejttípus a mezodermből eredeztethető, ezért következő lépésként megvizsgáltuk az RYBP szerepét a mezoderma kialakulásában. Ehhez a korai progenitor stádiumban nyomon követtük a relatív génexpresszós változásokat és kimutattuk, hogy *Rybp* hiányában a mezodermális és az endodermális marker gének expressziója szignifikánsan lecsökkent (13. ábra). Ezzel szemben az ektodermális gének expressziója megnövekedett, ami arra utal, hogy *Rybp* hiányában a sejtek differenciációja mezoderma és endoderma helyett ektodermális irányba tolódik el. Vagyis az *Rybp* fontos a csiralemezek megfelelő arányban történő termelődéséhez. Hasonló fenotípust írtak le a *Brachyury* null mutáns embriók (E7) esetében is, melyek gasztrulációját a vad típushoz képest alacsony mezoderma/ektoderma arány, és késleltetett endoderma kialakulás jellemzett (Yanagisawa és mtsai. 1981). Kimutatták, hogy mind a BRACHYURY, mind pedig az EOMES fehérje, melynek génexpressziója szintén alacsonyabb volt a mutánsban, képesek megváltoztatni a kromatin állapotát, mellyel egyidejűleg növelik a mezoderma és endoderma kialakulását, és csendesítik a neuroektodermális specifikációt (Tosic és mtsai. 2019). Eredményeink azt mutatják, hogy *Rybp* mutáns tenyészetekben megfigyelt korai fenotípus a *Brachyury* alacsony génexpressziójára vezethető vissza, mely magyarázhatja mind az alacsony mezodermális, endodermális specifikációt, mind a megnövekedett ektoderma szintet. Ugyanakkor a megnövekedett ektodermális génexpresszió akár az RYBP repressziós funkciójára is utalhat ezekben a sejtekben, melynek megállapítása további vizsgálatokat igényel. A mutánsokban megfigyelt alacsony BRACHYURY fehérje szint (13. ábra) magyarázhatja mind a kardiális, mind pedig az endotéliális progenitor marker gének alacsony expresszióját, amelyek kifejeződése még az NKX2-5 és a PLAGL1 szabályozása előtt nyilvánul meg. A mutáns telepek érése során a korai kardiális és endotéliális transzkripciós faktorok pl. a MESP1, ISL-1 és GATA4 alacsony szintje a PLAGL1 hiányához hasonlóan (Henry és mtsai. 2023) befolyásolja az érett szívizom sejtek megfelelő kialakítását, és a szarkomer fehérjék megfelelő termelődését. Így megállapítható, hogy RYBP hiányában a sejtek differenciációja több stádiumban is sérül, és valószínűleg ezek együttes hatása eredményezi az *Rybp*^{-/-} telepekben megfigyelt kontraktilitási defektust (Henry és mtsai. 2020; Ujhelly és mtsai. 2015).

2D-s szív irányú differenciációs modell és 3D-s embrionális testek segítségével kimutattuk, hogy az RYBP és a BRACHYURY sejtmagi kolokalizációt is mutat a korai progenitor differenciációs stádiumban (13. és 15. ábra). A vad típusú és az *Rybp*^{-/-} embrionális testek immuncitokémiai analíziséből kiderült, hogy a BRACHYURY⁺ sejtek eloszlása az embrionális testekben eltér a két sejtvonalban (15. és 16. ábra). A mutánsokban a BRACHYURY⁺ sejtek az embrionális testeken belül egy régióra korlátozódnak, míg a vad típusú EB-kben ugyanez nagyobb területen szétszórtan detektálható. Ez arra utal, hogy az RYBP hiánya hatással lehet a mezodermális sejtek migrációjára is. Több PRC1 komplex tagról is ismert, hogy fontos szerepet tölt be számos sejtmozgáshoz köthető folyamatban. Az AUTS2-ről (Activator Of Transcription And Developmental Regulator AUTS2), ami a PRC1.3 és a PRC1.5 komplex tagja, kimutatták, hogy az agy embrionális fejlődése során szabályozhatja a kortikális neuronok migrációját (Gao és mtsai. 2014; Liu és mtsai. 2023). Az RYBP-ről is több tanulmány megjelent korábban, melyek az RYBP-t a tumorok metasztatikus áttételéhez kötik (Maybee és mtsai. 2022). Úgy gondoljuk, hogy a mutáns EB-kben a csíralemezek kialakulásakor megfigyelt fenotípus az alacsony *Brachyury* és *Eomes* génexpresszióval is magyarázható, mivel mindkét fehérjéről korábban leírták, hogy elősegítik a mezodermális sejtek migrációját és az epiteliális-mezenchimális átmenetet (Arnold és mtsai. 2008; Turner és mtsai. 2014). Továbbá a BRACHYURY az RYBP-hez hasonlóan dóziszfüggő fehérje, melyről kimutatták, hogy szintje közvetlenül befolyásolja az EMT időzítését, és ezzel együtt a sejtmigráció kezdetét (Bulger és mtsai. 2024; Stott és mtsai. 1993). A sejtek megfelelő migrációjához először a sejtek közötti kapcsolatoknak kell lazulniuk. Nemrégiben egy humán gasztrulációs modellben leírták, hogy a BRACHYURY szintjének változása az EMT során hatással van a sejtek közötti adhézis fehérjék és sejtkapcsoló struktúrák mennyiségére (Bulger és mtsai. 2024). Ehhez hasonló fenotípust detektált csoportunk korábban a 8 napos kardiális progenitorok transzkriptom adatainak elemzésekor. A vad típusú és *Rybp*^{-/-} transzkriptom eredményeket összehasonlítva kiderült, hogy az RYBP hiánya több a sejtek közötti kapcsolatokért felelős kadherin gén (*Cdh6*, *Cdh7* és *Cdh17*) expressziójának csökkenését eredményezi (Henry és mtsai. 2020) a kardiális differenciáció késői progenitor stádiumában. Az RYBP mezodermális sejtek migrációjában és az EMT-ben betöltött szerepét, és a folyamatban részt vevő adhézis fehérjéket ezidáig még nem vizsgálták. A pontos molekuláris mechanizmus felderítéséhez további kutatások szükségesek. A mezoderma mellett az EOMES fehérje fontos még az egér gasztruláció során a definitív endoderma kialakulásához is: a *Brachyury* és *Eomes* génekre nézve kettős mutáns sejtek (dKO) *in vitro* vizsgálatokban nem voltak képesek sem mezoderma sem pedig definitív endoderma kialakítására (Tosic és mtsai.

2019). Ez a fenotípus hasonlít az *Rybp*^{-/-} EB-kben megfigyelthez. Az *Rybp*^{-/-} EB-kben jelentősen kevesebb GATA4⁺ sejt volt megfigyelhető (15. és 16. ábra). A GATA4 fehérje, ami a korai embrionális fejlődés során endodermális szövetek markereként ismert, és képes jelölni a primitív, viszcerális és definitív endodermát (Holtzinger és Evans 2010; Simon és mtsai. 2018), a BRACHYURY-hoz hasonlóan sejtmagi kolokalizációt mutatott az RYBP-vel (15. ábra). Hasonló kísérleti elrendezésben korábban bizonyították, hogy a GATA4 egy viszonylag korai progenitor stádiumban egy nem sejt autonóm mechanizmuson keresztül képes elősegíteni a szívizomsejtek kialakulását (Holtzinger és mtsai. 2010; Yilbas és mtsai. 2014). Továbbá az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a mezoderma mellett az endoderma réteg is szükséges a megfelelő szív progenitor sejtek kialakulásához, ezért az endoderma markerek mRNS szintjének csökkenése, és az alacsony GATA4 fehérje szint is szerepet játszhat az *Rybp*^{-/-} kardiális telepekben megfigyelt kontraktilitási fenotípus kialakulásában (Henry és mtsai. 2020; Ujhelly és mtsai. 2015).

A PhD dolgozatomban mutattunk ki először, hogy az RYBP jelenléte szükséges az *in vitro* gasztruloidok axiális irányú megnyúlásához. Munkám során vad típusú és *Rybp* null mutáns *in vitro* gasztruloidok létrehozásával át tudtuk hidalni az *Rybp*^{-/-} egér embriók korai letalitását. Az utóbbi években megjelent 3D-s gasztruloid modellek lehetőséget biztosítottak számunka, hogy tanulmányozni tudjuk az embrionális fejlődés korai eseményeit, és az RYBP szerepét a gasztruloidok tengely menti megnyúlásában, amit más modellrendszerekben vagy *in vivo* kísérleti rendszerekben korábban nem tudtuk vizsgálni (7. és 18. ábra). Érdekes módon, a korai gasztrulációs szakaszban (d3, d4) a két sejtvonal között nem detektáltunk morfológiai eltéréseket, és az immuncitokémiai eredményeink is azt mutatták, hogy a WNT jelátviteli útvonal indukciója, mely közvetlenül képes aktiválni a *Brachyury* expresszióját (Arnold és mtsai. 2000), részben képes volt menekíteni a BRACHYURY fehérje szintjét az *Rybp* mutáns gasztruloidokban. Azonban a CHIR hozzáadása nem volt elegendő a gasztruloidok farki BRACHYURY szintjének helyreállításához és a gasztruloidok megfelelő kaudális irányú megnyúlásához (19. ábra). Ennek következtében az 5 napos *Rybp*^{-/-} gasztruloidok farki régiója a vad típushoz viszonyítva rövidebb volt. (18. és 19. ábra).

