

37. OTDK Biológia Szekció

**Az ncPRC1 neurális differenciációban betöltött szerepének vizsgálata
funkcióvesztéssel egér őssejtvonalak alkalmazásával**

Bélai Emese Krisztina

Molekuláris biológia MSc I. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Témavezető: Dr. Pírity Melinda Katalin, tudományos főmunkatárs,

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Belső konzulens: Dr. Sinka Rita, egyetemi docens,

SZTE TTIK Genetikai Tanszék

Szeged

2024

1. TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ

A TDK munkámat az SZBK Genetikai Intézetének Embrionális és Indukált Pluripotens Össejt Csoportjában készítettem. Témája a nem-kanonikus Polikomb Represszív Komplex 1 (ncPRC1) neurális differenciációban betöltött szerepének vizsgálata dupla mutáns (*Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO}) egér őssejtvonal alkalmazásával. Az RYBP és a YAF2 fehérjék az ncPRC1 komplexek központi tagjai, de egy komplexen belül mindig csak az egyik (RYBP vagy YAF2) lehet jelen. Az ncPRC1 komplexeknek a sejtsorsok kialakításában van feltételezett szerepe, azonban az RYBP és YAF2 között esetlegesen fennálló redundancia mértéke és a kétféle komplex célgénjei ismeretlenek. Nem ismert az sem, hogy mi okból szerelődnek össze külön RYBP-t és YAF2-t tartalmazó komplexek és ezen komplexek együttes jelenléte szüksége-e a génszabályozáshoz.

Célunk a dupla mutáns egér őssejtvonal (*Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO}) alkalmazásával az ncPRC1 funkciók teljes mértékű felfüggesztése és a neurális differenciációra gyakorolt hatásának meghatározása volt. Csoportunk korábban kimutatta, hogy *Rybp* hiányában az őssejtekből nem képződnek terminálisan differenciált neurális sejtek és mindezzel párhuzamosan a neurális progenitorok mennyisége feldúsul a tenyészetekben. Megállapítottuk, hogy ennek egyik fő oka, hogy *Rybp* hiányában a sejtekben elmarad a *Pax6* gén repressziója. A progenitor sejtekben bőségesen expresszálódó *Pax6* mRNS-ek mennyisége a differenciáció késői szakaszában sem cseng le és ez gátolja a differenciáció terminális szakaszát¹⁶.

Jelen TDK dolgozatban tovább vizsgáltuk a *Pax6 P1* promóterének szabályozását, ezzel egy tágabb képet adva az ncPRC1 komplexek tagjainak sokrétű génszabályozó mechanizmusairól. Luciferáz riporter rendszer alkalmazásával számos potenciálisan szabályozó szerepet betöltő plazmid kombinációt vizsgáltunk a *Pax6 P1* promóterén. Eredményeink arra utalnak, hogy a YAF2 és az lncRNS *Paupar* polikomb függő módon, míg az RYBP a *Paupar*-ral polikomb független módon represszálja a *Pax6 P1* promóterét. Eredményeink újszerű betekintést nyújtanak az *Rybp* és a *Yaf2* potenciális különbségeire a génszabályozás során, valamint az ncPRC1 komplexek lncRNS-ekkel való kapcsolatára. Egyben rávilágítanak az emlősök génszabályozási folyamatainak finoman összehangolt komplexitására.

2. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ	1
2. TARTALOMJEGYZÉK	2
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
3.1 Az őssejtek	4
3.2 Egér embrionális őssejtek <i>in vitro</i> neurális differenciációja	4
3.3 A marker gének.....	5
3.4 A PAX6	5
3.5 A <i>Paupar</i>	6
3.6 Az RYBP	6
3.7 A YAF2	7
3.8 A Polikomb represszív komplexek	7
3.9 Az R1 (<i>Rybp</i> ^{+/+}) sejtvonal.....	8
3.10 Az <i>Rybp</i> ^{-/-} sejtvonal	8
3.11 Az <i>Rybp</i> ^{KO} / <i>Yaf2</i> ^{KO} sejtvonal	8
4. CÉLKITŰZÉSEK.....	9
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	10
5.1 Őssejtek <i>in vitro</i> fenntartása	10
5.2 <i>In vitro</i> neurális differenciáció.....	10
5.3 Génexpressziós vizsgálatok	11
5.3.1 RNS izolálása és tisztítása	11
5.3.2 Reverz transzkripció (RT-PCR).....	12
5.3.3 Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR).....	12
5.4 Immuncitokémia (ICC)	14
5.5 DH5α sejtek transzformálása és plazmidok izolálása	15
5.5.1 Kompetens sejt készítés DH5α sejtekből.....	15
5.5.2 A plazmidok transzformálása	15
5.5.3 A plazmidok izolálása	16
5.6 Luciferáz riporter rendszer	16
5.6.1 HEK 293 sejtek tenyésztése	16
5.6.2 Ca ₃ (PO ₄) ₂ Transzfekció	16

5.6.3 Sejtek lizálása és a lumineszcencia mérése	17
6. EREDMÉNYEK.....	18
6.1 Az <i>Rybp^{KO}/Yaf2^{KO}</i> sejt vonal <i>Oct4</i> mRNS szintjének analízise az <i>Rybp^{+/+}</i> és <i>Rybp^{-/-}</i> sejt vonalakhoz viszonyítva <i>in vitro</i> neurális differenciáció során	18
6.2 Az <i>Rybp^{KO}/Yaf2^{KO}</i> sejt vonal <i>Nestin</i> mRNS szintjének analízise az <i>Rybp^{+/+}</i> és <i>Rybp^{-/-}</i> sejt vonalakhoz viszonyítva <i>in vitro</i> neurális differenciáció során	19
6.3 Az <i>Rybp^{KO}/Yaf2^{KO}</i> sejt vonal <i>NeuroD1</i> mRNS szintjének analízise az <i>Rybp^{+/+}</i> és <i>Rybp^{-/-}</i> sejt vonalakhoz viszonyítva az <i>in vitro</i> neurális differenciáció során	20
6.4 Az <i>Rybp^{KO}/Yaf2^{KO}</i> sejt vonal <i>Tubb3</i> mRNS szintjének analízise az <i>Rybp^{+/+}</i> és <i>Rybp^{-/-}</i> sejt vonalakhoz viszonyítva <i>in vitro</i> neurális differenciáció során	21
6.5 A TUBB3 és a NESTIN lokalizációja az <i>in vitro</i> neurális differenciáció késői szakaszaiban.....	22
6.6 Az <i>Rybp^{KO}/Yaf2^{KO}</i> sejt vonal <i>Pax6</i> mRNS szintjének analízise az <i>Rybp^{+/+}</i> és <i>Rybp^{-/-}</i> sejt vonalakhoz viszonyítva <i>in vitro</i> neurális differenciáció során	24
6.7 Az <i>Rybp^{KO}/Yaf2^{KO}</i> sejt vonal <i>Paupar</i> mRNS szintjének analízise az <i>Rybp^{+/+}</i> és <i>Rybp^{-/-}</i> sejt vonalakhoz viszonyítva <i>in vitro</i> neurális differenciáció során	25
6.8 A <i>Yaf2</i> izomformák mRNS vizsgálata	26
6.9 Az RYBP és a YAF2 szabályozásának vizsgálata a <i>Pax6 P1</i> promóterén.....	28
6.10 A YAF2 és a <i>Paupar</i> szabályozásának vizsgálata a <i>Pax6 P1</i> promóterén	29
6.11 Az RYBP és a <i>Paupar</i> szabályozásának vizsgálata a <i>Pax6 P1</i> promóterén.....	30
6.12 Az ncPRC1.1 szabályozásának vizsgálata a <i>Pax6 P1</i> promóterén.....	31
7. DISZKUSSZIÓ.....	33
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	35
9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	37
10. MELLÉKLETEK.....	38

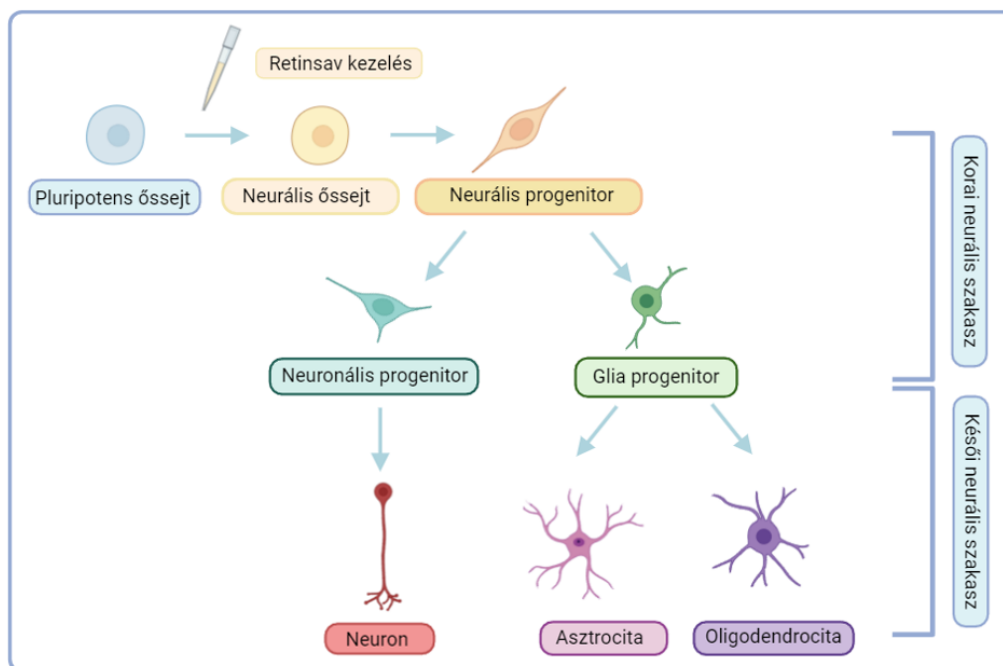
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 Az őssejtek

Az őssejtek a szervezet nem specializálódott sejtjei, fő tulajdonságuk, hogy pluripotensek, azaz belőlük a test minden sejtje képezhető. Az őssejtek képesek önmegújulásra és progenitor sejtek létrehozásával differenciálódásra¹. Az őssejtek a keletkező utódsejtek alapján kétféle módon tudnak osztódni. Szimmetrikus osztódás során egy őssejtből önmagával azonos két őssejt keletkezik, míg aszimmetrikus osztódás során egy őssejtből egy önmagával azonos és egy differenciált sejt keletkezik². Aszerint, hogy belőlük egy, kevés vagy akár sokféle utódsejt alakulhat ki beszélünk multipotens, oligopotens vagy unipotens őssejtekről. Az őssejtek származásuk alapján lehetnek embrionális, felnőtt vagy indukált pluripotens őssejtek³. A dolgozatomban embrionális őssejtekkel foglalkoztam.

3.2 Egér embrionális őssejtek *in vitro* neurális differenciációja

Az emlősök idegrendszere ektodermális eredetű. Az embrionális fejlődés bélcsíra állapota során alakul ki először a 3 csíralemez (ekto-, mezo- és endoderma). Az embrionális őssejtek segítségével képesek vagyunk ezt a folyamatot modellezni. Ennek során szuszpenziós kultúrában a sejtekből aggregátumokat, úgynevezett embrionális testeket képezünk. Majd ezekből az embrionális testekből, például retinsavval a központi idegrendszer idegsejt típusának kialakulása indukálható. A folyamat során először a neurális őssejtek jönnek létre, majd ezekből neurális progenitorok képződnek⁴. Ezt követően a neurális progenitorok tovább differenciálódnak neuronális és glia progenitorokká. A neuronális progenitorokból képződnek a terminálisan differenciálódott neuronok. A glia progenitorokból pedig asztrociták és oligodendrociták jönnek létre **(1. ábra)**.



1. ábra - A neurális sejttípus kialakulásának sematikus ábrája

3.3 A marker gének

A differenciáció folyamatának nyomon követéséhez úgynevezett „marker géneket” használunk. A marker gének fejlődési stádium, illetve sejttípus specifikusak. Az általunk legkorábban használt ilyen faktor az *Oct4* (*Pou5f1*) ami az őssejtek pluripotenciájának fenntartásáért felelős és a differenciálódó sejtekben lecsökken az expressziója⁵. A neurális differenciáció korai szakaszának markereléséhez kísérleteinkben a *Nestin*-t (*Neuroepithelial stem cell protein*) alkalmaztuk⁶. *NeuroD1*-el (*Neurogenic differentiation 1*) pedig a differenciáció későbbi szakaszát monitoroztuk⁷. A terminálisan differenciálódott neurális sejtek meghatározásához a *Tubb3*-t (*Tubulin, β 3 class III*) vizsgáltuk, aminek a mikrotubulusok összeszerelődésében van szerepe⁸.

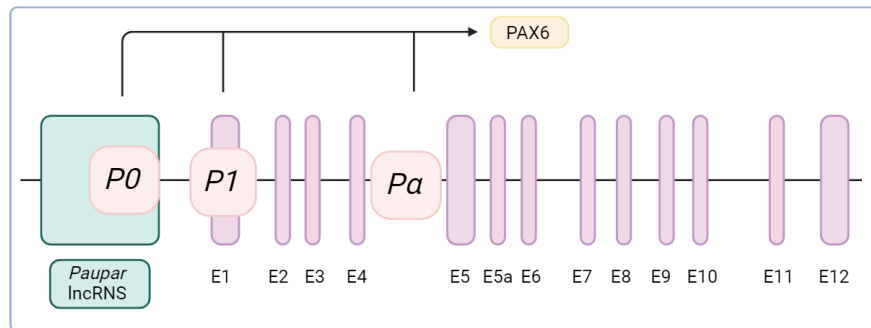
3.4 A PAX6

A *Pax6* (*Paired Box 6*) az egér genomjának 2. kromoszómáján elhelyezkedő 422 aminosavból álló transzkripciósfaktort kódoló gén. Mind a gén, mind pedig a fehérje terméke az evolúció folyamán nagyfokú konzerváltságot mutat⁹. Fontos szerepe van a központi idegrendszer, a szem és a hasnyálmirigy fejlődésében¹⁰. A *Pax6* egy retinsav által indukált gén, szintjének növekedése a neurális fejlődés kezdeti szakaszában elősegíti a sejtek neurális irányba történő elköteleződését. Ugyanakkor a folytonos megnövekedett PAX6 szint megakadályozza a neurális progenitor sejtek további differenciációját, így a differenciáció előrehaladtával mennyisége fokozatosan csökken¹⁰.

A PAX6 fehérje 3 promóterről íródhat át, ezek a *P0*, *P1* és *Pα* promóterek, közülük a neurális fejlődésben a *P1* promóternek van a legjelentősebb szerepe, dolgozatomban is ezt a promótert használtam ¹¹.

3.5 A *Paupar*

A központi idegrendszer fejlődése során számos hosszú nem kódoló RNS (long non-coding RNA; lncRNS) expresszálódik, ilyen a *Paupar* (PAX6 Upstream Antisense RNA) is, amely a *Pax6* lókuszától 5' upstream helyezkedik el (**2. ábra**). Korábban kimutatták, hogy a *Paupar* képes szabályozni a *Pax6*-et és számos más gént is. Ennek során a *Paupar* képes fizikailag asszociálni a *Pax6*-el, valamint a promóterek környékén feldúsult kötőhelyek modulálásával is képes szabályozni¹². Továbbá, a *Paupar* képes közvetlenül kötődni neurális gének *Pax6* kötőhelyeihez, ezzel szabályozva őket¹³.