Eredményeink összhangban vannak a korábbi tanulmányokkal is, melyekben kimutatták, hogy a BRACHYURY magas dózisu jelenléte a farok kezdeményben elengedhetetlen az embriók megfelelő axiális megnyúlásához, és a BRACHYURY szintjének fokozatos csökkenése arányosan rövidülő farkat eredményezett (Herrmann 1991; Stott és mtsai. 1993). Az axiális megnyúlás során a farok kezdeményben található BRACHYURY⁺ kaudális mezoderma

populáció a farok növekedésével poszterior irányba mozog, hogy neuromezodemális progenitorokat alakítson ki (van den Brink és mtsai. 2020). Ez a folyamat nagy hasonlóságot mutat a gasztrulációval, mindkettőben a sejteket gyors osztódás és a progenitor stádiumból való kilépés jellemzi, ezért „másodlagos gasztrulációnak” is nevezik (Arias és mtsai. 2022; Bardot és Hadjantonakis 2020). Eredményeink arra utalnak, hogy az RYBP és BRACHYURY együtt kell, hogy jelen legyen a farokcsomóban ahhoz, hogy a sejtek képesek legyenek elhagyni a poszterior differentciációs frontot és megkezdjék a szomitogenezist, és gerincvelői neuronok kialakítását (19. ábra). RYBP hiányában a mutáns gasztruloidokban valamennyivel több GATA4+ sejt volt detektálható. Ez az alacsony BRACHYURY szinttel, és a mutánsokban megfigyelt morfológiai változásokkal együtt arra utal, hogy *Rybp* hiányában a gasztruloidok nem képesek megfelelő növekedésre, ezért a mutánsok megragadnak a fejlődés egy korábbi stádiumában.

Az *Rybp* null mutánsok gasztruloidokat egy sötét, fragmentált anterior régió is jellemezte, ami a *Brachyury*^{-/-} mutáns gasztruloidokban nem volt megfigyelhető (Wehmeyer és mtsai. 2022), és valószínűleg az *Rybp*^{-/-} gasztruloidok megnövekedett sejthalálának tudható be. Az RYBP-ről ismert, hogy fejlődési stádium és szövet specifikusan proapoptotikus vagy antiapoptotikus mechanizmusokban is részt vehet (Fereses és mtsai. 2014; Zheng és mtsai. 2001). Az *Rybp*^{-/-} gasztruloidok anterior részén a matrigélbe ágyazást követően alacsony számú letapadó sejt figyelhető meg, ami arra utal, hogy az RYBP-nek az implantációs stádiumban szerepe lehet az adhéziós funkciókban is, ami magyarázhatja az *Rybp*^{-/-} egémbriókban megfigyelt beágyazódási letalitást. Ezt megerősíti az is, hogy a vad típusú gasztruloidok immuncitokémiai kísérletekben RYBP pozitivitást mutatnak az anterior régióban az implantáció pontos helyén. Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a kísérleteimben alkalmazott gasztruloid modell rendszer a jövőben alkalmas lehet az axiális megnyúlás mellett az apoptotikus folyamatok és a beágyazódási mechanizmusok tanulmányozására is. Habár a gasztruloid modell rendszerek új *in vitro* megközelítést jelentenek ezen folyamatok vizsgálatára, általuk csak az RYBP embrionális szövetekben betöltött szerepe vizsgálható. Az RYBP-ről azonban már korábban kimutattuk, nagy mennyiségben van jelen az extraembrionális szövetekben is (Pirity és mtsai. 2005) pl. különösen magas RYBP szint figyelhető meg a trofoblaszt óriás sejtekben, melyek méhlepény fejlődését szabályozó hormonok szekréciójáért felelősek, és fontos szerepet játszanak az implantációban (Hu és Cross 2010). Az RYBP funkciója az extraembrionális sejtekben még nem ismert. Eredményeink alapján elképzelhető, hogy jelenléte mind az embrionális, mind pedig az extraembrionális sejtekben szükséges a megfelelő beágyazódáshoz.

Ennek tisztázása további vizsgálatokat igényel. Az RYBP és BRACHYURY szabályozási mechanizmusának vizsgálatához a PhD dolgozatom során létrehoztunk egy BRACHYURY fehérjét túltermeltető vektort, és ko-immunprecipitáció segítségével kimutattuk, hogy az RYBP a *Brachyury* génexpressziójának szabályozása mellett képes fizikai kölcsönhatást létrehozni a BRACHYURY fehérjével (21. ábra). A két fehérje közötti kölcsönhatás arra utal, hogy a korai embrionális fejlődés során együttesen szabályozhatják a mezoderma kialakítását és az axiális megnyúlást (22. ábra). Az RYBP-ről ismert, hogy egy multifunkcionális rendezetlen fehérje (intrinsically disordered protein (IDP)), bizonyítottan DNS kötő doménnel nem rendelkezik (Neira és mtsai. 2009). Az RYBP szabályozó funkcióját általában más DNS kötő partner a fehérjéken keresztül, azok célgénhez való toborzásával képes kifejtetni, ezért „moonlighting” fehérjének is nevezik. Ez a szabályozás történhet polikomb függő vagy polikomb független mechanizmuson keresztül (22. ábra). Korábban csoportunk az NKX2-5-öt, mint polikomb független RYBP partnert azonosított (Henry és mtsai. 2023), és más irodalmi adatokban is fellelhető számos polikomb független RYBP partner (Garcia és mtsai. 1999; Li és mtsai. 2017; Schlisio és mtsai. 2002). Mégis valószínűbb, hogy a mezoderma kialakítása polikomb függő mechanizmuson keresztül valósul meg. Erre utal az is, hogy az ncPRC1 komplex központi fehérjéről, beleértve a RING1B, PCGF1, PCGF2, PCGF3 és PCGF5-öt szintén leírták, hogy szükségesek a megfelelő gasztrulációhoz, és hiányukban az egér embriókat az *Rybp*^{-/-}-hoz hasonlóan csökkent *Brachyury* génexpresszió jellemzi (Meng és mtsai. 2020; Morey és mtsai. 2015; Voncken és mtsai. 2003; Yan és mtsai. 2017; Zhao és mtsai. 2017). Habár a felsorolt központi komplex tagokra null mutáns egerekben az *Rybp*^{-/-} egerekhez hasonlóan alacsony mezoderma szint volt jellemző, a másik két csíralemez (ekto- és endoderma) esetében nem ilyen egyértelmű a fenotípus. A PCGF mutánsokban az endodermális markerek expressziója sok esetben nem változott, míg az ektodermális markerek pont ellenkező irányba tolódtak el, mint az *Rybp*^{-/-} telepekben. Mindezek arra utalnak, hogy a csíralemezek szabályozását egymástól eltérő összetételű polikomb komplexek végzik, melyek összetétele határozza meg, hogy ki kapcsolódhat még a komplexhez, és az adott esetben aktivációs vagy repressziós hatás érvényesül.

Az *Rybp* null mutáns és a *Ring1b* null mutáns egerek fenotípusában számos további hasonlóság is megfigyelhető. A *Ring1b*^{-/-} embriók gasztrulációs letalitást mutatnak, továbbá azon null mutáns embriók melyekben a CDKN2A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A) sejtciklus inaktivátort gátolták, azzal a céllal, hogy menekítsék a fenotípust, képesek voltak ugyan a gasztrulációra, de a növekedésük ennek ellenére a gasztrulációt követően megállt, és az

embriókat abnormális axiális megnyúlás és szomitogenezis jellemezte (Voncken és mtsai. 2003). A *Ring1b*^{-/-} embriókra jellemző fenotípus nagy hasonlóságot mutat az *Rybp*^{-/-} gasztruloidokban megfigyeltekhez.

Továbbá a polikomb csoport fehérjéről ismert, hogy egyik fő célgén csoportjai a Hox gének (Gentile és Kmita 2020), melyek esszenciális szerepet játszanak a szelvényezettség kialakításában (Wellik 2007). A különböző Hox gének eltérő szelvényekben expresszálnak, ezzel biztosítva a különböző struktúrák megfelelő helyeken történő kialakítását. A polikomb fehérjecsoport tagjai a Hox géneket folyamatos represszió alatt tartják, míg azok működése elengedhetetlenné nem válik az embrió fejlődése során. Az *Rybp* mRNS-ek jellegzetes expressziója mutatható ki a fejlődő 9,5 napos egérembriók központi idegrendszerében, a neurális szelvényekben, az ún. rhombomerek közötti határokon (Garcia és mtsai. 1999). Úgyszintén a *Ring1A* egy hipomorf mutációja homeotikus transzformációkat okozott az egérembriók gerincoszlopában, ami szintén igazolta a polikombok szelvényezettség kialakításában betöltött kritikus szerepét (Schoorlemmer és mtsai. 1997).

A polikomb függő szabályozási mechanizmus fennállását tovább erősíti, hogy a BRACHYURY-ról korábban kimutatták, hogy epigenetikai faktorok toborzásával egy autoregulációs mechanizmuson keresztül képes szabályozni saját termelődését. A mechanizmus során a BRACHYURY közvetlen interakcióba lép a p300 (E1A Binding Protein P300) hiszton-acetiltranszferáz fehérjével (Beisaw és mtsai. 2018), melyen keresztül képes a *Brachyury* H3 hiszton 27. lizinjének acetilálására (H3K27ac). A H3K27 acetilációs jel biztosítja a kromatin nyitott szerkezetét a *Brachyury* enhanszerén, ezzel együtt a folyamatos, megnövekedett *Brachyury* expressziót, ami elengedhetetlen az embriók normál axiális megnyúlásához. A p300 fehérjét korábban az ncPRC1-ek fontos tagjaként írták le, egy már ismert polikomb függő génaktivációs mechanizmus során (Liu és mtsai. 2021). Az ncPRC1.3 és ncPRC1.5 aktivációs komplexekben a p300 az AUTS2 fehérjén keresztül kapcsolódik a PCGF3 és PCGF5 központi tagokhoz, és H3K27ac poszttranszlációs módosításon keresztül befolyásolja a központi idegrendszer fejlődéshez fontos gének expresszióját. Úgy gondoljuk a mezoderma kialakításának és az axiális megnyúlás szabályozásában is hasonló mechanizmus mehet végbe, azzal a különbséggel, hogy a p300 fehérjét az AUTS2 helyett a BRACHYURY-t toborozhatja a ncPRC1 komplexhez a BRACHYURY-RYBP interakción keresztül (22. ábra).

A gasztruloidokon végzett kísérleteink arra utalnak, hogy az RYBP valószínűleg részt vehet a BRACHYURY autoregulációs mechanizmusában is, ami magyarázhatja az *Rybp* hiányakor

megfigyelt alacsony *Brachyury* expressziót. Ezt megerősíti az is, hogy a BRACHYURY autoregulációs mechanizmusa a WNT jelátviteli útvonaltól független mechanizmuson keresztül valósul meg, és a gasztruloidokhoz hasonlóan a WNT jelátvitel indukálása (WNT ligandumok biztosításával) nem volt képes menekíteni a kaudális *Brachyury* szintet azokban az embriókban, ahol a BRACHYURY p300-kötő részét T^{Y88A} pontmutációval (A BRACHYURY 88. tirozinjét alaninra cserélték) módosították (Beisaw és mtsai. 2018). Az T^{Y88A} mutáns egerek képesek a gasztrulációra, ugyanakkor E8.0-E9.5 embriók fejlődésébe messze elmarad a vad típusától. Bennük sérül a szomitogenesis, a sejtek közötti adhézió és károsodik a vérsejtek, valamint a szív és a vérerek felépítésében résztvevő endotéliális sejtek differenciációja. Az RYBP-ről ismert, hogy fontos szerepet játszik a vérsejtek elköteleződése során a különböző vérsejttípusok kialakításában. Az RYBP kondicionális mutáns felnőtt egerekben kimutatták, hogy megváltozik a B1/B2 vér progenitor sejtek aránya (Calés és mtsai. 2016; Chagraoui és mtsai. 2018). Érdekes módon a vad típusú embriókból származó scRNA-Seq eredményeinkben is a legnagyobb *Rybp* és *Brachyury* koexpresszió a korai hematoendotéliális progenitor sejtekben volt kimutatható (17. ábra A). Mindezek azt mutatják, hogy az RYBP és a BRACHYURY együttes szabályozása valószínűleg nemcsak a mezodermális sejttípusokra és az axiális megnyúlásban résztvevő kaudális mezoderma sejtekre korlátozódik, hanem szerepet játszhatnak más sejttípusok elköteleződésében is.

Összességében, a PhD disszertációm során különböző 2D-s és 3D-s *in vitro* megközelítések alkalmazásával vizsgáltuk az RYBP, ncPRC1 központi tag korai fejlődésben betöltött szerepét, különösen nagy hangsúlyt fektetve a mezodermális sejtvonalak kialakulására. A különböző *in vitro* modell rendszerek kombinációja révén betekintést nyertünk az *Rybp*^{-/-} embriók korai fenotípusába, mely a null mutáns embriók korai letalitása miatt *in vivo* nehezen tanulmányozható. Az emlős sejtekkel végzett kísérleteink továbbá segíthetnek megérteni a humán embriók korai fejlődését, és az implantációs rendellenességek hátterében álló molekuláris folyamatokat, melyek vizsgálata emberek esetében nem lehetséges. Bemutatott eredményeink feltehetően hozzájárulnak a gasztruláció és az axiális megnyúlás folyamatainak részletesebb megértéséhez, és a polikomb fehérjékkel kapcsolatos ismereteink bővítéséhez.

7. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Pírity Melinda Katalin tudományos főmunkatársnak, hogy lehetőséget biztosított számomra az Embrionális és Indukált Pluripotens Össejt Csoportban készíthessem el PhD értekezésem. Köszönöm a folyamatos szakmai és szellemi támogatást. Az évek alatt megtanította nekem a tudományos gondolkodást és bevezetett az össejtkutatás és fejlődésbiológia izgalmas világába. Az ő segítő támogatása nélkül ez a disszertáció nem született volna meg.

Külön szeretnek köszönetet mondani Dr. Surya Henry-nek, aki a PhD kezdetén időt nem kímélve igyekezett megtanítani a laborban alkalmazott különböző technikákra. Ezért mindig hálás leszek. Köszönöm az ügyvivő szakértőinknek Kokavszki Katalinnak, Dudás Krisztinának és Dudásné Kovács Anitának a PhD munkám során biztosított segítségét.

Köszönöm még jelenlegi és volt munkatársaimnak Dr. Kovács Gergőnek, Dr. Sutus Enikőnek, Dr. Bajusz Izabellának, Adorjan Lilinek, Bélai Emesének és Aynura Seytjanovának a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségét és az izgalmas szakmai beszélgetéseket.

Köszönet illeti valamennyi kollaborációs partnereünket: A ncRNA-Seq elemzést Dr. Czimmerer Zsolt, Benyhe-Kis Bernadett és Poscher Anna Poscher végezte. Dr. Lipinszki Zoltán segített a CoIP kísérletek tervezésében és kiértékelésében és Dr. Steinbach Gábornak biztosította a mikroszkópos hozzáférést a Mikroszkópos Sejtanalízis Laboratóriumban.

Szeretném megköszönni Dr. Erdélyi Miklósnak, az HUN-REN, Genetikai Intézet vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított az intézetben a PhD munkám elvégzésére. Szeretném megköszönni Dr. Sinka Ritának és Dr. Krizbai Istvánnak, hogy vállalták a PhD disszertációm opponálását.

Köszönöm még Dr. Endre Gabriellának a qRT-PCR és Dr. Fajka-Boja Robertának az áramlási citometriai kísérletekben és Dr. Farkas E. Attilának a Image J quantifikációban nyújtott segítségét továbbá tutoraimnak, Dr. Juhász Szilviának és Dr. Unk Ildikónak, hogy mindig készséggel álltak rendelkezésemre.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani családomnak, szüleimnek és nagyszüleimnek, akik hittek bennem és biztattak a hosszú út alatt. Továbbá páromnak Németh Mártonnak, aki a nehezebb napokon is szerető támogatásáról biztosított.

A disszertációban szereplő kutatásokat az alábbi pályázatok támogatták: HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet, Fiatal kutatói állaspályázata, GINOP-2.3.2-15-2016-00001 és GINOP-2.3.2-15-2016-00039.

8. Irodalomjegyzék

- Abranches, E. *et al.* (2009) ‘Neural differentiation of embryonic stem cells in vitro: a road map to neurogenesis in the embryo’, *PloS one*, 4(7). Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0006286>.
- Adnani, L. *et al.* (2015) ‘Zac1 Regulates the Differentiation and Migration of Neocortical Neurons via Pac1’, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(39), pp. 13430–13447. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0777-15.2015>.
- Amadei, G. *et al.* (2022) ‘Stem cell-derived mouse embryos develop within an extra-embryonic yolk sac to form anterior brain regions and a beating heart-like structure.’ Available at: <https://doi.org/10.21203/RS.3.PEX-2006/V2>.
- Argiro, L. *et al.* (2024) ‘Gastruloids are competent to specify both cardiac and skeletal muscle lineages’, *Nature Communications* 2024 15:1, 15(1), pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-54466-w>.
- Arias, A.M., Marikawa, Y. and Moris, N. (2022) ‘Gastruloids: Pluripotent stem cell models of mammalian gastrulation and embryo engineering HHS Public Access’, *Dev Biol*, 488, pp. 35–46. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2022.05.002>.
- Arnold, S.J. *et al.* (2000) ‘Brachyury is a target gene of the Wnt/beta-catenin signaling pathway’, *Mechanisms of development*, 91(1–2), pp. 249–258. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(99\)00309-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00309-3).
- Arnold, S.J. *et al.* (2008) ‘Pivotal roles for eomesodermin during axis formation, epithelium-to-mesenchyme transition and endoderm specification in the mouse’, *Development (Cambridge, England)*, 135(3), pp. 501–511. Available at: <https://doi.org/10.1242/DEV.014357>.
- Arnold, S.J. and Robertson, E.J. (2009) ‘Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo’, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(2), pp. 91–103. Available at: <https://doi.org/10.1038/NRM2618>.