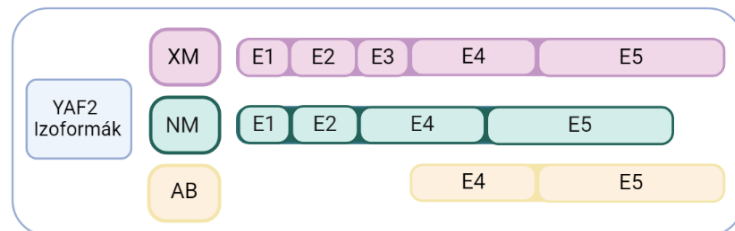
2. ábra - A *Pax6* lókusz sematikus ábrája

3.6 Az RYBP

Az *Rybp* (*RING1 and YY1 Binding Protein*) az egér genomjának 6. kromoszómáján elhelyezkedő 228 aminosavat kódoló gén. A fehérjének, az N-terminálisán elhelyezkedő cink-ujj domén kivételével, rendezetlen szerkezete van¹⁴. Csoportunk korábban kimutatta, hogy az *Rybp* az embriogenezis során a központi idegrendszerben expresszálódó gén. Szerepének jelentőségét mutatja, hogy az *Rybp* homozigóta null (*Rybp*^{-/-}) egérembriók az implantáció során elpusztulnak, míg az *Rybp*^{+/-} embriók egy részében velőcső-záródási rendellenességek jelentkeznek¹⁵. Szintén kimutattuk, hogy az *Rybp*^{-/-} sejtek *in vitro* neurális kultúráiban a progenitorokból kevesebb érett neurális sejt típus alakult ki a vad típushoz képest¹⁶. Továbbá azt is kimutattuk, hogy *Rybp* hiányában, felerősödött a retinsav-jelátviteli útvonal tagjainak, köztük a *Pax6*-nek az expressziója, valamint az RYBP képes közvetlenül represszálni a *Pax6* *P1* promóterét¹⁷. Az idegrendszeren kívül csoportunk korábbi adatai alapján az *Rybp* a szív progenitor sejtek fejlődésében is fontos szerepet játszik¹⁸ és képes aktiválni a *Plagl1* transzkripció faktort kardiális differenciáció során¹⁹.

3.7 A YAF2

A YAF2 az RYBP homológja, fehérje szinten 55%-ban megegyeznek és a domén szerkezetük is hasonló. Különbség köztük, hogy a cink-ujj domén és a C-terminális domén között az RYBP tartalmaz egy nem konzervált régiót, ami a YAF2-ban nincs jelen²⁰. Biológiai funkcióiról jóval kevesebbet tudunk, mint az RYBP funkcióiról. A *Yaf2* (*YY1 Associated Factor 2*) az egér genomjának 15. kromoszómáján helyezkedik el. A YAF2-nak 3 izoformája ismert, ezek funkciója szintén nem ismert. Ezek közül a YAF2 XM a leghosszabb, 5 exonról íródik át és 203 aminosavat tartalmaz²¹. A YAF2 NM izoforma a harmadik exon kihagyásával jön létre és 179 aminosavat tartalmaz és a YAF2 AB izoforma pedig egy alternatív start kodonról, a negyedik és ötödik exonról átíródó 129 aminosavat tartalmazó termék **(3. ábra)**. A YAF2-nak az RYBP-hez hasonlóan a differenciálódás szabályozásában van feltételezett szerepe. *Yaf2* hiányában az őssejtek differenciációja neuro-ektodermális irányba rendellenes módon következik be. A YAF2 feltételezhetően a differenciációhoz elengedhetetlen gének repressziójával segíti elő az őssejtek pluripotenciájának fennmaradását²². Azt is kimutatták, hogy a *Yaf2* gén eltávolításának nincs hatása a mezodermális és az endodermális fejlődésre, ugyanakkor megnövekedett az ektodermális eredetű sejtek mennyisége²².

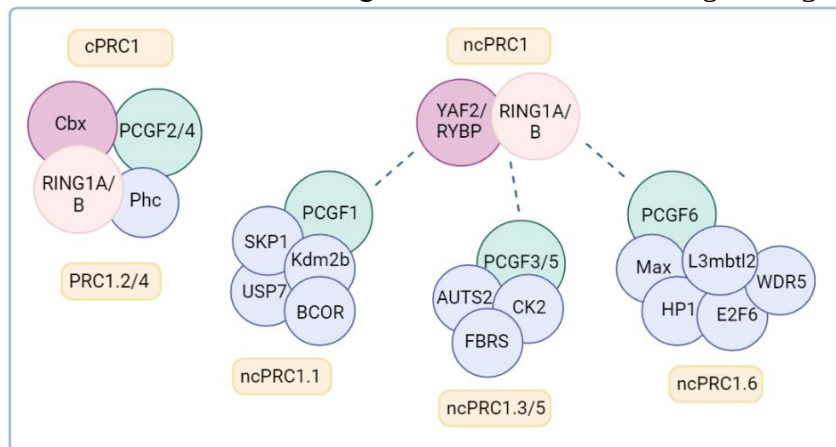


3. ábra - A YAF2 izoformák sematikus ábrája

3.8 A Polikomb represszív komplexek

A polikomb komplexek (PRC) epigenetikai regulátorok, a fejlődési stádium specifikus gének pontos expressziós mintázatának kialakításában van fontos szerepük. Két fő fajtáját ismerjük: az úgynevezett Kanonikus Polikomb Represszív Komplex 1-t (Polycomb Repressive Complex 1, cPRC1) és a Polikomb Represszív Komplex 2-t (Polycomb Repressive Complex 2, PRC2). Az elmúlt évtizedben azonban több nem-kanonikus PRC komplexet is leírtak^{23, 24, 25}. Mind a cPRC1 és az ncPRC1 tartalmaz Ring finger protein 1 A/B-t (RING1A/B) és egyikét a hat különböző Polycomb group ring finger (PCGF) fehérjéknek (PCGF1/2/3/4/5/6) **(4. ábra)**. Egyazon komplexen belül nem lehet jelen egyidejűleg, valamint CBX fehérjék jelenlétében RYBP és YAF2. Az ncPRC1 komplexek enzimatisz aktivitása során a RING1A/B monoubiquitinálja a H2A

hiszton 119. lizinjét, és ezzel segíti elő a kromoszóma kompaktációját és a célgén represszióját²⁶. A YAF2/RYPB alegységek ezt a monoubiquitinációt segítik elő, melynek a pontos mechanizmusa csak idén, 2024-ben vált ismertté²⁷. A legújabb eredmények rávilágítottak, hogy az ncPRC1 komplexek nemcsak represszív hanem aktivációs funkciókat is képesek ellátni²⁸. Az, hogy az RYPB-nek és a YAF2-nak különböző biológiai funkciói vannak-e, még mindig nem világos.



4. ábra - A cPRC1 és az ncPRC1 sematikus ábrája

3.9 Az R1 (*Rybp*^{+/+}) sejtvonal

Az R1 sejtvonal, egy 1993-ban izolált egér embrionális őssejt vonal. Kísérleteinkben referencia sejtvonalakat használtuk, az *Rybp*^{+/+} a vad típusú embrionális őssejtvonalat reprezentálja²⁹. A mutáns sejt kultúrákat mindig az *Rybp*^{+/+} őssejtvonalhoz hasonlítottuk.

3.10 Az *Rybp*^{-/-} sejtvonal

Ez egy R1 sejtvonalból létrehozott *Rybp null* homozigóta mutáns sejtvonal. A sejtvonalat homológ rekombináción alapuló géntargetálással hozták létre és a sejtvonal nem képes funkcionális RYPB fehérje termelésére¹⁵.

3.11 Az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} sejtvonal

Az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} sejtvonalat CRISPR–Cas9-mediált genom szerkesztéssel hozták létre *Rybp*^{KO} egér embrionális sejtvonalból³⁰.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Célul tűztük ki a dupla mutáns egér ősejtvonala alkalmazásával az ncPRC1 funkciók teljes mértékű felfüggesztését, majd a neurális differenciációra gyakorolt hatásának vizsgálatát. Valamint luciferáz riportert rendszer alkalmazásával annak vizsgálatát, vajon a *Pax6 P1* promóter szabályozásának tekintetében eltérő vagy átfedő-e a YAF2 és az RYBP funkciója.

Dolgozatomban az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

- Eltér-e a neurális differenciáció során expresszáldó stádium specifikus gének (*Oct4*, *NeuroD1*, *Nestin*, *Tubb3*) expressziója a dupla mutáns (*Rybp^{KO}/Yaf2^{KO}*) neurális differenciációja során a vad típusú (*Rybp^{+/+}*) és az *Rybp null* mutáns (*Rybp^{-/-}*) neurális differenciációjától?
- Milyen a TUBB3 és a NESTIN lokalizációja a dupla mutáns (*Rybp^{KO}/Yaf2^{KO}*) neurális differenciációja során a vad típusú (*Rybp^{+/+}*) és az *Rybp null* mutáns (*Rybp^{-/-}*) neurális differenciációjához képest?
- Eltér-e a *Pax6* és a *Paupar* expressziója a dupla mutáns (*Rybp^{KO}/Yaf2^{KO}*) neurális differenciációja során a vad típusú (*Rybp^{+/+}*) és az *Rybp null* mutáns (*Rybp^{-/-}*) neurális differenciációjától?
- Milyen a *Yaf2* két izoformájának, az AB és az NM izoformáknak az expressziója a vad típusú (*Rybp^{+/+}*) és az *Rybp null* mutáns (*Rybp^{-/-}*) sejtvonalak neurális differenciációja során?
- Képes-e a *Paupar* a YAF2-val vagy az RYBP-vel együttesen polikomb függő módon represszálni a *Pax6 P1* promóterét?
- Képes-e az ncPRC1.1 az irodalomnak megfelelően, represszálni a *Pax6 P1* promóterét?
- Képes-e az ncPRC1.1 a *Paupar* lncRNS-el együttesen polikomb függő módon represszálni a *Pax6 P1* promóterét?
- A YAF2 és az RYBP ko-expressziója képes-e kiváltani erősebb repressziót a *Pax6 P1* promóterén, mint a két gén önmagában?

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az anyagok és módszerek fejezetben szereplő anyagok pontos adatai a mellékletekben találhatóak.

5.1 Össejtek *in vitro* fenntartása

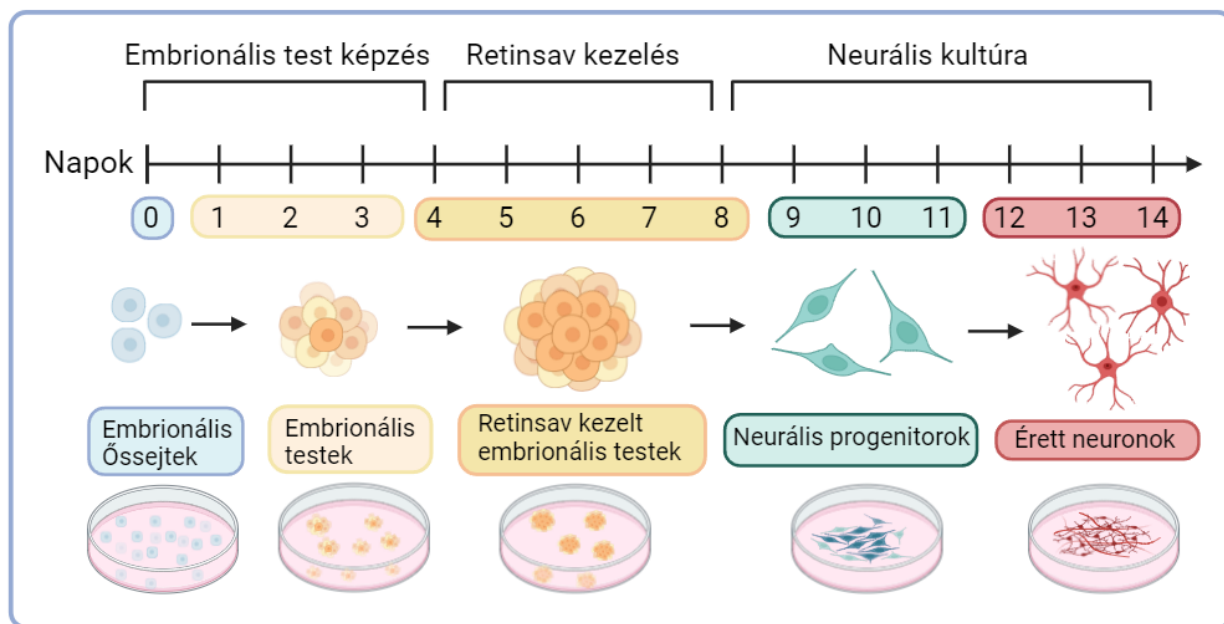
Az össejteket a folyékony nitrogénből kivéve mitomycin C-vel kezelt embrionális fibroblaszt (MEF) sejtekre olvasztottuk és inkubátorban (Contherm Mitre Series 4000), 5% CO₂-on és állandó 37°C-os hőmérsékleten tartottuk. A fenntartás során az össejtkultúrákat össejtes tápoldatot tartalmazó 0,1%-os zselatinnal bevont felszínű sejtenyésző csészékben növesztettük 65-70%-os sűrűségig. A tápoldat cseréjét naponta, a passzálást kétnaponta hajtottuk végre. A tápoldat cseréje során az elhasznált tápoldatot automata pipettával leszívtuk a csészéről és friss, előre felmelegített tápoldatot mértünk rá. Passzálás során a sejtek először egy 1x PBS-sel történő mosáson mentek keresztül, majd 1x tripszinnel kezelve 37°C-on 1 percen keresztül inkubálódtak. A kezelés során a letapadt összefüggő sejtenyészetről egysejtes szuszpenzió képződött, amit végül friss tápoldatot tartalmazó sejtenyésző csészékbe mértünk.

*Az össejtek *in vitro* fenntartása során használt anyagok pontos adatai a **Mellékletek-táblázat 2**-ben találhatóak*

5.2 *In vitro* neurális differenciáció

A kísérletek során három sejtvonalat használtunk fel: *Rybp*^{+/+}, *Rybp*^{-/-} és *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO}. A differenciáció kivitelezéséhez Bibel és munkatársai módszerét vettük alapul³¹ (5. ábra). Először az össejteket megfelelő sűrűségig növesztettük és Bürker kamra segítségével megszámoltuk. Majd 4,5x10⁶ darab sejtet tartalmazó szuszpenziót mértünk LIF mentes össejtes médiumot tartalmazó bakteriális csészékbe. Az össejteket ezt követően 8 napon keresztül inkubátorban (Contherm Mitre Series 4000), 5% CO₂-on és állandó 37°C-os hőmérsékleten tartottuk fenn. A bakteriális csészékben a sejtek szuszpenziós állapotban vannak, mivel nem képesek a csészék aljára letapadni. A szuszpenziós közegben aggregálódnak és embrionális testeket képeznek. A sejteken minden második nap cseréltünk tápoldatot, a 4. és a 6. napon a friss tápoldatot kiegészítettük 5 µM retinsavval, melyet steril DMSO-ban oldottunk fel. A retinsav szükséges a differenciálódás neurális irányba való eltolódásához. A 8. napon az embrionális testeket, a passzáláshoz hasonlóan, 1x-es tripszinnel disszociáltuk. Ezt követően a sejtek számát Bürker kamra segítségével határoztuk meg és 6x10⁶ sejtet zselatinnal, poli-L-ornitinnel és lamininnal kezelt sejtenyésző csészékbe mértünk. A 8. napon Neurális A médiumot mértünk a sejtekre és ezt másnap friss médiumra cseréltük, majd a 10. naptól Neurális B médiumban tartottuk fenn őket, tápoldatot a 12. napon cseréltünk.

A kísérletet az érett neuronok kifejlődéséig, a differenciáció 14. napjáig tartottuk fent. A vizsgálatainkhoz mintákat vettünk az *in vitro* neurális differenciáció 0., 3., 7., 10. valamint 14. napjain.



5. ábra - Az *in vitro* neurális differenciáció sematikus ábrája

Az *in vitro* neurális differenciáció során használt anyagok pontos adatai a **Mellékletek-táblázat 3**-ban találhatóak

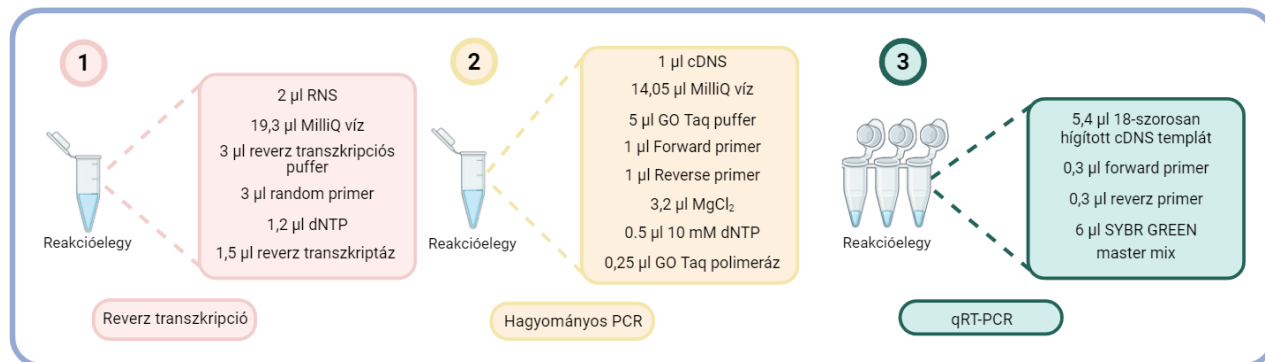
5.3 Génexpressziós vizsgálatok

A génexpressziós vizsgálatok során használt anyagok pontos adatai a **Mellékletek-táblázat 4**-ben találhatóak

5.3.1 RNS izolálása és tisztítása

Az RNS izolálás lépései a **6. ábrán** láthatóak. Az RNS izolálás első lépéseként a kultúrában levő sejteket mostuk 1x PBS-el, majd jégen lizáltuk β -merkaptóetanollal kiegészített lízis pufferrel. Ezt követően a lizátumot a GeneJET RNA Purification Kit segítségével tisztítottuk. A tisztított RNS-ek koncentrációit WPA Photometer UV 110 használatával mértük meg. A mintákat ezt követően -80°C -on tároltuk.

0,3 µl-t a reverz primerből és 6 µl-t a SYBR GREEN master mixből (**7. ábra 3**). A méréseket Rotor-Gene Q segítségével triplikátumokban végeztük el és a mérés qRT-PCR programja a **3. táblázat**-ban található. A triplikátumok mérése során kapott Ct (threshold cycle) értékeket átlagoltuk és normalizáltuk a *Hprt* háztartási gén Ct értékeivel, majd a vad típusú d0 minta értékeihez viszonyítottuk. A génexpressziós változást kiszámítása során a következő képletet alkalmaztuk: $2^{((\text{Átlag Ct} - \text{Átlag Ct}_{Hprt}) - (\Delta \text{Ct}_{R1d0})) * (-1)} = 2^{-\Delta \Delta \text{Ct}}$. A qRT-PCR során használt primerek szekvenciái a **Mellékletek-táblázat 1**-ben kerültek felsorolásra.



7. ábra - A PCR-ok során összemért reakcióelegyek pontos összetétele

1-A Reverz transzkripció reakcióelegye, 2-A hagyományos PCR reakcióelegye,

3-A qRT-PCR reakcióelegye

Ciklusok	Hőmérséklet (C°)	Idő
1. lépés	25	10 perc
2. lépés	37	2 óra
3. lépés	0	5 perc
4. lépés	75	10 perc
5. lépés	4	-

1. táblázat - A reverz transzkripció programja

Ciklusok	Hőmérséklet (C°)	Idő
1. lépés: elődenaturáció	94	2 perc
2. lépés: 30 ciklus	94 (denaturáció)	30 másodperc
	63 (annealing)	30 másodperc
	72 (polimerizáció)	45 másodperc
3. lépés: végső polimerizáció	72	5 perc
4. lépés	4	-

2. táblázat - A hagyományos PCR programja

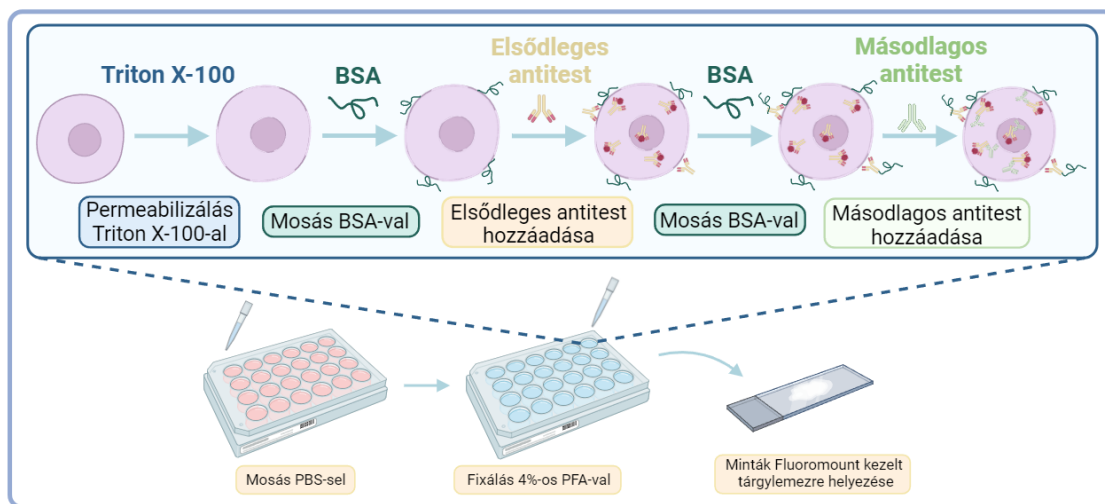
Ciklusok	Hőmérséklet (°C)	Inkubációs idő
1. lépés	95	5 perc
2. lépés: 40 db ciklus	95 (denaturáció)	15 másodperc
	58 (annealing)	30 másodperc
	72 (polimerizáció)	30 másodperc
3. lépés	65-95 (1°C-os lépésekben)	10 másodperc/lépés
4. lépés	4	-

3. táblázat - A qRT-PCR programja

5.4 Immuncitokémia (ICC)

Az immuncitokémia lépései a **8. ábrán** láthatóak. A minták fixálása során az *in vitro* neurális differenciációból származó sejteket mostuk 1x PBS-sel (Gibco, kat. szám: 14190-144) majd 4%-os PFA-val (Sigma-Aldrich, kat. szám: P6148) 4°C-on 20 percig inkubáltuk. A fixált mintákat 4°C-on 1x PBS-ben tároltuk felhasználásig. Az ICC során a fixált mintákat 1x PBS-sel mostuk, majd a sejtmembránt 0,2%-os Triton X-100-al (Sigma-Aldrich, kat. szám: T8787 250ML) 20 percig szobahőmérsékleten permeabilizáltuk. Ezt követően a mintákat 5%-os BSA-val (Sigma-Aldrich, kat. szám: A7906) 1 óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubálást követően a sejtekhez hozzáadtuk az 5%-os BSA-ban oldott anti-NESTIN (DSHB, 1:100 hígításban) és anti-TUBB3 (Convance, kat. szám: PRB-435P, 1:2000 hígításban) elsődleges antitesteket és egész éjszakán keresztül 4°C-n tartottuk. Másnap a mintákat 5x5 percig mostuk 1xPBS-sel, majd 5%-os BSA-val 1 óráig szobahőmérsékleten blokkoltuk. A mintákat alufóliával lefedtük és hozzáadtuk az

Alexa Fluor 488 Donkey-anti-Rabbit IgG (H+L) (Invitrogen, kat. szám: A-10667 1:2000 hígításban) és Alexa Fluor 647 Donkey-anti-Mouse IgG (H+L) (Invitrogen, kat. szám: A-31571, 1:2000 hígításban) másodlagos antitesteket. A sejteket 1 óráig 4°C-on tartottuk, majd háromszor 10 percig PBS-sel mostuk. A mintákat 20 percig 1x PBS-ben oldott DAPI-val (Vector Laboratories, kat. szám: H-1200), kezeltük, majd háromszor 5 percig 1x PBS-sel mostuk. A mintákat tárgylemezre mért fluoromountba (Thermo Fisher Scientific, kat. szám: 00 4958-02) helyeztük, melyet fedőlemezrel fedtünk le. Az ICC mintákat konfokális mikroszkóp segítségével elemeztük (Olympus Confocal; IX 81 mikroszkóp; FV100).



8. ábra - Az immuncitokémia sematikus ábrája

5.5 DH5α sejtek transzformálása és plazmidok izolálása

5.5.1 Kompetens sejt készítés DH5α sejtekből

A DH5α sejteket felhasználásig -80°C-on tároltuk. A kompetenssé tételhez a sejteket jégen 20 perc alatt felolvasztottuk, majd belőlük LB agart (Sigma-Aldrich, kat. szám: A4718-100G) tartalmazó bakteriális csészékre szélesztettünk és 37°C-on egész éjszaka inkubáltuk. Másnap fogpiszkáló segítségével egy kolóniát LB médiumba helyeztünk és 37°C-on egész éjszaka rázás mellett növesztettünk. A harmadik nap a sejtes szuszpenziót áthelyeztük 200 ml LB médiumot tartalmazó lombikba és tovább növesztetük 37°C-on rázás mellett. A sejtek növekedését WPA Photometer UV 110 segítségével óránként mértük, amíg el nem érték a 0,3-as értéket OD₆₀₀-on.

5.5.2 A plazmidok transzformálása

Transzformálás során a kompetens DH5α sejteket -80°C-ról kivéve jégen olvasztottuk fel 20 perc alatt. Ezt követően hozzámértük a plazmidot és 5 percig jégen inkubáltuk. Majd 45 másodpercig 42°C-on hősokkoltuk és utána azonnal 5 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően LB médiumot

adtunk hozzájuk és 1 órán keresztül 37°C-on rázás mellett növesztettük. Miután a sejtek felnőttek, ampicillinnel (Sigma-Aldrich, kat. szám: A9518-25G) kiegészített LB agart tartalmazó bakteriális csészékre szélesztettük őket, majd 37°C-on egész éjszaka inkubáltuk. Másnap a kolóniákból steril fogpiszkálóval ampicillin tartalmú LB médiumban helyeztünk egyet. A sejteket egész éjszakán át 37°C-on rázás mellett növesztettük.

5.5.3 A plazmidok izolálása

Az izolálás során a felnövesztett kolóniát a NucleoBond Xtra Midi kit (MACHEREY-NAGEL, kat. szám: MN740410.50) alapján izoláltuk. Az izolált plazmidokat TE pufferben (Sigma, kat. szám: T1503) oldottuk fel, majd 4°C-on tároltuk őket. A plazmidokat ellenőrzés végett emésztettük és megfuttattuk őket 1,5%-os agaróz gélen.

5.6 Luciferáz riporter rendszer

A luciferáz riporter rendszer lépései a **9. ábrán** láthatóak. Ennek során, HEK 293 sejtekbe fehérjét (RYBP, RING1B, YAF2, PCGF1) és RNS-t (*Paupar*) túltermelő plazmidokat transzfektáltunk promotert és riporter gént tartalmazó plazmiddal együtt. Majd a sejteket lizáltuk és a kibocsátott lumineszcenciát lemértük.

Az átíródó fehérjék expresszióját a mintákban Western blot segítségével igazoltuk, példa a **Mellékletek-példa 1**-ben található.

*A luciferáz riporter rendszer során használt anyagok pontos adatai a **Mellékletek-táblázat 5**-ben találhatóak*

5.6.1 HEK 293 sejtek tenyésztése

HEK 293 sejteket olvasztásig folyékony nitrogénben tároltuk. A kiolvasztott sejteket HEK médiumot tartalmazó sejttenyésztő csészékben növesztettük és inkubátorban (Contherm Mitre Series 4000), 5% CO₂-on és állandó 37°C-os hőmérsékleten tartottuk. A sejteket minden második nap passzáltuk, amelynek során az elhasznált tápoldatot automata pipettával leszívtuk a csészéről és friss, előre felmelegített tápoldatot mértünk rá. Passzálás során a sejtek először egy 1x PBS-sel történő mosáson mentek keresztül, majd 1x tripszinnel kezelve 37°C-on 1 percen keresztül inkubálódtak. A kezelés során a letapadt, összefüggő sejtenyészetből egysejtes szuszpenzió képződött, amit végül friss tápoldatot tartalmazó sejttenyésztő csészékbe mértünk.

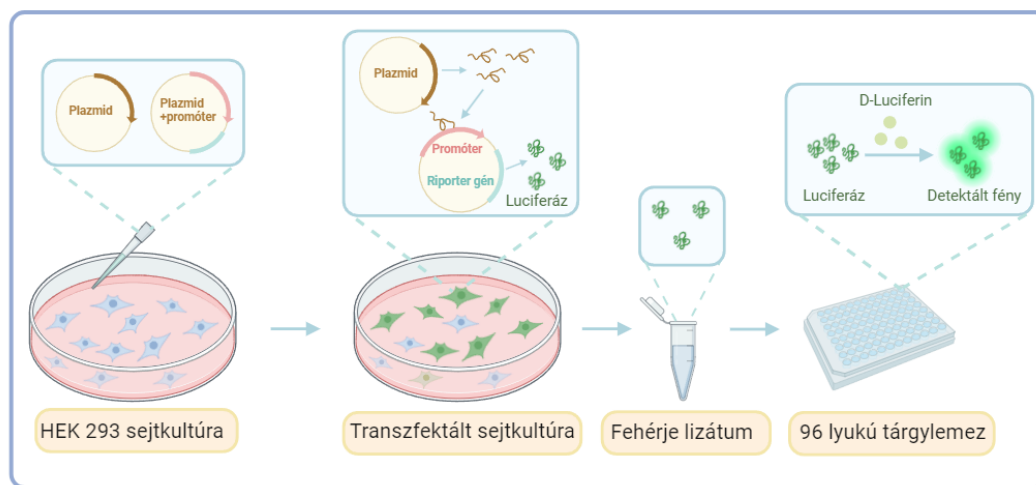
5.6.2 Ca₃(PO₄)₂ Transzfekció

A transzfekció³² során a HEK 293 sejteket megfelelő sűrűségig növesztettük és Bürker-kamra segítségével megszámoltuk őket. A sejtszuszenzióból 0,8x10⁶ sejtet 6 cm-es HEK médiumot

tartalmazó sejtenyésző csészékbe mértünk. Másnap a sejteket tápoldat cserét követően 4 órával transzfektáltuk. A $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ transzfekció során 225 μl 0,1x TE pufferhez hozzáadtunk 5 μg -ot a megfelelő plazmidból és ehhez az elegyhez rázás mellett 25 μl 2,5 M CaCl_2 -ot pipettáztunk. Ezt követően buborékolatás mellett hozzáadtunk 250 μl 2x HBSS-t (pH 7.12) és a reakció elegyet 3 percig inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után 300 μl -t csöpögtettünk a reakció mixből a HEK 293 sejtekhez. A transzfekciót követően 16 óra elteltével tápoldatot cseréltünk a sejteken.