- Atkins, D.L. *et al.* (1997) ‘Regulation of Rat Cardiac Myocyte Growth by a Neuronal Factor Secreted by PC12 Cells’, *Pediatric Research* 1997 41:6, 41(6), pp. 832–841. Available at: <https://doi.org/10.1203/00006450-199706000-00007>.
- Baillie-Johnson, P. *et al.* (2015) ‘Generation of Aggregates of Mouse Embryonic Stem Cells that Show Symmetry Breaking, Polarization and Emergent Collective Behaviour In Vitro’, *Journal of visualized experiments: JoVE*, 2015(105). Available at: <https://doi.org/10.3791/53252>.
- Bardot, E.S. and Hadjantonakis, A.K. (2020) ‘Mouse gastrulation: Coordination of tissue patterning, specification and diversification of cell fate’, *Mechanisms of development*, 163. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MOD.2020.103617>.
- Beddington, R.S.P. and Robertson, E.J. (1999) ‘Axis development and early asymmetry in mammals’, *Cell*, 96(2), pp. 195–209. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80560-7/ASSET/F502DB53-A711-407B-B2CB-40F5FC4F1F8A/MAIN.ASSETS/GR4.JPG](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80560-7/ASSET/F502DB53-A711-407B-B2CB-40F5FC4F1F8A/MAIN.ASSETS/GR4.JPG).
- Beisaw, A. *et al.* (2018) ‘BRACHYURY directs histone acetylation to target loci during mesoderm development’, *EMBO reports*, 19(1), pp. 118–134. Available at: <https://doi.org/10.15252/EMBR.201744201>.
- ten Berge, D. *et al.* (2008) ‘Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies’, *Cell stem cell*, 3(5), pp. 508–518. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2008.09.013>.
- Bondue, A. *et al.* (2008) ‘Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification’, *Cell stem cell*, 3(1), pp. 69–84. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2008.06.009>.
- Boyer, L.A. *et al.* (2006) ‘Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells’, *Nature*, 441(7091), pp. 349–353. Available at: <https://doi.org/10.1038/NATURE04733>.
- Bradford, M.M. (1976) ‘A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding’, *Analytical biochemistry*, 72(1–2), pp. 248–254. Available at: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

- Brassard, J.A. and Lutolf, M.P. (2019) ‘Engineering Stem Cell Self-organization to Build Better Organoids’, *Cell stem cell*, 24(6), pp. 860–876. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2019.05.005>.
- Brickman, J.M. and Serup, P. (2017) ‘Properties of embryoid bodies’, *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, 6(2). Available at: <https://doi.org/10.1002/WDEV.259>.
- Van Den Brink, S.C. *et al.* (2014) ‘Symmetry breaking, germ layer specification and axial organisation in aggregates of mouse embryonic stem cells’, *Development (Cambridge)*, 141(22), pp. 4231–4242. Available at: <https://doi.org/10.1242/DEV.113001/-/DC1>.
- van den Brink, S.C. *et al.* (2020) ‘Single-cell and spatial transcriptomics reveal somitogenesis in gastruloids’, *Nature*, 582(7812), pp. 405–409. Available at: <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2024-3>.
- Brutsaert, D.L. (2003) ‘Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity’, *Physiological reviews*, 83(1), pp. 59–115. Available at: <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00017.2002>.
- Buckingham, K.J. *et al.* (2013) ‘Multiple mutant T alleles cause haploinsufficiency of Brachyury and short tails in Manx cats’, *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*, 24(9–10), pp. 400–408. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00335-013-9471-1>.
- Bulger, E.A. *et al.* (2024) ‘TBXT dose sensitivity and the decoupling of nascent mesoderm specification from EMT progression in 2D human gastruloids’, *Development (Cambridge)*, 151(6). Available at: <https://doi.org/10.1242/DEV.202516/VIDEO-6>.
- Calés, C. *et al.* (2016) ‘Role of Polycomb RYBP in Maintaining the B-1-to-B-2 B-Cell Lineage Switch in Adult Hematopoiesis’, *Molecular and Cellular Biology*, 36(6), pp. 900–912. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.00869-15>.
- Cermola, F. *et al.* (2021) ‘Gastruloid Development Competence Discriminates Different States of Pluripotency’, *Stem cell reports*, 16(2), pp. 354–369. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2020.12.013>.
- Chagraoui, H. *et al.* (2018) ‘SCL/TAL1 cooperates with Polycomb RYBP-PRC1 to suppress alternative lineages in blood-fated cells’, *Nature Communications 2018 9:1*, 9(1), pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07787-6>.

- Chen, M. *et al.* (2020) ‘The Roles of Embryonic Transcription Factor BRACHYURY in Tumorigenesis and Progression’, *Frontiers in Oncology*, 10, p. 538464. Available at: <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.00961/BIBTEX>.
- Chesley, P. (1935) ‘Development of the short-tailed mutant in the house mouse’, *Journal of Experimental Zoology*, 70(3), pp. 429–459. Available at: <https://doi.org/10.1002/JEZ.1400700306>.
- Choi, D. *et al.* (2005) ‘In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells: enrichment of endodermal cells in the embryoid body’, *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 23(6), pp. 817–827. Available at: <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2004-0262>.
- Chung, S.H. *et al.* (2011) ‘Zac1 plays a key role in the development of specific neuronal subsets in the mouse cerebellum’, *Neural Development*, 6(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/1749-8104-6-25>.
- Ciruna, B.G. and Rossant, J. (1999) ‘Expression of the T-box gene Eomesodermin during early mouse development’, *Mechanisms of development*, 81(1–2), pp. 199–203. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(98\)00243-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(98)00243-3).
- Connelly, K.E. and Dykhuizen, E.C. (2017) ‘Compositional and functional diversity of canonical PRC1 complexes in mammals’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(2), pp. 233–245. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BBAGRM.2016.12.006>.
- Coucovanis, E. and Martin, G.R. (1995) ‘Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo’, *Cell*, 83(2), pp. 279–287. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90169-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90169-8).
- Crispino, J.D. *et al.* (2001) ‘Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors’, *Genes & development*, 15(7), pp. 839–844. Available at: <https://doi.org/10.1101/GAD.875201>.
- David, R. *et al.* (2011) ‘Induction of MesP1 by Brachyury(T) generates the common multipotent cardiovascular stem cell’, *Cardiovascular research*, 92(1), pp. 115–122. Available at: <https://doi.org/10.1093/CVR/CVR158>.

- Dushnik-Levinson, M. and Benvenisty, N. (1995) 'Embryogenesis in vitro: study of differentiation of embryonic stem cells', *Biology of the neonate*, 67(2), pp. 77–83. Available at: <https://doi.org/10.1159/000244147>.
- Fereres, S. *et al.* (2014) 'dRYBP counteracts chromatin-dependent activation and repression of transcription', *PloS one*, 9(11). Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0113255>.
- Fijnvandraat, A.C. *et al.* (2003) 'Cardiomyocytes derived from embryonic stem cells resemble cardiomyocytes of the embryonic heart tube', *Cardiovascular research*, 58(2), pp. 399–409. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(03\)00282-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(03)00282-7).
- Forough, R., Scarcello, C. and Perkins, M. (2011) 'Cardiac Biomarkers: a Focus on Cardiac Regeneration', *The Journal of Tehran Heart Center*, 6(4), p. 179. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3467959/> (Accessed: 21 December 2024).
- Gao, Z. *et al.* (2012) 'PCGF Homologs, CBX Proteins, and RYBP Define Functionally Distinct PRC1 Family Complexes', *Molecular Cell*, 45(3), pp. 344–356. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.002>.
- Gao, Z. *et al.* (2014) 'An AUTS2-Polycomb complex activates gene expression in the CNS', *Nature*, 516(7531), pp. 349–354. Available at: <https://doi.org/10.1038/NATURE13921>.
- Garcia, E. *et al.* (1999) 'RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian Polycomb complex, and with the transcription factor YY1', *EMBO Journal*, 18(12), pp. 3404–3418. Available at: <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/18.12.3404>.
- Geng, Z. and Gao, Z. (2020) 'Mammalian PRC1 Complexes: Compositional Complexity and Diverse Molecular Mechanisms', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), p. 8594. Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS21228594>.
- Gentile, C. and Kmita, M. (2020) 'Polycomb Repressive Complexes in Hox Gene Regulation: Silencing and Beyond: The Functional Dynamics of Polycomb Repressive Complexes in Hox Gene Regulation', *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 42(10). Available at: <https://doi.org/10.1002/BIES.201900249>.

- Gilbert, S.F. and Barresi, M.J.F. (2017) 'DEVELOPMENTAL BIOLOGY, 11TH EDITION 2016', *American Journal of Medical Genetics Part A*, 173(5), pp. 1430–1430. Available at: <https://doi.org/10.1002/AJMG.A.38166>.
- Gould, A. (1997) 'Functions of mammalian Polycomb group and trithorax group related genes', *Current opinion in genetics & development*, 7(4), pp. 488–494. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(97\)80075-5](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(97)80075-5).
- Haegel, H. *et al.* (1995) 'Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation', *Development (Cambridge, England)*, 121(11), pp. 3529–3537. Available at: <https://doi.org/10.1242/DEV.121.11.3529>.
- Han, J. *et al.* (2019) 'Two linked TBXT (brachyury) gene polymorphisms are associated with the tailless phenotype in fat-rumped sheep', *Animal genetics*, 50(6), pp. 772–777. Available at: <https://doi.org/10.1111/AGE.12852>.
- Heikinheimo, M., Scandrett, J.M. and Wilson, D.B. (1994) 'Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development', *Developmental Biology*, 164(2), pp. 361–373. Available at: <https://doi.org/10.1006/DBIO.1994.1206>.
- Henry, S. *et al.* (2020) 'RYBP is important for cardiac progenitor cell development and sarcomere formation', *PloS one*, 15(7). Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0235922>.
- Henry, S., Kokity, L. and Pirity, M.K. (2023) 'Polycomb protein RYBP activates transcription factor Plagl1 during in vitro cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells', *Open Biology*, 13(2). Available at: <https://doi.org/10.1098/RSOB.220305>.
- Herrmann, B.G. (1991) 'Expression pattern of the Brachyury gene in whole-mount TWis/TWis mutant embryos', *Development (Cambridge, England)*, 113(3), pp. 913–917. Available at: <https://doi.org/10.1242/DEV.113.3.913>.
- Hescheler, J. *et al.* (1997) 'Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis', *Cardiovascular research*, 36(2), pp. 149–162. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(97\)00193-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(97)00193-4).