5.6.3 Sejtek lizálása és a lumineszcencia mérése

A transzfektált HEK 293 sejtek lízisét a luciferáz riporter rendszer kit (Luciferase Assay System, Promega, Cat. E1500) leírása szerint hajtottuk végre. A sejtekből izolált fehérjék koncentrációit Bradford-próbával határoztuk meg. Ennek során a mintákat 10-szeresen hígítottuk és 1-1 ml 1x Bradford reagenssel vegyítettük. A fehérjeminták fényelnyelését spektrofotométer segítségével 600 nm-en mértük. Ezt követően hatlépcsős BSA hígítási sor spektrofotometriás fényelnyelése alapján kalibrációs egyenest készítettünk. A minták koncentrációit a kalibrációs egyenes alapján számoltuk ki. Ezt követően a fehérje mintáinkból 20 μg -ot 96-lyukú tenyésztő edénybe pipettáztunk, majd sötét szobában zöld lámpa fénye alatt további 100 μl LARII szubsztrátot mértünk. A LARII hatására keletkező lumineszcencia méréséhez TopCount NXT luminométert alkalmaztunk.



9. ábra - A luciferáz riporter rendszer sematikus ábrája

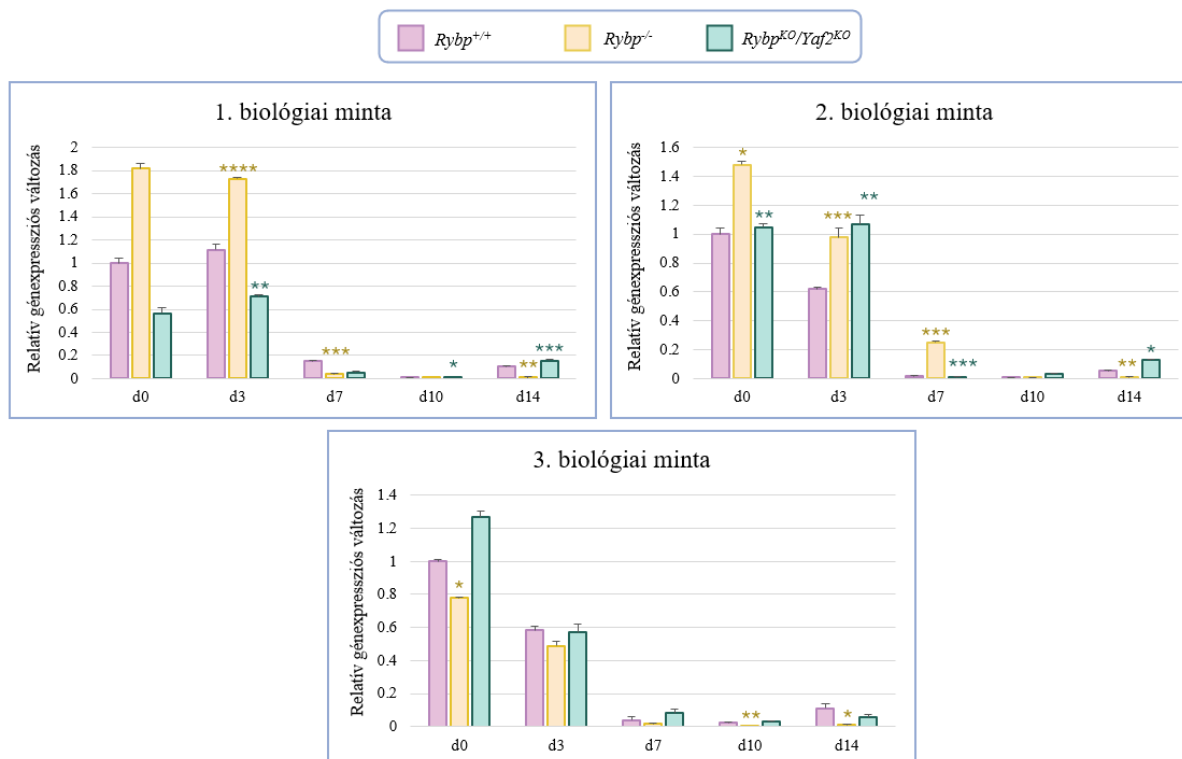
6. EREDMÉNYEK

A kísérletek során három független differenciációból származó mintákat (3 biológiai minta) mértem össze triplikátumokban, majd elemeztem qRT-PCR segítségével a 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.6, 6.7, 6.8 fejezetekben.

6.1 Az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} sejtvonal *Oct4* mRNS szintjének analízise az *Rybp*^{+/+} és *Rybp*^{-/-} sejtvonalakhoz viszonyítva *in vitro* neurális differenciáció során

Kísérletes munkám kiindulópontját az a korábbi megfigyelés alkotta, hogy az *Rybp*^{-/-} kultúrákban a neurális differenciáció zavart szenvedett: ugyan több progenitor képződött, de azokból kevesebb érett neuron fejlődött az *Rybp*^{+/+} kultúrákhoz képest¹⁶. Ezért először az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} egér őssejtvonalak differenciációját hasonlítottam össze a már korábban vizsgált két sejtvonal (*Rybp*^{+/+} és *Rybp*^{-/-}) differenciációs képességével. Ehhez a három sejtvonalat *in vitro* differenciáltattam neurális irányba (5.2 fejezet), majd RNS mintát gyűjtöttem a kísérlet 0., 3., 7., 10. és 14. napján (d0, d3, d7, d10, d14). A 0. nap a pluripotens őssejt állapotot képviseli. A 3. napra az őssejtek embrionális testekké állnak össze, amiket a 8. napig retinsavval kezeltünk. A 10. nap a sejtek neurális progenitorokká alakulnak, majd a 14. nap a progenitorokból terminálisan differenciálódott neuronok keletkeznek. A differenciáció során gyűjtött minták génexpressziós változásainak nyomonkövetése céljából az RNS mintákból reverz transzkripcióval cDNS-t írtam át, majd qRT-PCR segítségével vizsgáltam (5.3 fejezet). Elsőként a sejtvonalakban a pluripotencia fenntartásáért felelős *Oct4* (*Pou5f1*) gén expresszióját vizsgáltam. A differenciáció előfeltétele a pluripotens állapotból való kilépés. Ennek megfelelően a pluripotencia markergének expressziójának lecsengése előfeltétele a sejtek differenciációjának. Eredményeink (10. ábra) alapján elmondható, hogy a differenciáció 7. napjától mindegyik sejtvonal *Oct4* szintje lecsökkent. Ez alapján arra következtethetünk, hogy *Rybp* és *Yaf2* hiányában is lecseng az *Oct4* pluripotencia markergén

expressziója. Tehát a mutáns sejtvonalak differenciációja során bekövetkező eltérések oka a vad típusú sejtvonalkhoz képest valószínűleg nem az *Oct4* csendesítésének defektusában keresendő.



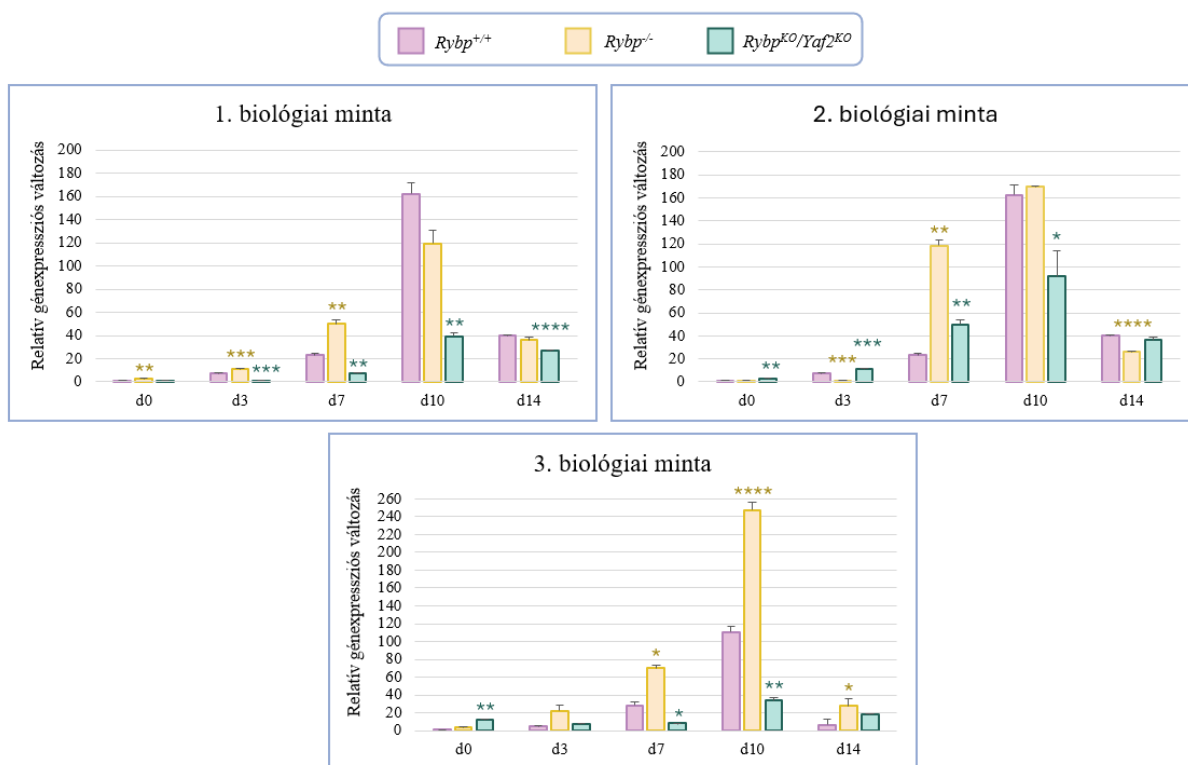
10. ábra - Az *Oct4* mRNS szintje az $Rybp^{+/+}$ sejtvonalkhoz hasonlóan a mutánsokban is lecsengett

Az *Oct4* mRNS szintje az $Rybp^{+/+}$ (lila), $Rybp^{-/-}$ (sárga) és $Rybp^{KO}/Yaf2^{KO}$ (zöld) sejtvonalak *in vitro* neurális differenciációja során. A génexpressziós változásokat a *Hprt* kifejeződéséhez és az *Oct4* $Rybp^{+/+}$ sejtvonalk d0 mintájának mRNS szintjéhez normalizáltuk. Az y tengelyen a relatív génexpressziós változást, az x tengelyen a mintavételi napokat tüntettük fel. A párhuzamos mintákra szórást számoltunk: standard deviáció $\pm$ SD. A mutánsok génexpressziójának szignifikanciáját az $Rybp^{+/+}$ sejtvonalk génexpressziójához viszonyítottuk: t-próba ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****)

6.2 Az $Rybp^{KO}/Yaf2^{KO}$ sejtvonalk *Nestin* mRNS szintjének analízise az $Rybp^{+/+}$ és $Rybp^{-/-}$ sejtvonalkokhoz viszonyítva *in vitro* neurális differenciáció során

Ezt követően a *Nestin* mRNS expresszió kinetikáját vizsgáltam az *in vitro* neurális differenciáció folyamán (11. ábra). A *Nestin* az egyik legkorábbi neurális markerek egyike, szintje már a differenciáció kezdeti fázisában megnő. Az $Rybp^{+/+}$ és az $Rybp^{-/-}$ az előzetes adatainknak megfelelő kinetikával rendelkezett. Az $Rybp^{-/-}$ sejtvonalk *Nestin* szintje a differenciáció 7. napján magasabb a másik két sejtvonalkénál. Majd a 10. napon az $Rybp^{+/+}$ és az $Rybp^{-/-}$ sejtvonalk *Nestin* szintje tetőzik.

Ezen adatokhoz viszonyítva az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} sejtvonaltól *Nestin* szintje végig a legalacsonyabb maradt. Kivételt csak a 14. napon találtunk, amikor mindhárom sejtvonaltól *Nestin* szintje hasonlóan alakult. Mivel a *Nestin* a progenitorokban termelődik legnagyobb mennyiségben, mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a *Yaf2* szerepet játszhat a progenitorok kialakításában.



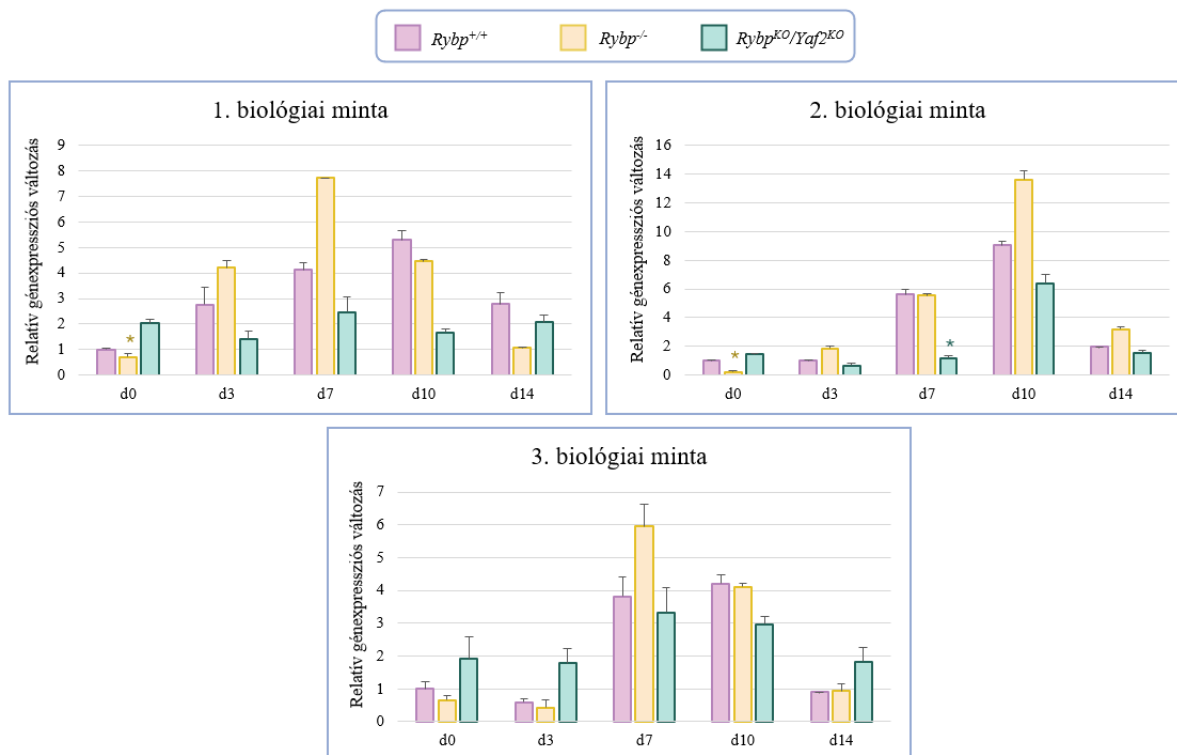
11. ábra - Az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} sejtvonaltól *Nestin* szintje alacsonyabb a másik két sejtvonaltól képest

A *Nestin* mRNS szintje az *Rybp*^{+/+} (lila), *Rybp*^{-/-} (sárga) és *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} (zöld) sejtvonaltól *in vitro* neurális differenciációja során. A génexpressziós változásokat a *Hprt* kifejeződéséhez és az *Nestin* *Rybp*^{+/+} sejtvonaltól d0 mintájának mRNS szintjéhez normalizáltuk. Az y tengelyen a relatív génexpressziós változást, az x tengelyen a mintavételi napokat tüntettük fel. A párhuzamos mintákra szórást számoltunk: standard deviáció $\pm$ SD. A mutánsok génexpressziójának szignifikanciáját az *Rybp*^{+/+} sejtvonaltól génexpressziójához viszonyítottuk : t-próba ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***; $p < 0,0001$ ****)

6.3 Az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} sejtvonaltól *NeuroD1* mRNS szintjének analízise az *Rybp*^{+/+} és *Rybp*^{-/-} sejtvonaltólhoz viszonyítva az *in vitro* neurális differenciáció során

A korai után a későbbi neurális folyamatok során szerepet játszó gének mRNS szintjét is vizsgáltam, ilyen gén a *NeuroD1*, amely a posztmitotikus neuronokban expresszálódik. Eredményeink alapján (12. ábra) az *Rybp*^{+/+} és az *Rybp*^{-/-} sejtvonaltól *NeuroD1* szintje a progenitor

stádiumban megemelkedik, ami a vártak megfelelően megegyezik a korábbi eredményeinkkel. Az $Rybp^{KO}/Yaf2^{KO}$ sejtvonal $NeuroD1$ szintje viszont alacsonyabb volt a differenciáció progenitor stádiumában a másik két sejtvonalénál. Ez alapján arra következtethetünk, hogy az ncPRC1 két központi tagjának ($Yaf2$ -nak és az $Rybp$ -nek) teljes hiánya kevesebb posztmitotikus neuron keletkezéséhez vezet.



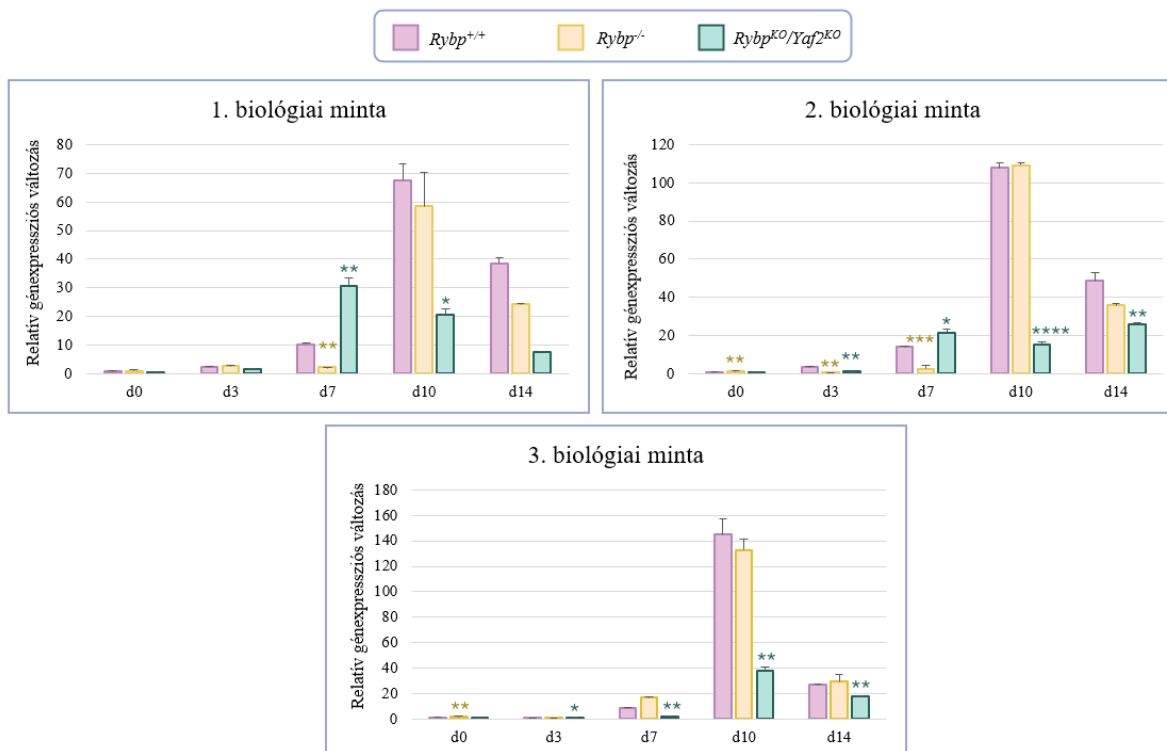
12. ábra - Az $Rybp^{KO}/Yaf2^{KO}$ sejtvonal $NeuroD1$ szintje alacsonyabb a másik két sejtvonaléhoz képest

A $NeuroD1$ mRNS szintje az $Rybp^{+/+}$ (lila), $Rybp^{-/-}$ (sárga) és $Rybp^{KO}/Yaf2^{KO}$ (zöld) sejtvonalak *in vitro* neurális differenciációja során. A génexpressziós változásokat a $Hprt$ kifejeződéséhez és az $NeuroD1$ $Rybp^{+/+}$ sejtvonal d0 mintájának mRNS szintjéhez normalizáltuk. Az y tengelyen a relatív génexpressziós változást, az x tengelyen a mintavételi napokat tüntettük fel. A párhuzamos mintákra szórást számoltunk: standard deviáció $\pm$ SD. A mutánsok génexpressziójának szignifikanciáját az $Rybp^{+/+}$ sejtvonal génexpressziójához viszonyítottuk: t-próba ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***; $p < 0,0001$ ****)

6.4 Az $Rybp^{KO}/Yaf2^{KO}$ sejtvonal $Tubb3$ mRNS szintjének analízise az $Rybp^{+/+}$ és $Rybp^{-/-}$ sejtvonalakhoz viszonyítva *in vitro* neurális differenciáció során

A $NeuroD1$ mellett a $Tubb3$ késői marker mRNS szintjét vizsgáltam, amely a terminálisan differenciálódott neuronokban található. Eredményeink alapján (13. ábra) az $Rybp^{-/-}$ sejtvonal

Tubb3 szintje a 7. napon alacsonyabb az *Rybp*^{+/+} szintjénél. A 10 napon a két sejtvonal szintje hasonlóan megemelkedik, majd a 14. napon lecsökken. Az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} sejtvonal *Tubb3* szintje a 7. napon magasabb volt a másik két sejtvonalénál, de az azt követő napokon a szintje nem emelkedett meg a többi sejtvonaléhoz hasonlóan. Ez alapján azt feltételezhetjük, hogy a *Yaf2*-nak szerepe lehet a terminálisan differenciálódott neuronok keletkezésében.



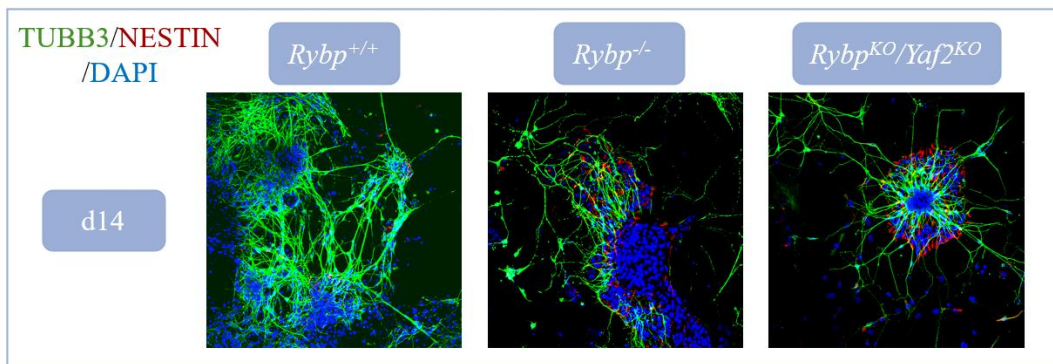
13. ábra - A *Tubb3* mRNS szintje az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} sejtvonal differenciációjának késői szakaszában alacsonyabb a másik két sejtvonalénál

A *Tubb3* mRNS szintje az *Rybp*^{+/+} (lila), *Rybp*^{-/-} (sárga) és *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} (zöld) sejtvonalak *in vitro* neurális differenciációja során. A génexpressziós változásokat a *Hprt* kifejeződéséhez és az *Tubb3* *Rybp*^{+/+} sejtvonal d0 mintájának mRNS szintjéhez normalizáltuk. Az y tengelyen a relatív génexpressziós változást, az x tengelyen a mintavételi napokat tüntettük fel. A párhuzamos mintákra szórást számoltunk: standard deviáció $\pm$ SD. A mutánsok génexpressziójának szignifikanciáját az *Rybp*^{+/+} sejtvonal génexpressziójához viszonyítottuk : t-próba ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***; $p < 0,0001$ ****)

6.5 A TUBB3 és a NESTIN lokalizációja az *in vitro* neurális differenciáció késői szakaszaiban

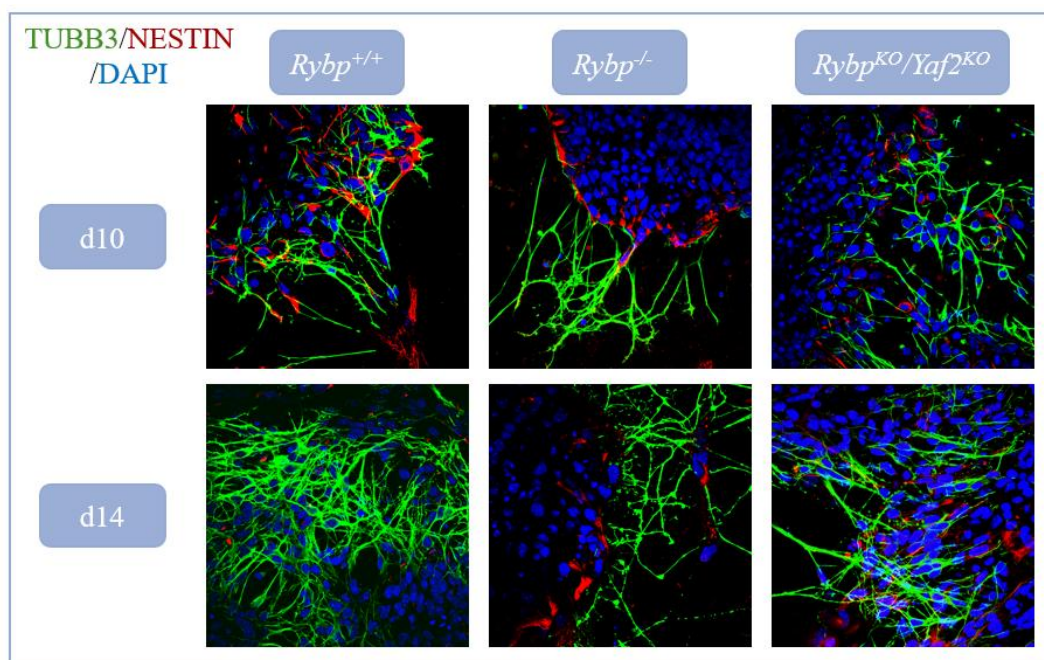
A qRT-PCR kísérletek az mRNS mennyiségéről nyújtottak információt, ezért immuncitokémiai analízissel megvizsgáltuk a TUBB3 és a NESTIN fehérjék térbeli eloszlását is (5.4 fejezet). Ehhez a 10. és a 14. napon mintát vettünk, majd TUBB3 és NESTIN antitestek segítségével immunfestést

végeztem. Először a kultúrákat 20x nagyításban vizsgáltuk (**14. ábra**). A TUBB3 festéssel jól látható, hogy a neurális differenciáció folyamán az *Rybp*^{+/+} sejtvonaltól komplex hálózatot hozott létre. Ezzel szemben a másik két sejtvonaltól kevésbé komplex hálózatokat alakít ki. Valamint elmondható, hogy az *Rybp*^{+/+} sejtvonaltól tűnik a legstrukturáltabbnak és az *Rybp*^{-/-} sejtvonaltól a legkevésbé strukturálnak. Majd a kultúrákat nagyobb, 60x nagyítással is megvizsgáltuk (**15. ábra**). A 10. napon az *Rybp*^{+/+} sejtvonaltól volt a legkifejezettebb NESTIN jel, ami a 14. napon a terminális fázisban már nem volt jelen. Ezzel szemben mindkét mutáns sejtvonaltól a 14. napon is látható volt. Ami arra utal, hogy az ncPRC1 központi tagjainak hiányában több progenitor képződik a kultúrában. Az eredmények alapján arra következtethetünk, hogy mind három sejtvonaltól képes létrehozni neuroprogenitotokat és terminálisan differenciálódott neuronokat. Ugyanakkor a differenciáció terminális szakaszában a mutáns sejtvonaltól jóval több neuroprogenitort és kevesebb terminálisan differenciálódott neuront tartalmaznak, mint a vad típusú sejtvonaltól. Továbbá az *Rybp*^{-/-} sejtek axonjai kevésbé komplex hálózatot hoztak létre és kevesebb sejtet érintettek, mint a másik két sejtvonaltól axonjai. Ez arra enged következtetni, hogy az *Rybp*-nek és a *Yaf2*-nek szerepe lehet a sejtek közötti neurális hálózatok kialakításában.



14. ábra - A három sejtvonaltól összehasonlítása az *in vitro* neurális differenciáció terminális szakaszában

A neurális progenitor marker NESTIN (piros) és a terminálisan differenciálódott neuronokat jelölő TUBB3 (zöld) marker fehérjék lokalizációja az *Rybp*^{+/+}, *Rybp*^{-/-} és az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} d14 neurális kultúrákban. Objektív: 20x, lépték: 100 µm.

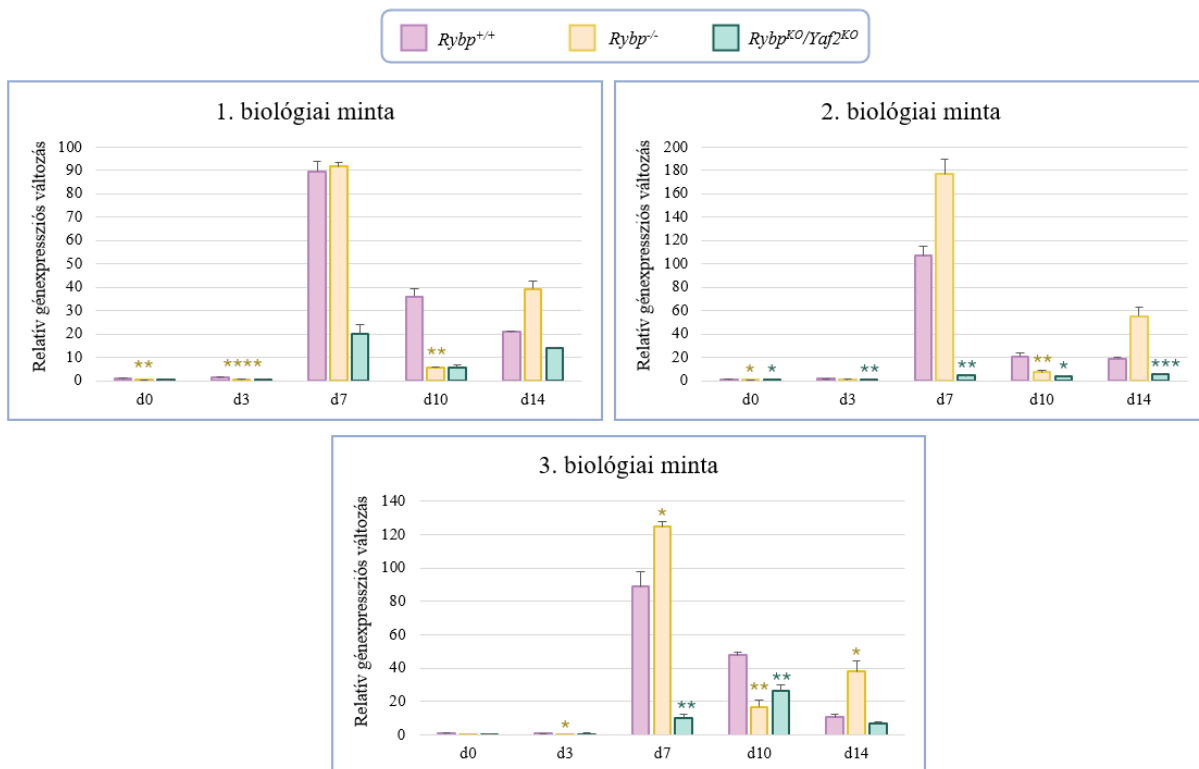


15. ábra - A három sejtvonal összehasonlítása neuroprogenitorok és terminális differenciálódott neuronok szempontjából

A neurális progenitor marker NESTIN (piros) és a terminálisan differenciálódott neuronokat jelölő TUBB3 (zöld) marker fehérjék lokalizációja az *Rybp*^{+/+}, *Rybp*^{-/-} és az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} d10 és d14 neurális kultúrákban. Objektív: 60x, lépték: 100 μ m.