- Hoang, D.M. *et al.* (2022) ‘Stem cell-based therapy for human diseases’, *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022 7:1, 7(1), pp. 1–41. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01134-4>.
- Holtzinger, A., Rosenfeld, G.E. and Evans, T. (2010) ‘Gata4 directs development of cardiac-inducing endoderm from ES cells’, *Developmental Biology*, 337(1), pp. 63–73. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2009.10.003>.
- Hu, D. and Cross, J.C. (2010) ‘Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta’, *The International journal of developmental biology*, 54(2–3), pp. 341–354. Available at: <https://doi.org/10.1387/IJDB.082768DH>.
- Huelsken, J. *et al.* (2000) ‘Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice’, *The Journal of cell biology*, 148(3), pp. 567–578. Available at: <https://doi.org/10.1083/JCB.148.3.567>.
- Ismagulov, G., Hamidi, S. and Sheng, G. (2021) ‘Epithelial-Mesenchymal Transition Drives Three-Dimensional Morphogenesis in Mammalian Early Development’, *Frontiers in cell and developmental biology*, 9. Available at: <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.639244>.
- Karantalis, V. and Hare, J.M. (2015) ‘Use of Mesenchymal Stem Cells for Therapy of Cardiac Disease’, *Circulation research*, 116(8), p. 1413. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303614>.
- Keller, G.M. (1995) ‘In vitro differentiation of embryonic stem cells’, *Current opinion in cell biology*, 7(6), pp. 862–869. Available at: [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80071-9](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80071-9).
- Kemmler, C.L. *et al.* (2023) ‘Conserved enhancers control notochord expression of vertebrate Brachyury’, *Nature communications*, 14(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/S41467-023-42151-3>.
- Kim, J.M. *et al.* (2011) ‘Assessment of Differentiation Aspects by the Morphological Classification of Embryoid Bodies Derived from Human Embryonic Stem Cells’, <https://home.liebertpub.com/scd>, 20(11), pp. 1925–1935. Available at: <https://doi.org/10.1089/SCD.2010.0476>.

- Kim, S. *et al.* (2022) ‘Tissue extracellular matrix hydrogels as alternatives to Matrigel for culturing gastrointestinal organoids’, *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), pp. 1–21. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29279-4>.
- Kispert, A. and Herrmann, B.G. (1993) ‘The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein’, *The EMBO journal*, 12(8), pp. 3211–3220. Available at: <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1993.TB05990.X>.
- Korzh, V. (2024) ‘Never-ending story of Brachyury: From short-tailed mice to tailless primates’, *Cells & development*, 178. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CDEV.2023.203896>.
- Korzh, V. and Grunwald, D. (2001) ‘Nadine Dobrovolskaïa-Zavadskaïa and the dawn of developmental genetics’, *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 23(4), pp. 365–371. Available at: <https://doi.org/10.1002/BIES.1052>.
- Kowalski, W.J. *et al.* (2022) ‘Sympathetic Neurons Regulate Cardiomyocyte Maturation in Culture’, *Frontiers in cell and developmental biology*, 10. Available at: <https://doi.org/10.3389/FCELL.2022.850645>.
- Laemmli, U.K. (1970) ‘Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4’, *Nature*, 227(5259), pp. 680–685. Available at: <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Li, H. *et al.* (2017) ‘RNA Helicase DDX5 Inhibits Reprogramming to Pluripotency by miRNA-Based Repression of RYBP and its PRC1-Dependent and -Independent Functions’, *Cell stem cell*, 20(4), pp. 462-477.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2016.12.002>.
- Liu, P. *et al.* (1999) ‘Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation’, *Nature genetics*, 22(4), pp. 361–365. Available at: <https://doi.org/10.1038/11932>.
- Liu, S. *et al.* (2021) ‘NRF1 association with AUTS2-Polycomb mediates specific gene activation in the brain’, *Molecular cell*, 81(22), pp. 4663-4676.e8. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2021.09.020>.

- Liu, Y. *et al.* (2023) 'Functional dissection of PRC1 subunits RYBP and YAF2 during neural differentiation of embryonic stem cells', *Nature communications*, 14(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/S41467-023-42507-9>.
- Livigni, A. *et al.* (2009) 'Differentiation of embryonic stem cells into anterior definitive endoderm', *Current protocols in stem cell biology*, Chapter 1(SUPPL. 10). Available at: <https://doi.org/10.1002/9780470151808.SC01G03S10>.
- Maltsev, V.A. *et al.* (1993) 'Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types', *Mechanisms of Development*, 44(1), pp. 41–50. Available at: [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(93\)90015-P](https://doi.org/10.1016/0925-4773(93)90015-P).
- Marikawa, Y. and Alarcón, V.B. (2009) 'Establishment of trophectoderm and inner cell mass lineages in the mouse embryo', *Molecular Reproduction and Development*, 76(11), pp. 1019–1032. Available at: <https://doi.org/10.1002/MRD.21057>.
- Martins-Costa, C., Wilson, V. and Binagui-Casas, A. (2024) 'Neuromesodermal specification during head-to-tail body axis formation', *Current topics in developmental biology*, 159, pp. 232–271. Available at: <https://doi.org/10.1016/BS.CTDB.2024.02.012>.
- Maybee, D. V. *et al.* (2022) 'RYBP Sensitizes Cancer Cells to PARP Inhibitors by Regulating ATM Activity', *International journal of molecular sciences*, 23(19). Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS231911764>.
- McCormick, M.E. *et al.* (2015) 'Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 Mediates Endothelial-Cardiomyocyte Communication and Regulates Cardiac Function', *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*, 4(1), p. e001210. Available at: <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.001210>.
- Meng, Y. *et al.* (2020) 'Polycomb group RING finger protein 5 influences several developmental signaling pathways during the in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells', *Development, Growth & Differentiation*, 62(4), pp. 232–242. Available at: <https://doi.org/10.1111/DGD.12659>.
- Mensah, I.K. and Gowher, H. (2024) 'Signaling Pathways Governing Cardiomyocyte Differentiation', *Genes*, 15(6), p. 798. Available at: <https://doi.org/10.3390/GENES15060798>.

- Morey, L. *et al.* (2015) 'Polycomb Regulates Mesoderm Cell Fate-Specification in Embryonic Stem Cells through Activation and Repression Mechanisms', *Cell Stem Cell*, 17(3), pp. 300–315. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.08.009>.
- Morimoto, S. (2008) 'Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies', *Cardiovascular Research*, 77(4), pp. 659–666. Available at: <https://doi.org/10.1093/CVR/CVM084>.
- Nagy, A. *et al.* (1993) 'Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(18), pp. 8424–8428. Available at: <https://doi.org/10.1073/PNAS.90.18.8424>.
- Nakaya, Y. and Sheng, G. (2008) 'Epithelial to mesenchymal transition during gastrulation: an embryological view', *Development, growth & differentiation*, 50(9), pp. 755–766. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1440-169X.2008.01070.X>.
- de Napoles, M. *et al.* (2004) 'Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation', *Developmental cell*, 7(5), pp. 663–676. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2004.10.005>.
- Neira, J.L. *et al.* (2009) 'The transcriptional repressor RYBP is a natively unfolded protein which folds upon binding to DNA', *Biochemistry*, 48(6), pp. 1348–1360. Available at: <https://doi.org/10.1021/BI801933C>.
- Oki, S., Kitajima, K. and Meno, C. (2010) 'Dissecting the role of Fgf signaling during gastrulation and left-right axis formation in mouse embryos using chemical inhibitors', *Developmental Dynamics*, 239(6), pp. 1768–1778. Available at: <https://doi.org/10.1002/DVDY.22282>.
- Perea-Gomez, A. *et al.* (2004) 'Initiation of gastrulation in the mouse embryo is preceded by an apparent shift in the orientation of the anterior-posterior axis', *Current biology : CB*, 14(3), pp. 197–207. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2004.01.030>.
- Pickett, J.R. *et al.* (2023) 'Targeting endothelial vascular cell adhesion molecule-1 in atherosclerosis: drug discovery and development of vascular cell adhesion molecule-1–directed novel therapeutics', *Cardiovascular Research*, 119(13), pp. 2278–2293. Available at: <https://doi.org/10.1093/CVR/CVAD130>.

- Pijuan-Sala, B. *et al.* (2019) ‘A single-cell molecular map of mouse gastrulation and early organogenesis’, *Nature*, 566(7745), pp. 490–495. Available at: <https://doi.org/10.1038/S41586-019-0933-9>.
- Pirity, M.K., Locker, J. and Schreiber-Agus, N. (2005) ‘Rybp/DEDAF Is Required for Early Postimplantation and for Central Nervous System Development’, *Molecular and Cellular Biology*, 25(16), pp. 7193–7202. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.25.16.7193-7202.2005>.
- Rivera-Feliciano, J. *et al.* (2006) ‘Development of heart valves requires Gata4 expression in endothelial-derived cells’, *Development (Cambridge, England)*, 133(18), pp. 3607–3618. Available at: <https://doi.org/10.1242/DEV.02519>.
- Rivera-Pérez, J.A. and Magnuson, T. (2005) ‘Primitive streak formation in mice is preceded by localized activation of Brachyury and Wnt3’, *Developmental biology*, 288(2), pp. 363–371. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2005.09.012>.
- Rossi, G. *et al.* (2021) ‘Capturing Cardiogenesis in Gastruloids’, *Cell stem cell*, 28(2), pp. 230–240.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2020.10.013>.
- Raklli, V. *et al.* (2016) ‘Elevated levels of ZAC1 disrupt neurogenesis and promote rapid in vivo reprogramming’, *Stem Cell Research*, 16(1), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.SCR.2015.11.002>.
- Saga, Y. *et al.* (1996) ‘MesP1: a novel basic helix-loop-helix protein expressed in the nascent mesodermal cells during mouse gastrulation’, *Development*, 122(9), pp. 2769–2778. Available at: <https://doi.org/10.1242/DEV.122.9.2769>.
- Sambasivan, R. and Steventon, B. (2021) ‘Neuromesodermal Progenitors: A Basis for Robust Axial Patterning in Development and Evolution’, *Frontiers in cell and developmental biology*, 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.607516>.
- Schlisio, S. *et al.* (2002) ‘Interaction of YY1 with E2Fs, mediated by RYBP, provides a mechanism for specificity of E2F function’, *The EMBO Journal*, 21(21), p. 5775. Available at: <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDF577>.
- Schoorlemmer, J. *et al.* (1997) ‘Ring1A is a transcriptional repressor that interacts with the Polycomb-M33 protein and is expressed at rhombomere boundaries in the mouse

- hindbrain', *The EMBO journal*, 16(19), pp. 5930–5942. Available at: <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/16.19.5930>.
- Schüle, K.M. *et al.* (2023) 'Eomes restricts Brachyury functions at the onset of mouse gastrulation', *Developmental cell*, 58(18), pp. 1627–1642.e7. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2023.07.023>.
- Showell, C., Binder, O. and Conlon, F.L. (2004) 'T-box genes in early embryogenesis', *Developmental Dynamics*, 229(1), pp. 201–218. Available at: <https://doi.org/10.1002/DVDY.10480>.
- Simon, C.S. *et al.* (2018) 'A Gata4 nuclear GFP transcriptional reporter to study endoderm and cardiac development in the mouse', *Biology open*, 7(12). Available at: <https://doi.org/10.1242/BIO.036517>.
- Simon, J.A. and Kingston, R.E. (2013) 'Occupying Chromatin: Polycomb Mechanisms for Getting to Genomic Targets, Stopping Transcriptional Traffic, and Staying Put', *Molecular Cell*, 49(5), pp. 808–824. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.02.013>.
- Simunovic, M. and Brivanlou, A.H. (2017) 'Embryoids, organoids and gastruloids: new approaches to understanding embryogenesis', *Development (Cambridge, England)*, 144(6), pp. 976–985. Available at: <https://doi.org/10.1242/DEV.143529>.
- Smith, J. (1999) 'T-box genes: what they do and how they do it', *Trends in genetics : TIG*, 15(4), pp. 154–158. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(99\)01693-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01693-5).
- Solnica-Krezel, L. (2005) 'Conserved Patterns of Cell Movements during Vertebrate Gastrulation', *Current Biology*, 15(6), pp. R213–R228. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2005.03.016>.
- Stanton, S.E. *et al.* (2007) 'Rybp interacts with Hippo and enhances Hippo-mediated apoptosis', *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 12(12), pp. 2197–2206. Available at: <https://doi.org/10.1007/S10495-007-0131-3>.
- Stott, D., Kispert, A. and Herrmann, B.G. (1993) 'Rescue of the tail defect of Brachyury mice', *Genes & development*, 7(2), pp. 197–203. Available at: <https://doi.org/10.1101/GAD.7.2.197>.

- Suppinger, S. *et al.* (2023) ‘Multimodal characterization of murine gastruloid development’, *Cell stem cell*, 30(6), pp. 867–884.e11. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2023.04.018>.
- Sutus, E. *et al.* (2022) ‘RYBP regulates Pax6 during in vitro neural differentiation of mouse embryonic stem cells’, *Scientific reports*, 12(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/S41598-022-06228-1>.
- Takada, S. *et al.* (1994) ‘Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo’, *Genes & development*, 8(2), pp. 174–189. Available at: <https://doi.org/10.1101/GAD.8.2.174>.
- Takaoka, K., Yamamoto, M. and Hamada, H. (2007) ‘Origin of body axes in the mouse embryo’, *Current opinion in genetics & development*, 17(4), pp. 344–350. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.GDE.2007.06.001>.
- Tam, P.P.L. and Loebel, D.A.F. (2007) ‘Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation’, *Nature reviews. Genetics*, 8(5), pp. 368–381. Available at: <https://doi.org/10.1038/NRG2084>.
- Tarazi, S. *et al.* (2022) ‘Post-gastrulation synthetic embryos generated ex utero from mouse naive ESCs’, *Cell*, 185(18), pp. 3290–3306.e25. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2022.07.028>.
- Tosic, J. *et al.* (2019) ‘Eomes and Brachyury control pluripotency exit and germ-layer segregation by changing the chromatin state’, *Nature cell biology*, 21(12), pp. 1518–1531. Available at: <https://doi.org/10.1038/S41556-019-0423-1>.
- Tsuchio, Y. *et al.* (2000) ‘Intracoronary serum smooth muscle myosin heavy chain levels following PTCA may predict restenosis’, *Japanese heart journal*, 41(2), pp. 131–140. Available at: <https://doi.org/10.1536/JHJ.41.131>.
- Turner, D.A. *et al.* (2014) ‘Brachyury cooperates with Wnt/ β -catenin signalling to elicit primitive-streak-like behaviour in differentiating mouse embryonic stem cells’, *BMC Biology*, 12(1), p. 63. Available at: <https://doi.org/10.1186/S12915-014-0063-7>.
- Turner, D.A. *et al.* (2017) ‘Anteroposterior polarity and elongation in the absence of extra-embryonic tissues and of spatially localised signalling in gastruloids: mammalian

- embryonic organoids', *Development (Cambridge, England)*, 144(21), pp. 3894–3906. Available at: <https://doi.org/10.1242/DEV.150391>.
- Tzouanacou, E. *et al.* (2009) 'Redefining the progression of lineage segregations during mammalian embryogenesis by clonal analysis', *Developmental cell*, 17(3), pp. 365–376. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2009.08.002>.
- Ujhelly, O. *et al.* (2015) 'Lack of Rybp in Mouse Embryonic Stem Cells Impairs Cardiac Differentiation', *Stem Cells and Development*, 24(18), pp. 2193–2205. Available at: <https://doi.org/10.1089/SCD.2014.0569>.
- Veenvliet, J. V. *et al.* (2020) 'Mouse embryonic stem cells self-organize into trunk-like structures with neural tube and somites', *Science (New York, N.Y.)*, 370(6522). Available at: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABA4937>.
- Vidal, M. (2019) 'Polycomb Assemblies Multitask to Regulate Transcription', *Epigenomes*, 3(2). Available at: <https://doi.org/10.3390/EPIGENOMES3020012>.
- Voncken, J.W. *et al.* (2003) 'Rnf2 (Ring1b) deficiency causes gastrulation arrest and cell cycle inhibition', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), pp. 2468–2473. Available at: https://doi.org/10.1073/PNAS.0434312100/SUPPL_FILE/4312TABLE1.HTML.
- Wang, X. and Yang, P. (2008) 'In vitro differentiation of mouse embryonic stem (mES) cells using the hanging drop method', *Journal of visualized experiments : JoVE* [Preprint], (17). Available at: <https://doi.org/10.3791/825>.
- Wehmeyer, A.E. *et al.* (2022) 'Chimeric 3D gastruloids - a versatile tool for studies of mammalian peri-gastrulation development', *Development (Cambridge, England)*, 149(22). Available at: <https://doi.org/10.1242/DEV.200812>.
- Wellik, D.M. (2007) 'Hox patterning of the vertebrate axial skeleton', *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 236(9), pp. 2454–2463. Available at: <https://doi.org/10.1002/DVDY.21286>.
- White, I.A. *et al.* (2016) 'Mesenchymal Stem Cells in Cardiology', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1416, p. 55. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3584-0_4.