6.6 Az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} sejtvonal *Pax6* mRNS szintjének analízise az *Rybp*^{+/+} és *Rybp*^{-/-} sejtvonalakhoz viszonyítva *in vitro* neurális differenciáció során

Csoportunk korábban megvizsgálta már az *Rybp* szerepét a *Pax6* szabályozásában. Mi arra voltunk kíváncsiak, hogy miképp változik az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} sejtvonal *Pax6* mRNS szintje. Ugyanis ebben a sejtvonalban nincs jelen *Yaf2*, ami kompenzálni tudná az *Rybp*-t. Jelen eredményeink **(16. ábra)** megfelelnek a korábbi eredményeinknek, *Rybp*^{+/+} és *Rybp*^{-/-} sejtvonalban a differenciáció 7. napján megemelkedik a *Pax6* mRNS szintje, majd az *Rybp*^{+/+} sejtvonalban a 14. napra lecsökken, míg az *Rybp*^{-/-} sejtvonalban a 14. napon magas marad a szintje. Ehhez viszonyítva az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} sejtvonal *Pax6* szintje megemelkedik a 7. napon, viszont lényegesen alacsonyabb a másik két sejtvonalhoz képest. Eredményeink azt mutatják, hogy az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} sejtvonalban kevesebb a progenitor képzsében fontos *Pax6* mennyisége.



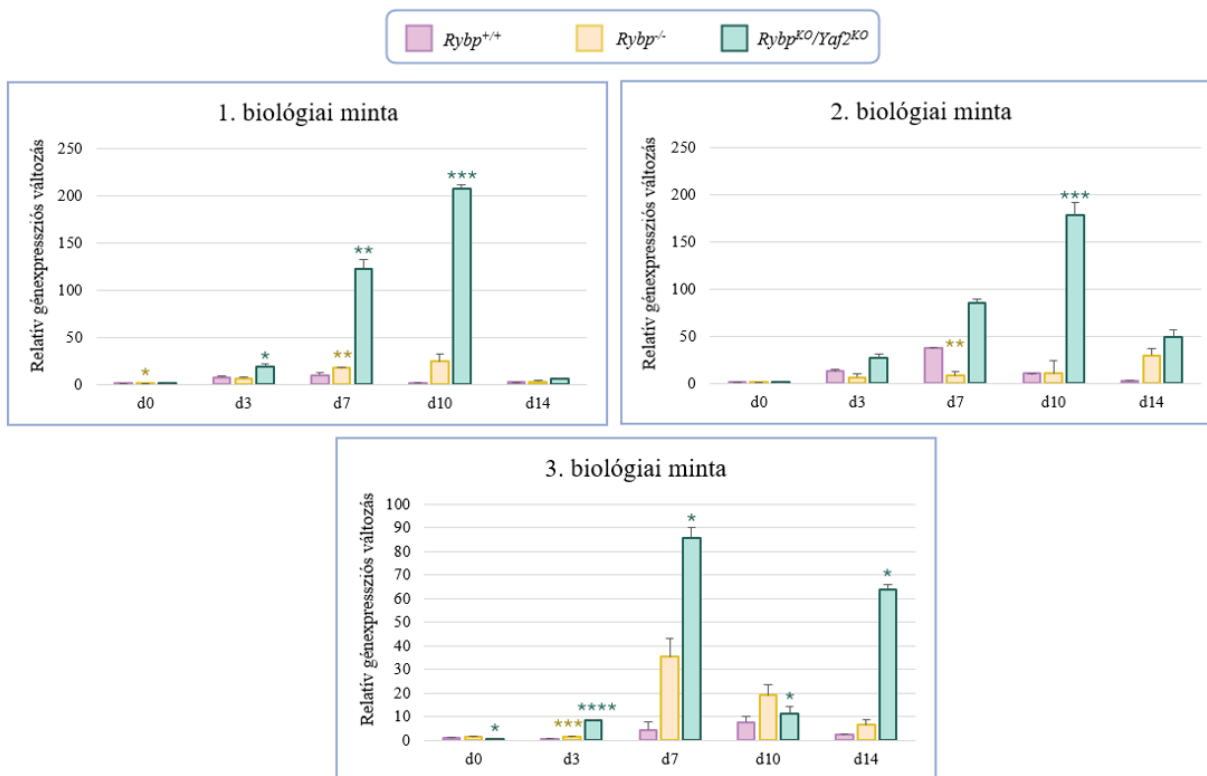
16. ábra - *Rybp* hiányában a *Pax6* szintje magas marad a differenciáció terminális szakaszában, míg *Rybp* és *Yaf2* hiányában a vad típusú sejtvonalhoz képest kevésbé expresszálódik.

A *Pax6* mRNS szintje az *Rybp*^{+/+} (lila), *Rybp*^{-/-} (sárga) és *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} (zöld) sejtvonalak *in vitro* neurális differenciációja során. A génexpressziós változásokat a *Hprt* kifejeződéséhez és a *Pax6* *Rybp*^{+/+} sejtvonal d0 mintájának mRNS szintjéhez normalizáltuk. Az y tengelyen a relatív génexpressziós változást, az x tengelyen a mintavételi napokat tüntettük fel. A párhuzamos mintákra szórást számoltunk: standard deviáció $\pm$ SD. A mutánsok génexpressziójának szignifikanciáját az *Rybp*^{+/+} sejtvonal génexpressziójához viszonyítottuk : t-próba ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****)

6.7 Az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} sejtvonal *Paupar* mRNS szintjének analízise az *Rybp*^{+/+} és *Rybp*^{-/-} sejtvonalakhoz viszonyítva *in vitro* neurális differenciáció során

Kísérletem alapján a *Pax6* mRNS szintje *Rybp* és *Yaf2* hiányában lecsökkent. Mivel irodalomból ismertük, hogy a *Pax6* lókuszában elhelyezkedő *lncRNS*-nek (*Paupar*) szerepe van a *Pax6* szabályozásában, megvizsgáltuk vajon hatással van-e a *Paupar* mRNS szintjére az ncPRC1 két központi tagjának együttes hiánya¹³. Eredményeink alapján (17. ábra) az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} sejtvonal *Paupar* mRNS szintje a 3. naptól a 10. napig növekszik, majd lecsökken és az expressziója

kifejezettebb a másik két sejtvonalénál. Ez alapján arra következtethetünk, hogy az *Rybp*-nek és a *Yaf2*-nak szerepe lehet a *Paupar* szabályozásában. Továbbá az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} sejtvonalban az alacsony *Pax6* szint **(6.6 fejezet)**, összefügghet azzal is, hogy a megnövekedett *Paupar* szint következtében a *Paupar* általi represszió **(3.5 fejezet)** is relevánsabb az ncPRC1 két központi tagjának együttes hiányában.



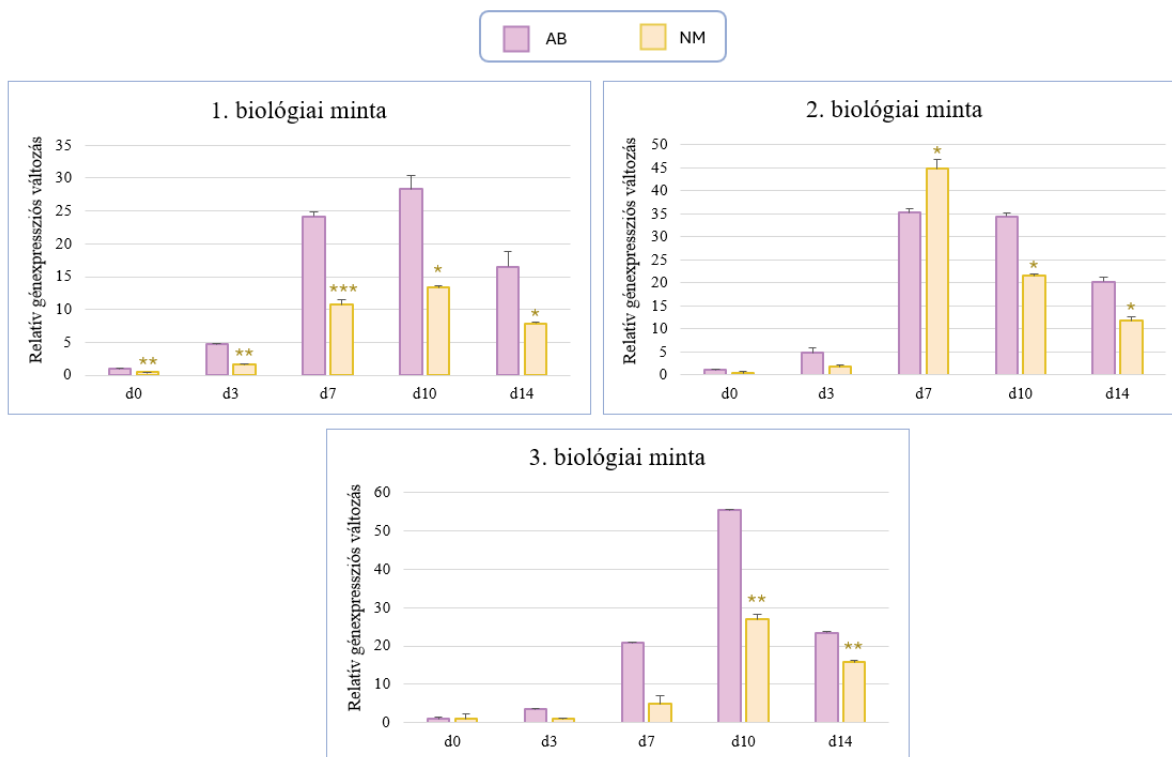
17. ábra - A *Paupar* mRNA szintje az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} sejtvonalban jelentősen magasabb a másik két sejtvonaléhoz képest

A *Paupar* mRNA szintje az *Rybp*^{+/+} (lila), *Rybp*^{-/-} (sárga) és *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} (zöld) sejtvonalak in vitro neurális differenciációja során. A génexpressziós változásokat a *Hprt* kifejeződéséhez és a *Paupar* *Rybp*^{+/+} sejtvonal d0 mintájának mRNA szintjéhez normalizáltuk. Az y tengelyen a relatív génexpressziós változást, az x tengelyen a mintavételi napokat tüntettük fel. A párhuzamos mintákra szórást számoltunk: standard deviáció ±SD. A mutánsok génexpressziójának szignifikanciáját az *Rybp*^{+/+} sejtvonal génexpressziójához viszonyítottuk : t-próba ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****)

6.8 A *Yaf2* izomformák mRNA vizsgálata

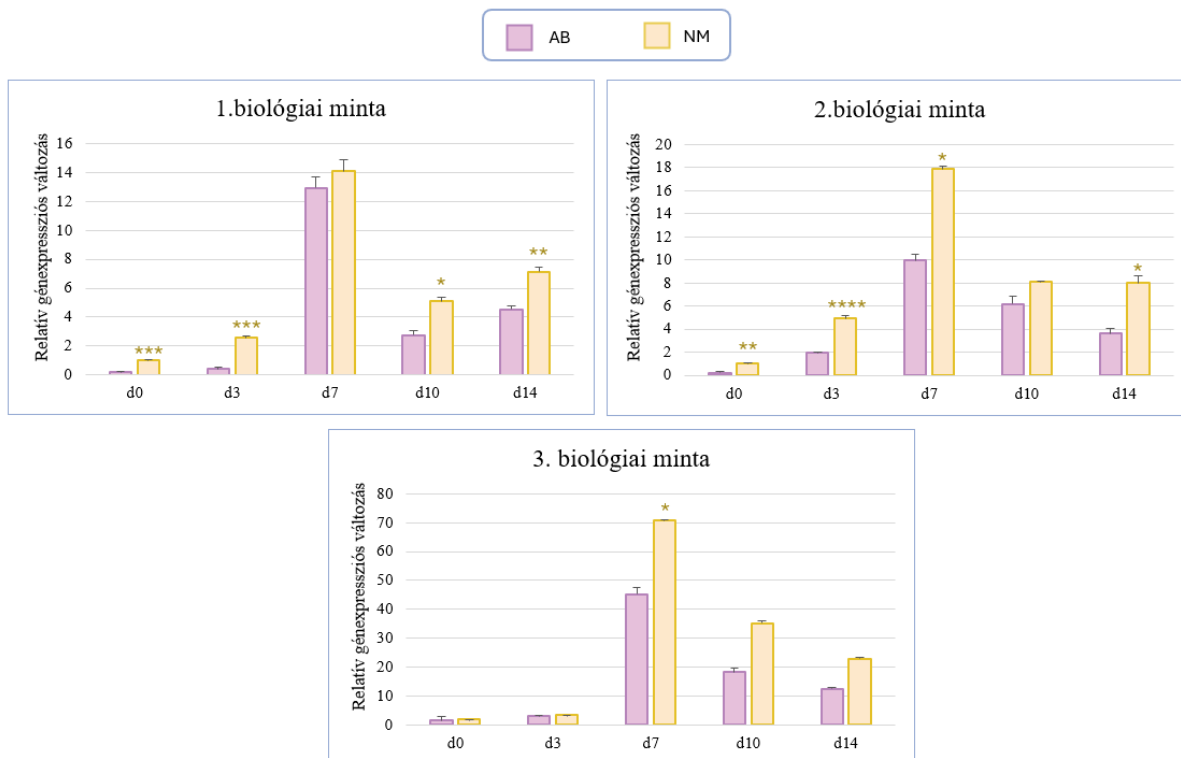
Ezt követően a *Yaf2* két izomformáját, az AB és az NM izomformát vizsgáltuk *Rybp* jelenlétében és *Rybp* hiányában. Előzetes adataink alapján a *Yaf2* nem képes kompenzálni az *Rybp* hiányát, mi arra voltunk kíváncsiak, hogy a két izoforma milyen mennyiségben fordul elő egymáshoz képest a két

sejtvonalban. Eredményeink alapján **(18. ábra és 19. ábra)** a vad típusú sejtvonalban az AB izoforma nagyobb mennyiségben fordult elő, mint az NM. Míg az *Rybp*^{-/-} sejtvonal az NM izoformából tartalmazott többet. Ez alapján arra következtethetünk, hogy az *Rybp* jelenléte képes lehet befolyásolni, hogy melyik izoforma íródik át.