- Wilkinson, D.G., Bhatt, S. and Herrmann, B.G. (1990) 'Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation', *Nature*, 343(6259), pp. 657–659. Available at: <https://doi.org/10.1038/343657A0>.
- Wilson, J.L. *et al.* (2014) 'Single-cell analysis of embryoid body heterogeneity using microfluidic trapping array', *Biomedical microdevices*, 16(1), pp. 79–90. Available at: <https://doi.org/10.1007/S10544-013-9807-3>.
- Wlizla, M. and Zorn, A.M. (2015) 'Vertebrate Endoderm Formation', *Principles of Developmental Genetics: Second Edition*, pp. 237–253. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405945-0.00013-2>.
- Wu, S.M., Chien, K.R. and Mummery, C. (2008) 'Origins and Fates of Cardiovascular Progenitor Cells', *Cell*, 132(4), pp. 537–543. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.02.002/ATTACHMENT/B9E106B2-FE7B-4EAF-8E48-D89EB5378B0B/MMC1.PDF>.
- Xia, B. *et al.* (2024) 'On the genetic basis of tail-loss evolution in humans and apes', *Nature* 2024 626:8001, 626(8001), pp. 1042–1048. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07095-8>.
- Xu, P.F. *et al.* (2021) 'Construction of a mammalian embryo model from stem cells organized by a morphogen signalling centre', *Nature communications*, 12(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/S41467-021-23653-4>.
- Yamaguchi, T.P. *et al.* (1993) 'flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors', *Development (Cambridge, England)*, 118(2), pp. 489–498. Available at: <https://doi.org/10.1242/DEV.118.2.489>.
- Yamaguchi, T.P. *et al.* (1999) 'T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification', *Genes & development*, 13(24), pp. 3185–3190. Available at: <https://doi.org/10.1101/GAD.13.24.3185>.
- Yan, Y. *et al.* (2017) 'Loss of Polycomb Group Protein Pcgfl Severely Compromises Proper Differentiation of Embryonic Stem Cells', *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep46276>.

- Yanagisawa, K.O., Fujimoto, H. and Urushihara, H. (1981) 'Effects of the brachyury (T) mutation on morphogenetic movement in the mouse embryo', *Developmental biology*, 87(2), pp. 242–248. Available at: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(81\)90147-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90147-0).
- Yang, S. *et al.* (2023) 'Organoids: The current status and biomedical applications', *MedComm*, 4(3), p. e274. Available at: <https://doi.org/10.1002/MCO2.274>.
- Yasuda, E. *et al.* (2009) 'Development of cystic embryoid bodies with visceral yolk-sac-like structures from mouse embryonic stem cells using low-adherence 96-well plate', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(4), pp. 442–446. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JBIOOSC.2008.12.004>.
- Yilbas, A.E. *et al.* (2014) 'Activation of GATA4 gene expression at the early stage of cardiac specification', *Frontiers in chemistry*, 2(MAR). Available at: <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2014.00012>.
- Zakrzewski, W. *et al.* (2019) 'Stem cells: past, present, and future', *Stem cell research & therapy*, 10(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/S13287-019-1165-5>.
- Zeevaert, K. *et al.* (2020) 'Cell Mechanics in Embryoid Bodies', *Cells*, 9(10). Available at: <https://doi.org/10.3390/CELLS9102270>.
- Zhao, W. *et al.* (2017) 'Polycomb group RING finger proteins 3/5 activate transcription via an interaction with the pluripotency factor Tex10 in embryonic stem cells', *The Journal of biological chemistry*, 292(52), pp. 21527–21537. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.M117.804054>.
- Zheng, L. *et al.* (2001) 'The Death Effector Domain-associated Factor Plays Distinct Regulatory Roles in the Nucleus and Cytoplasm', *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), pp. 31945–31952. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.M102799200>.
- Zhou, P. *et al.* (2022) 'GATA4 Regulates Developing Endocardium Through Interaction With ETS1', *Circulation research*, 131(11), pp. E152–E168. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.318102>.

9. Eredmények összefoglalása

A korai embrionális fejlődés egyik legfontosabb eseménye a gasztruláció, mely során a hólyagsíra differenciálatlan őssejtjei elveszítik pluripotenciájukat, hogy térben átrendeződve létrehozzák a három fő csíralemezt, az endodermát, a mezodermát és az ektodermát. A gasztruláció során csíralemezek biztosítják a leendő szervek és testtájak megfelelő kialakítását. Ez a folyamat a transzkripciós faktorok és epigenetikai fehérjekomplexek szigorú szabályozása alatt áll. Egy ilyen epigenetikai szabályozó fehérje 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 fontos szerepet játszik a korai embrionális fejlődés során a sejtvonalak elköteleződésében. Hiányában a null mutáns egerek beágyazódási rendellenességben elpusztulnak. Kimutattuk, hogy az RYBP nélkülözhetetlen a szívizomsejtek normál fejlődéséhez is. Az *Rybp*^{-/-} őssejtek *in vitro* szívizom irányú differenciációja során nem alakulnak ki dobogó szívizom telepek, és a szarkomerek felépítésében szerepet játszó fehérjék termelődése zavart szenved. A mutánsokban megfigyelt fenotípus részben az *Rybp*^{-/-} telepek PLAGL1, késői kardiális transzkripciós faktor, hiányára vezethető vissza, ami a null mutáns sejtekben nem termelődik. A *Plagl1* génnek szerepe van a szarkomerikus fehérjék, pl. a kardiális Troponin T (*Tnnt2*) szabályozásában. Csoportunk kimutatta, hogy vad típusú sejtekben az RYBP az NKX2-5-el együtt aktiválja a *Plagl1* gént, ezáltal fontos a késői szarkomerikus fehérjék termelődéséhez. Azonban ez a kölcsönhatás nem adott magyarázatot a korai progenitor szakaszban megfigyelt fenotípusra az *Rybp*^{-/-} tenyészetekben.

Ezen ismeretekből kiindulva a PhD munkám során szerettük volna feltáráni, hogy a kardiális irányú elköteleződés során, melyik az a legkorábbi stádium, melyet az RYBP képes szabályozni. Továbbá célunk volt azonosítani olyan korai transzkripciós faktorokat, mellyekkel az RYBP képes együtt dolgozni a korai stádiumokban.

A PhD dolgozatomban első lépésként vad típusú kétdimenziós (2D) kardiális tenyészetben elemeztük tovább az RYBP PLAGL1-on keresztüli, szabályozását. Megvizsgáltuk, hogy a szívizomsejteken kívül van-e más kardiális sejtípus is, melyben PLAGL1 nagy mennyiségben detektálható. Eredményeinkből kiderült, hogy a PLAGL1 részt vehet a szív simaizom, mezenchimális és neurális sejtjeinek kialakításában, azonban jelenléte a GATA4-el jelölt endotéliális sejtekben nem detektálható. A PLAGL1-al ellentétben az RYBP az endotéliális

sejtekben kimutatható volt, továbbá az *Rybp*^{-/-} telepekben az endotél sejtek számának nagymértékű csökkenése figyelhető meg, ami az RYBP egy PLAGL1-től független szabályozására utalt. Ezután megvizsgáltuk a szív- és endotél progenitorok gének naponkénti expressziós változásait a kardiális elköteleződés korai stádiumában. Kimutattuk, hogy *Rybp* hiányában lecsökken a kardiális (*Mesp1*, *Mef2c*, *Isl-1*, *Hand1*, *Nkx2-5*), és endotélialis (*Flk-1*, *Pecam1*, *Vcam1*) progenitor marker gének expressziója. Mivel mindkét progenitor populáció mezoderma eredetű, ugyanezen kísérleti felállásban megvizsgáltuk a fő csíralemez marker gének expresszióját is. Eredményeinkből kiderült, hogy *Rybp* hiányában a mezodermális (*Brachyury*, *Eomes*) és az endodermális (*Sox17*, *Gata4*) marker gének mRNS szintje lecsökkent, míg az ektodermális (*Map2*, *Fgf5*) markerek expressziójában növekedés figyelhető meg. Mivel a csíralemez sejtjeinek kialakulása egy térben is bonyolult folyamat, háromdimenziós (3D) embrionális testeket (EB) hoztunk létre a vad típusú és az *Rybp*^{-/-} őssejtekből, hogy egy komplexebb kísérleti rendszerben tudjuk tovább vizsgálni az RYBP szerepét mezoderma és endoderma kialakításában. Kimutattuk, hogy vad típusú EB-kben az RYBP sejtmagi kolokalizációt mutat a BRACHYURY mezodermális és a GATA4 endodermális markerekkel. RYBP hiányában mindkét fehérje mennyisége szignifikánsan lecsökkent, és kinetikájukban késés figyelhető meg. Ezenfelül a mutánsokban a BRACHYURY pozitív sejtek az EB-ken belül, a vad típushoz képest, kevésbé szétszórtnan helyezkedtek el. Mindezek arra utaltak, hogy az RYBP jelenléte szükséges mindkét csíralemez kialakításához és hiánya hatással lehet a sejtek epitélialis-mezenchimális átmenetére (EMT), és a mezodermális sejtek migrációjára is.

In vitro eredményeinket ezután összehasonlítottuk adatbázisok rendelkezésre álló *in vivo* egér egysejtes mRNS atlaszával (scRNA-Seq). Az *Rybp* és a *Brachyury* koexpresszió kimutatható volt a primitív csíkban és hat mezodermális klaszterben, beleértve a kardiális sejtek kialakulásáért felelős naszcens mezoderma, és az axiális megnyúlásban szerepet játszó kaudális mezoderma populációt. A gasztrulációt követően a kaudális mezoderma populáció az A-P tengely mentén megnyúlik, hogy kialakítsa a farkkezdeményt és a törzs szegmentális mintázatát, mely elengedhetetlen a gerincesek embrionális fejlődéséhez. Mivel a legnagyobb koexpressziót a kaudális mezodermában detektáltunk, következő lépésként megvizsgáltuk, hogy az RYBP hiánya a fejlődés során hatással lehet-e az axiális megnyúlásra. Ennek vizsgálatához vad típusú és *Rybp*^{-/-} őssejtekből olyan 3D-s szelvényezett gasztruloidokat hoztunk létre, melyek az axiális megnyúlás mellett képesek modellezni a 8,5 napos egér embriók törzsi és farki régióit, és megnéztük tapasztalunk-e morfológiai eltéréseket a két

sejtvonal között. Érdekes módon az RYBP hiánya a mutáns gasztruloidokban, a *Brachyury*^{-/-} gasztruloidokhoz hasonló, megrövidült farki fenotípust eredményezett. Továbbá az *Rybp*^{-/-} gasztruloidokat sötét és fragmentált anterior régió jellemzi, és beágyazás után a vad típushoz képest kevesebb letapadó sejt figyelhető meg. Ezután a gasztruloidokat immuncitokémiai festésnek vetettük alá és kimutattuk, hogy az RYBP és a BRACHYURY kolokalizálódik a vad típusú gasztruloidok farokkezdeményének kaudális régiójában. A vad típushoz képest mutáns gasztruloidok ugyanezen részén kevesebb BRACHYURY+ sejt volt detektálható, ugyanakkor egy megnövekedett anterior GATA4 szint is kimutatható volt, ami arra utalt, hogy *Rybp* hiányában a gasztruloidok nem képesek megfelelő differenciációra, és megrekednek a fejlődés egy korábbi stádiumában.

Az RYBP és a BRACHYURY közötti molekuláris mechanizmus további vizsgálatához a *Brachyury* cDNS-t túltermeltető vektorba klónoztuk és megnéztük, hogy az RYBP képes-e fizikai interakcióba lépni a BRACHYURY fehérjével. A ko-immunoprecipitációs eredményekből kiderült, hogy az RYBP és a BRACHYURY képes fizikailag kölcsönhatást kialakítani, ami arra utal, hogy a két fehérje együttesen vagy akár egy többtagú, multimerikus komplexet alkotva részt vehet a korai gének expressziójának szabályozásában.

Összességében eredményein rávilágítottak az RYBP polikomb fehérje egy eddig ismeretlen szerepére a mezoderma kialakításában, és a fejlődő embriók axiális irányú megnyúlásában. Úgy véljük mindezek hozzájárulnak a polikomb fehérjével kapcsolatos ismereteink bővítéséhez, továbbá a gasztruláció és az axiális megnyúlás konzervált folyamatainak részletesebb megértéséhez.

10. Summary

Gastrulation is one of the most crucial events during early development, where undifferentiated stem cells of the blastocyst lose their pluripotency to undergo spatial rearrangement to form the three main germ layers: the endoderm, mesoderm and ectoderm. During gastrulation the main germ layers ensure the proper generation of the future body plan and developing organs. This process is tightly regulated by transcription factors and epigenetic protein complexes, which guide the fate of the cells as they progress from pluripotent state to terminally differentiated tissue types. One of these epigenetic regulators are the non-canonical Polycomb Repressive Complex 1s (ncPRC1s). Our group has previously demonstrated that the core ncPRC1 member RYBP (RING1 and YY1 Binding Protein) is broadly expressed during early development and has an important role in lineage commitment. In the absence of *Rybp*, null mutant mice exhibited early lethality, they die during implantation. Using *in vitro* cardiac differentiation model, we showed that, in the lack of RYBP mouse embryonic stem cells are not able to form contractile cardiomyocytes and the assembly of sarcomeric thin and thick filament proteins was also disrupted. We demonstrated that the loss of late cardiac transcription factor PLAGL1 in mutants, at least partially, contributed to this phenotype. PLAGL1 was shown to regulate the production of sarcomeric proteins such as cardiac troponin T (*Tnnt2*). In wild-type cells we showed that RYBP co-operates with NKX2-5 to transcriptionally activate *Plagl1* gene expression, thus playing an important role in cardiac lineage commitment. However, the regulation of *Plagl1* did not explain the whole phenotype, since the genes expressed in early progenitor stage prior to NKX2-5 and PLAGL1 were also attenuated.

Based on our previous knowledge, my PhD work aimed to determine the earliest stage of cardiac lineage commitment regulated by RYBP, and to identify an early transcription factor that collaborates with RYBP during these early stages of differentiation.

Therefore, in my PhD thesis as a first step we have further examined the regulation of RYBP via PLAGL1 using wild type two-dimensional (2D) cardiac cultures. We checked if there are other cardiac cell types besides cardiomyocytes which can be regulated by PLAGL1 protein. Our results revealed that PLAGL1 could be involved in the formation of cardiac smooth muscle, mesenchymal and neuronal cell types, but its presence is not detectable in GATA4 positive endothelial cells. In contrast to PLAGL1, RYBP was detectable in endothelial cells, and we observed significant reduction in the number of endothelial cells in *Rybp*^{-/-} colonies,

suggesting a PLAGL1-independent regulation of RYBP. Next, we examined the gene expression changes of cardiac and endothelial progenitors during the early stages of cardiac lineage commitment. Our results showed that in the absence of *Rybp* the expression of both cardiac (*Mesp1*, *Mef2c*, *Isl-1*, *Hand1*, *Nkx2-5*) and endothelial (*Flk-1*, *Pecam1*, *Vcam1*) progenitor marker genes were downregulated. Given that both progenitor populations originate from the mesoderm, we also investigated the expression of major germ layer markers using the same experimental setup as before. Our results showed that in the absence of *Rybp*, the mRNA levels of the mesodermal (*Brachyury*, *Eomes*) and endodermal (*Sox17*, *Gata4*) marker genes decreased, while the ectodermal (*Map2*, *Fgf5*) markers showed increased expression. Since germ layer formation is a spatially complex process, we generated three-dimensional (3D) embryoid bodies (EBs) from wild type and *Rybp*^{-/-} stem cells to provide a complex experimental system to further investigate the role of RYBP in mesoderm and endoderm formation. We showed that in wild type EBs, RYBP can co-localize with the mesodermal protein BRACHYURY and endodermal protein GATA4. In the absence of RYBP, the level of both proteins significantly decreased and showed delayed kinetics. In the *Rybp*^{-/-} EBs, the BRACHYURY positive cells were more restricted to a single region, whereas the wild type cells were more widely distributed. Taking together these results suggested that the presence of RYBP is required for the formation of both mesoderm and endoderm germ layers, and its absence may also affect the epithelial-mesenchymal transition (EMT), and interfere with proper mesoderm cell migration.

To compare our *in vitro* results to the *in vivo* stages, we re-analyzed a publicly available single-cell RNA sequencing datasets (scRNA-Seq). In early development, *Rybp* and *Brachyury* co-expression was detected in the primitive streak and in six mesodermal cell populations, including the nascent mesoderm which is responsible for cardiac cell formation, and the caudal mesoderm, which is involved in axial elongation. Following gastrulation, caudal mesoderm populations migrate alongside the A-P axis and it is responsible for the development of segmented trunk and tailbud therefore essential for embryonic development of vertebrates. Since the highest co-expression was detected in the caudal mesoderm, next we investigated whether the absence of RYBP during development affects axial elongation. To investigate this, we generated wild type and *Rybp*^{-/-} 3D-s gastruloids with somites, which besides the axial elongation are able to mimic the trunk and tail regions of E8.5 mice, and examined whether there are any morphological difference between the two cell lines. Interestingly, the absence of RYBP in the mutant gastruloids resulted a truncated tail phenotype, which resembled the

previously published *Brachyury*^{-/-} gastruloids. We also showed that the anterior region of *Rybp*^{-/-} gastruloids differed, they appeared wider, darker, fragmented and after embedding we observed less attached cells compared to the wild type. Next, we performed whole-mount immunocytochemistry and showed that in wild type gastruloids RYBP and BRACHYURY can co-localize in the caudal region of the tailbud. In the mutant gastruloids fewer BRACHYURY⁺ cells were detected in the same region, and an increased anterior GATA4 level was observed compared to the wild type, suggesting developmental arrest of *Rybp*^{-/-} gastruloids.

To further investigate the molecular mechanism between RYBP and BRACHYURY, we cloned *Brachyury* cDNA in overexpressing vector and examined whether RYBP could physically interact with BRACHYURY protein. Co-immunoprecipitation (CoIP) revealed that RYBP and BRACHYURY were able to physically interact, suggesting that the two proteins may work together in a complex to cooperatively regulate the expression of genes involved in early development.

Taken together, our results revealed a previously unknown developmental role of the polycomb protein RYBP in mesoderm formation and axial elongation. We believe that our findings will provide additional insight into the role of Polycomb group proteins in early development, and enhance our understanding of the conserved processes of gastrulation and axial elongation.

11. Publikációk listája

MTMT azonosító: 10087158

Összesített impakt faktor: 9,1

A fokozatszerzési eljárás alapiát 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

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

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 Polycomb 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 Össejtbológiai (SFB) Konferencia, Budapest, 2024.11.08

- Poszterek:

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

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

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

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

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

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

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

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

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