18. ábra - A Yaf2 izomformák mRNS szintje az *Rybp*^{+/+} sejtvonalban

A Yaf2 AB (lila) és NM (sárga) izoformáinak mRNS szintje *Rybp*^{+/+} sejtvonal in vitro neurális differenciációja során. A génexpressziós változásokat a *Hprt* kifejeződéséhez és a Yaf2 AB izoforma *Rybp*^{+/+} sejtvonal d0 mintájának mRNS szintjéhez normalizáltuk. Az y tengelyen a relatív génexpressziós változást, az x tengelyen a mintavételi napokat tüntettük fel. A párhuzamos mintákra szórást számoltunk: standard deviáció $\pm$ SD. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****)



19. ábra - A *Yaf2* izomformák mRNS szintje az *Rybp*^{-/-} sejtvonalon

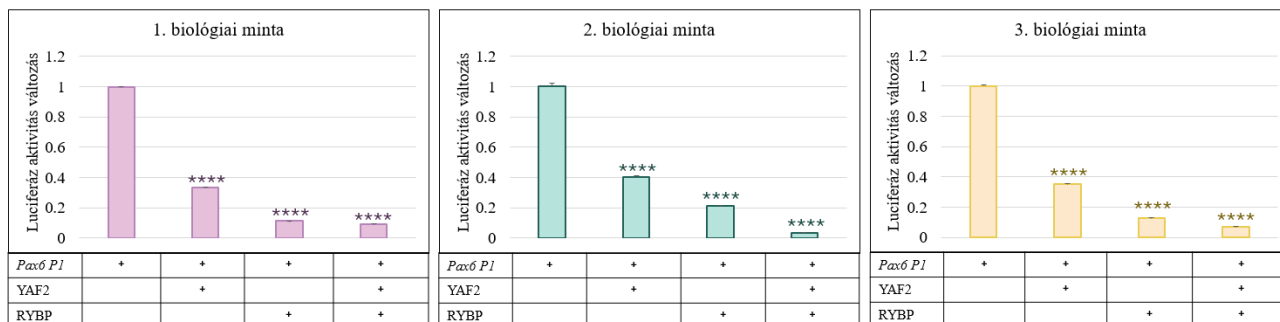
A *Yaf2* AB (lila) és NM (sárga) izomformáinak mRNS szintje *Rybp*^{-/-} sejtvonalon in vitro neurális differenciációja során. A génexpressziós változásokat a *Hprt* kifejeződéséhez és a *Yaf2* AB izoforma *Rybp*^{-/-} sejtvonala d0 mintájának mRNS szintjéhez normalizáltuk. Az y tengelyen a relatív génexpressziós változást, az x tengelyen a mintavételi napokat tüntettük fel. A párhuzamos mintákra szórást számoltunk: standard deviáció $\pm$ SD. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****)

6.9 Az RYBP és a YAF2 szabályozásának vizsgálata a *Pax6 P1* promóterén

Az mRNS alapú vizsgálatok rávilágítottak a génexpressziós szintekben található különbségekre, azonban nem adtak felvilágosítást a potenciális szabályozási mechanizmusokat illetően. Az RYBP-nek kitüntetett szerepe van a neuroprogenitorok fejlődése szempontjából csakúgy, mint a *Pax6* génnek. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy a *Pax6 P1* promóterét képes-e együttesen szabályozni az *Rybp*, a *Yaf2* és a *Paupar*, HEK 293 sejtekbe *Pax6 P1* promótert tartalmazó luciferáz vektort (pGL4.20) transzfektáltam, majd a *Pax6 P1* promóterét ko-transzfektáltam túltermelő plazmidok különböző kombinációjával.

Először a *Pax6 P1* promóterét transzfektáltam RYBP-vel és YAF2-vel. Három független biológiai mintával dolgoztam és ezekből három kísérletet hajtottam végre (20. ábra). Az eredmények alapján mind a YAF2, mind az RYBP képes egymagában represszálni a *Pax6 P1* promóterét.

Továbbá a represszió fokozható, ha YAF2-t és RYBP-t ko-transzfektálunk. Ez alapján elmondható, hogy a YAF2 és az RYBP képes közösen represszálni a *Pax6 P1* promóterét. Mivel a YAF2 és az RYBP együttesen nem fordulhat elő egy ncPRC1 komplexen belül, valószínűsítjük, hogy egymástól függetlenül több RYBP-t és YAF2-t tartalmazó komplex is összeszerelődik. Ezek a komplexek képesek represszorként bekötődni a *Pax6* promóteréhez, növelve a represszív hatást.

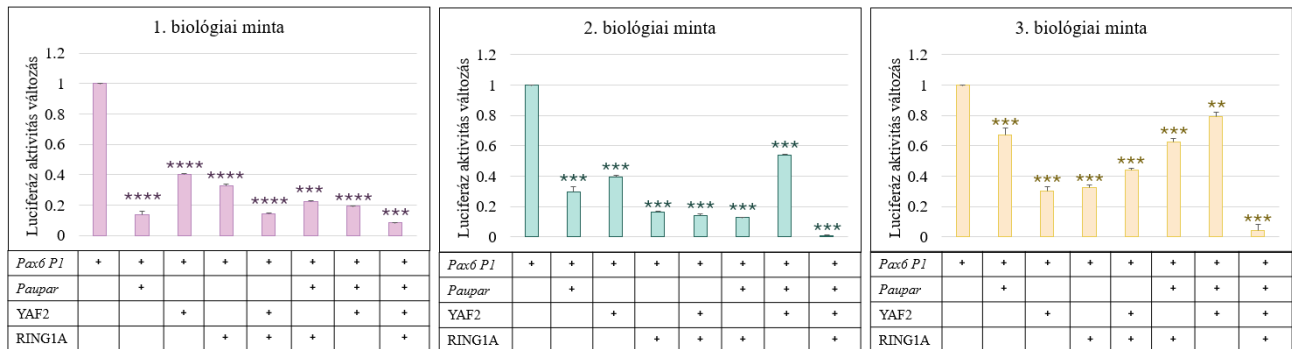


20. ábra - A YAF2 és az RYBP ko-expressziója erősebb repressziót vált ki a *Pax6 P1* promóterén, mintha csak az egyik lenne jelen

A HEK293 sejtekbe transzfektált plazmidok: *Pax6 P1* promóter, *Yaf2*, *Rybp*. A grafikonon az előbb felsorolt plazmidok különböző kombinációinak luciferáz aktivitása látható. A luciferáz aktivitás mértékét a *Pax6 P1* promóter luciferáz aktivitásához normalizáltuk. Az y tengelyen a luciferáz aktivitás normalizált mértéke, az x tengelyen a különböző transzekciós konstrukciók vannak feltüntetve. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****). Szórás: standard deviáció $\pm$ SD.

6.10 A YAF2 és a *Paupar* szabályozásának vizsgálata a *Pax6 P1* promóterén

Korábbi eredményeinkből tudjuk, hogy az RYBP képes a *Paupar*-ral együtt represszálni a *Pax6* promóterét (3.4 fejezet). Megvizsgáltuk, hogy a *Paupar* képes-e együtt szabályozni a YAF2-val a *Pax6 P1* promóterét. Ehhez a *Pax6 P1* promóterét transzfektálam *Paupar*-ral, YAF2-val és RING1A-val. A luciferáz riporter rendszer során három független biológiai mintával dolgoztam és ezekből három kísérletet hajtottam végre (21. ábra). Az eredményeink alapján a *Paupar* és a YAF2 együtt csak RING1A jelenlétében represszálja a *Pax6 P1* promóterét magasabb mértékben, mint külön-külön. Mivel a RING1A az ncPRC1 komplexek enzimatisz alegysége, arra következtettünk, hogy a YAF2 és a *Paupar* valószínűleg polikomb függő módon, az ncPRC1 komplex-el együttműködve képes represszálni a *Pax6 P1* promóterét.

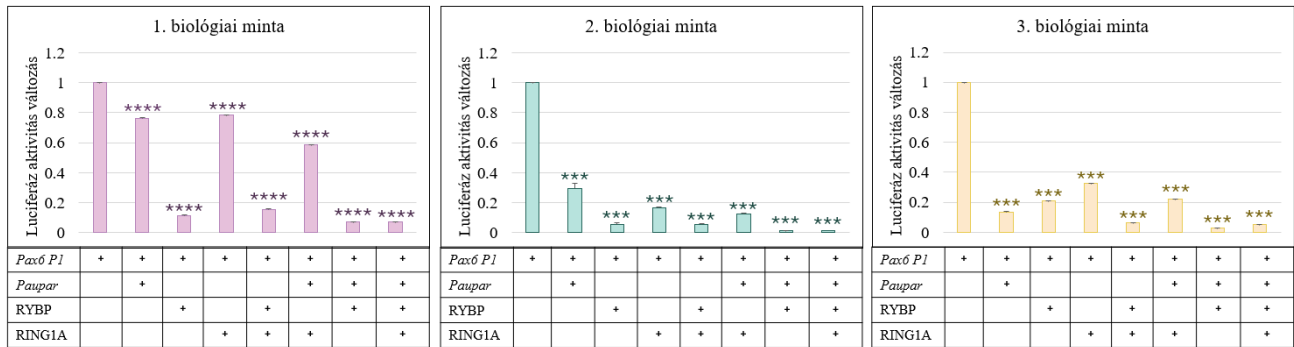


21. ábra - A YAF2 és a Paupar RING1A jelenlétében polikomb függő módon represszálja a Pax6 P1 promóterét

A HEK293 sejtekbe transzfektált plazmidok: Pax6 P1 promóter, Yaf2, Paupar, Ring1a. A grafikonon az előbb felsorolt plazmidok különböző kombinációinak luciferáz aktivitása látható. A luciferáz aktivitás mértékét a Pax6 P1 promóter luciferáz aktivitásához normalizáltuk. Az y tengelyen a luciferáz aktivitás normalizált mértéke, az x tengelyen a különböző transzfekciós konstrukciók vannak feltüntetve. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****). Szórás: standard deviáció $\pm$ SD.

6.11 Az RYBP és a Paupar szabályozásának vizsgálata a Pax6 P1 promóterén

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az RYBP a YAF2-hoz hasonló módon szabályozza-e a Pax6 P1 promóterét Paupar és RING1A jelenlétében. Korábbi adataink alapján tudjuk, hogy a Paupar az RYBP-vel közösen képes represszálni a Pax6 P1 promóterét. A kísérlet során a Pax6 P1 promóterét transzfektálam Paupar-al, RYBP-vel és RING1A-val. A luciferáz riporter rendszer során három független biológiai mintával dolgoztam és ezekből három kísérletet hajtottam végre (22. ábra). Az eredményeink alapján a Paupar és az RYBP ugyan képes együttesen is represszálni a Pax6 P1 promóterét, a vártak megfelelően, de a RING1A jelenlétében az együttes represszió nem lesz hatékonyabb. Ez alapján arra következtettünk, hogy az RYBP és a Paupar polikomb független módon képes együttesen represszáni a Pax6 P1 promóterét.

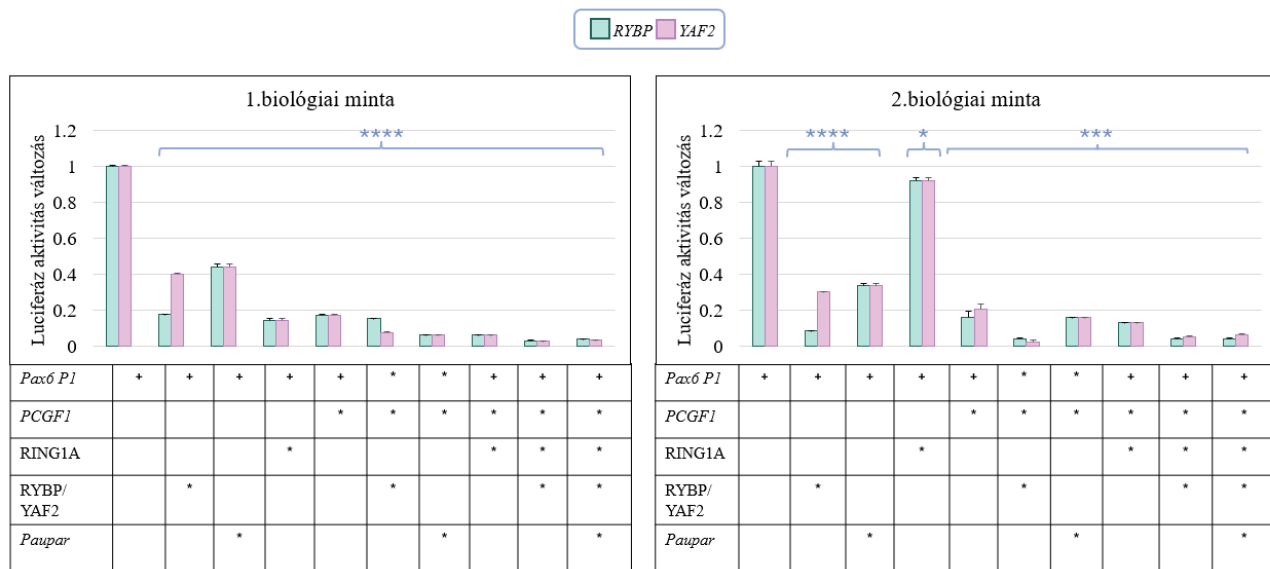


22. ábra - A Pax6 P1 promóterén az RYBP és a Paupar repressziója nem erősebb RING1A jelenlétében

A HEK293 sejtekbe transzfektált plazmidok: Pax6 P1 promóter, Rybp, Paupar, Ring1a. A grafikonon az előbb felsorolt plazmidok különböző kombinációinak luciferáz aktivitása látható. A luciferáz aktivitás mértékét a Pax6 P1 promóter luciferáz aktivitásához normalizáltuk. Az y tengelyen a luciferáz aktivitás normalizált mértéke, az x tengelyen a különböző transzfekciós konstrukciók vannak feltüntetve. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****). Szórás: standard deviáció $\pm$ SD.

6.12 Az ncPRC1.1 szabályozásának vizsgálata a Pax6 P1 promóterén

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a YAF2 és az RYBP melyik ncPRC1 részeként képesrepresszálni a Pax6 P1 promóterét. Ehhez a Pax6 P1 promóterét transzfektálam PCGF1-al, Paupar-al, RYBP-vel, YAF2-val és RING1A-val. A luciferáz riporter rendszer során két független biológiai mintával dolgoztam és ezekből két kísérletet hajtottam végre (23. ábra). A Pax6 P1 promóter a YAF2 erősebben represszálta PCGF1 jelenlétében, mint az RYBP, valamint a repressziót mind két esetben felerősítette, ha RING1A is jelen volt. A Paupar, ugyanakkor sem a YAF2 sem az RYBP esetében nem erősítette fel a PCGF1-el közös repressziót a Pax6 P1 promóterén. Eredményeink alapján a YAF2 és az RYBP, az irodalomnak megfelelően, képes polikomb függő módon represszálni a Pax6 P1 promóterét. Továbbá az eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a Paupar az ncPRC1.1-el nem represszálja közösen a Pax6 P1 promóterét.



23. ábra - A Pax6 P1 promóterén a legerősebb repressziót az váltotta ki amikor a PCGF1, RING1A és RYBP vagy YAF2 volt jelen és ez a represszió Paupar hozzáadásával nem erősödött.

A HEK293 sejtekbe transzfektált plazmidok: Pax6 P1 promóter, Pcgf1, Rybp, Yaf2, Paupar, Ring1a. A grafikonon az előbb felsorolt plazmidok különböző kombinációinak luciferáz aktivitása látható. A luciferáz aktivitás mértékét a Pax6 P1 promóter luciferáz aktivitásához normalizáltuk. Az y tengelyen a luciferáz aktivitás normalizált mértéke, az x tengelyen a különböző transzekciós konstrukciók vannak feltüntetve. Szignifikancia: t-próba ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****). Szórás: standard deviáció $\pm$ SD.

7. DISZKUSSZIÓ

Kutatásom céljául tűztük ki a neurális differenciáció vizsgálatát az ncPRC1 két központi tagjának, az Rybp és Yaf2-nak hiányában. Különös figyelmet fordítottunk a *Pax6* gén szabályozásának vizsgálatára, így a *Pax6 P1* promóter repressziójának további feltérképezésére.

Mindezt tettük azért, mert a YAF2-t tartalmazó ncPRC1 komplexek biológiai funkciójáról kevés adat áll jelenleg rendelkezésre és nincs megfelelő mennyiségű információ arról sem, hogy miért szerelődnek össze vagy RYBP-t vagy YAF2-t tartalmazó komplexek. A két fehérje specifikus célgénjei sem ismertek, nem tudjuk azt sem, hogy ezek a fehérjék hasonló vagy eltérő szerepet töltenek be a neurális differenciáció szabályozásában. Lehetséges, hogy a differenciáció kezdeti szakaszában, a progenitor stádiumban is már eltérő a szerepük, de ezt kísérletesen még nem igazoltuk. Három éves munkám során megvizsgáltam, hogy egy, a neuroprogenitor képzésben kritikus transzkripció faktor, a *Pax6* szabályozásában eltérhet-e a két ncPRC1 központi tag funkciója.

Ehhez először összehasonlítottuk a neurális differenciáció során jellegzetesen expresszálódó stádium specifikus gének alkalmazásával (*Oct4*, *NeuroD1*, *Nestin*, *Tubb3*), hogy eltér-e a dupla mutáns (*Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO}) neurális differenciációja a vad típusú (*Rybp*^{+/+}), illetve az *Rybp null* mutáns (*Rybp*^{-/-}) neurális differenciációjától. Azt tapasztaltuk, hogy az *Oct4* mRNS szintje az *Rybp*^{+/+} sejtvonalhoz hasonlóan a mutánsokban is lecsengett (**10. ábra**). Ez alapján arra következtettünk, hogy a mutáns sejtvonalak korlátozott képessége a neurális differenciációt illetően nem az *Oct4* csendesítés defektusában keresendő. Továbbá a *Nestin* (**11. ábra**), *NeuroD1* (**12. ábra**) és *Tubb3* (**13. ábra**) szintje az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} sejtvonal differenciációjának késői szakaszában alacsonyabb a másik két sejtvonalénál, ami a differenciáció defektusára enged következtetni. Ez egybevág a fenotípusnál észleltekkkel, hiszen mind az *Rybp null* mutáns mind pedig a dupla mutáns sejtvonal korlátozott mértékben képes differenciálódni. Az *Rybp*^{-/-} sejtek axonjai kevésbé komplex hálózatot hoztak létre és kevesebb sejtet érintettek, mint a másik két sejtvonal axonjai (**14. ábra**). Valamint a differenciáció terminális szakaszában a mutáns sejtvonalak jóval több neuroprogenitort és kevesebb terminálisan differenciálódott neuront tartalmaznak, mint a vad típusú sejtvonal (**15. ábra**).

A *Pax6* mRNS szintje fontos indikáció a neuroprogenitorok képzését illetően. Eredményeim azon korábbi megfigyelésünket alátámasztotta, hogy *Rybp* hiányában a *Pax6* mennyisége megnő a

neurális differenciáció során és ezzel arányosan a progenitorok is feldúsulnak. Illetve kimutattam, hogy a *Pax6* mRNS szintje alacsonyabb, a vad típusú sejtvonalhoz képest a dupla mutánsban **(16. ábra)**. Ez arra utal, hogy a progenitorok képződését a két ncPRC1 központi tag eltérően szabályozhatja.

Eredményeink alapján a *Paupar* mRNS szintje az *Rybp*^{KO}/*Yaf2*^{KO} sejtvonal differenciációja során magasabb, mint a másik két sejtvonalé **(17. ábra)**. Tehát *Rybp* és *Yaf2* hiányában a *Paupar* szintje megnő. Munkám során megvizsgáltuk a *Yaf2* két izoformájának, az AB és az NM izoformák mRNS mennyiségét az *Rybp*^{+/+} és az *Rybp*^{-/-} sejtvonalakban. Azt tapasztaltuk, hogy az *Rybp*^{+/+} sejtvonalban az AB izoforma **(18. ábra)**, míg az *Rybp*^{-/-} sejtvonalban az NM izoforma expressziója **(19. ábra)** volt a magasabb. Ezen eredmények alapján arra következtettünk, hogy az *Rybp* jelenlétének hatása lehet a *Yaf2* izoformák keletkezésére, továbbá ez alapján befolyásolhatja a *Yaf2* funkcióját és az expresszióját.

Dolgozatomban vizsgáltuk továbbá a *Pax6 P1* promóterének szabályozását luciferáz riporter rendszer segítségével. Eredményeink alapján a YAF2 és az RYBP ko-expressziója erősebb repressziót vált ki a *Pax6 P1* promóterén, mintha csak az egyik lenne jelen **(20. ábra)**. Lehetséges, hogy a YAF2-t és a RYBP-t tartalmazó komplexek kötőhelyei különböznek vagy nem teljesen fednek át, így amikor mindkét komplex jelen van a promóteren a represszió felerősödik. Általunk feltárt különbség a YAF2 és az RYBP lehetséges működését illetően, hogy a YAF2 és a *Paupar* RING1A jelenlétében polikomb függő módon **(21. ábra)**, míg az RYBP a *Paupar*-ral polikomb független módon **(22. ábra)** represszálja a *Pax6 P1* promóterét. A polikomb függő represszió további vizsgálatának érdekében PCGF1 jelenlétében is vizsgáltuk a *Pax6 P1* szabályozását **(23. ábra)**. A *Pax6 P1* promóter a legerősebben akkor represszálódott amikor együttesen a PCGF1, a RING1A és az RYBP vagy a YAF2 is jelen volt és ez a represszió *Paupar* hozzáadásával tovább már nem volt fokozható. Ezen eredmények alapján a PRC1.1 komplex nem represszál közösen a *Paupar*-ral.

A dolgozatomban feltárt kérdések hozzájárulnak az emlős ncPRC1 két központi tagjának, az *Rybp* és a *Yaf2* neurális fejlődés során betöltött szerepének megértéséhez és a neuroprogenitorok képzésében fontos *Pax6 P1* gén szabályozásának pontosabb feltérképezéséhez. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az ncPRC1 RYBP és YAF2 alegységek sokfélesége hozzájárul az aprólékos és pontos génexpresszióhoz az egér embrionális őssejtek idegi differenciálódása során.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Lajtha, Laszlo G. "Stem cell concepts." *Differentiation* 14.1-3 (1979): 23-33.
- [2] Morrison, S., Kimble, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441, 1068–1074 (2006).
- [3] Alison, Malcolm R., et al. "An introduction to stem cells." *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 197.4 (2002): 419-423.
- [4] Merkle, Florian T., and Arturo Alvarez-Buylla. "Neural stem cells in mammalian development." *Current opinion in cell biology* 18.6 (2006): 704-709.
- [5] PAN, G., CHANG, Z., SCHÖLER, H. *et al.* Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res* 12, 321–329 (2002).
- [6] Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G. *et al.* Nestin expression – a property of multi-lineage progenitor cells?. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2510–2522 (2004).
- [7] Boutin, C.; Hardt, O.; de Chevigny, A.; Coré, N.; Goebbels, S.; Seidenfaden, R.; Bosio, A.; Cremer, H. NeuroD1 induces terminal neuronal differentiation in olfactory neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 1201–1206.
- [8] Radwitz, J., Hausrat, T.J., Heisler, F.F. *et al.* Tubb3 expression levels are sensitive to neuronal activity changes and determine microtubule growth and kinesin-mediated transport. *Cell. Mol. Life Sci.* 79, 575 (2022).
- [9] Callaerts P, Halder G, Gehring WJ. PAX-6 in development and evolution. *Annu Rev Neurosci.* 1997;20:483-532.
- [10] Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RA, Bulfone A, Kowalczyk T, Hevner RF. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci.* 2005 Jan 5;25(1):247-51.
- [11] Anderson, Tonya R., Eva Hedlund, and Ellen M. Carpenter. "Differential Pax6 promoter activity and transcript expression during forebrain development." *Mechanisms of development* 114.1-2 (2002): 171-175.
- [12] Vance, Keith W., et al. "The long non-coding RNA Paupar regulates the expression of both local and distal genes." *The EMBO journal* 33.4 (2014): 296-311.
- [13] Xu, Yanxin, et al. "PAUPAR and PAX6 sequentially regulate human embryonic stem cell cortical differentiation." *Nucleic acids research* 49.4 (2021): 1935-1950.
- [14] Neira, José L., et al. "The transcriptional repressor RYBP is a natively unfolded protein which folds upon binding to DNA." *Biochemistry* 48.6 (2009): 1348-1360.
- [15] Pirity, Melinda K., Joseph Locker, and Nicole Schreiber-Agus. "Rybp/DEDAF is required for early postimplantation and for central nervous system development." *Molecular and cellular biology* 25.16 (2005): 7193-7202.
- [16] Kovacs, Gergo, Viktoria Szabo, and Melinda K. Pirity. "Absence of Rybp compromises neural differentiation of embryonic stem cells." *Stem cells international* 2016 (2016).

- [17] Sutus, E., Henry, S., Adorján, L. *et al.* RYBP regulates *Pax6* during in vitro neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Sci Rep* 12, 2364 (2022).
- [18] Henry, Surya, Viktória Szabó, Enikő Sutus, and Melinda Katalin Pirity. "RYBP is important for cardiac progenitor cell development and sarcomere formation." *PLoS One* 15, no. 7 (2020): e0235922.
- [19] Henry, Surya, Lilla Kokity, and Melinda Katalin Pirity. "Polycomb protein RYBP activates transcription factor *Plagl1* during in vitro cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells." *Open Biology* 13.2 (2023): 220305.
- [20] García, Emiliano, et al. "RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian Polycomb complex, and with the transcription factor YY1." *The EMBO journal* (1999).
- [21] Kaneko, Tomomi, et al. "The mouse YAF2 gene generates two distinct transcripts and is expressed in pre- and postimplantation embryos." *Gene* 315 (2003): 183-192.
- [22] Zhao, Wukui, Mengjie Liu, Haijing Ji, Yaru Zhu, Congcong Wang, Yikai Huang, Xiaoqi Ma et al. "The polycomb group protein Yaf2 regulates the pluripotency of embryonic stem cells in a phosphorylation-dependent manner." *Journal of Biological Chemistry* 293, no. 33 (2018): 12793-12804.
- [23] Gao, Zhonghua, et al. "An AUTS2–Polycomb complex activates gene expression in the CNS." *Nature* 516.7531 (2014): 349-354.
- [24] Schwartz, Yuri B., and Vincenzo Pirrotta. "A new world of Polycombs: unexpected partnerships and emerging functions." *Nature Reviews Genetics* 14.12 (2013): 853-864.
- [25] Turner, Siobhán A., and Adrian P. Bracken. "A “complex” issue: deciphering the role of variant PRC1 in ESCs." *Cell stem cell* 12.2 (2013): 145-146.
- [26] Zhao, Jicheng, et al. "RYBP/YAF2-PRC1 complexes and histone H1-dependent chromatin compaction mediate propagation of H2AK119ub1 during cell division." *Nature cell biology* 22.4 (2020): 439-452.
- [27] Ciapponi, Maria, et al. "Structural basis of the histone ubiquitination read–write mechanism of RYBP–PRC1." *Nature Structural & Molecular Biology* (2024): 1-5.
- [28] Chavdoula, Evangelia, et al. "Transcriptional regulation of amino acid metabolism by KDM2B, in the context of ncPRC1. 1 and in concert with MYC and ATF4." *Metabolism* 150 (2024): 155719.
- [29] Nagy, Andras, et al. "Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90.18 (1993): 8424-8428.
- [30] Zhao, J., Wang, M., Chang, L. et al. RYBP/YAF2-PRC1 complexes and histone H1-dependent chromatin compaction mediate propagation of H2AK119ub1 during cell division. *Nat Cell Biol* 22, 439–452 (2020).
- [31] Bibel, M. et al. Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nat. Neurosci.* 7, 1003–1009 (2004).
- [32] Kingston, Robert E., Claudia A. Chen, and John K. Rose. "Calcium phosphate transfection." *Current protocols in molecular biology* 63.1 (2003): 9-1.

9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani a témavezetőmnek Dr. Pirty Melinda Katalin tudományos főmunkatársnak a dolgozatomhoz nyújtott iránymutatásáért és segítségéért. Valamint a felbecsülhetetlen szakmai tudásért, amit az eddigi ittlétem alatt szereztem.

Továbbá szeretném megköszönni az Embrionális és Indukált Pluripotens Össejt Csoport tagjainak a rengeteg segítséget és bátorítást. Különösen Kókity Lilla PhD hallgatónak, akitől rengeteg értékes tapasztalatot szereztem és akihez bármilyen kérdéssel fordulhattam, arra mindig igyekezett átfogó és alapos választ adni. Kokavszky Katalin ügyvivő szakértőnek, akitől szintén számos dolgot tanultam és aki számos dologban segített az ittlétem során. Négyessy Áron és Vajda Livia hallgatótársaimnak a támogatást. Valamint Dudásné Kovács Anita ügyvivő szakértőnek és Aynura Seytjanova PhD hallgatónak. Továbbá Adorján Lilinek, akinek a korábbi eredményei mutattak utat az én kutatásomhoz és aki a kezdetekben rengeteg szakmai tudással és gyakorlati tapasztalattal látott el.

Köszönöm továbbá Dr. Erdélyi Miklósnak, hogy az Szegedi Biológiai Kutatóközpont Genetikai Intézetében írhattam dolgozatomat. Az ELKH-SZBK Mikroszkópos Sejtanalízis Laboratóriumnak a mikroszkópos felvételek elkészítése során nyújtott segítséget. Nyári Dórának a luciferáz aktivitás mérése során nyújtott segítségét.

Valamint szeretném megköszönni belső konzulensemnek, Dr. Sinka Rita egyetemi docensnek a dolgozatomhoz nyújtott támogatását.

A dolgozatomban szereplő kutatásokat a következő pályázatok támogatták: GINOP-2.3.2 15-2016-00001 és a GINOP-2.3.2-15-2016-00039.

10. MELLÉKLETEK

táblázat 1 - A qRT-PCR-hez használt primerek szekvenciái

Gén név	Forward primer szekvencia (5'-3')	Reverz primer szekvencia (5'-3')
<i>Hprt</i>	AGTCCCAGCGTCGTGATTAG	GCAAGTCTTTTCAGTCCTGTCC
<i>Nestin</i>	AGTGCCCAGTTCTACTGGTGTC	CCTCTAAAATAGAGTGTTGAGGGTTGA
<i>NeuroD1</i>	CGAGTCATGAGTGCCCAGCTTA	CCGGGAATAGTGAAACTGACGTG
<i>Oct4</i>	AGCCGACAACAATGAGAACC	TCTCCAGACTCCACCTCACA
<i>Pax6</i>	CTTGGGAAATCCGAGACAGA	CTAGCCAGGTTGCGAAGAAC
<i>Paupar</i>	ACCATCACCCCTGCAATAGTTC	AGCAGCCTTTGAGCCATCTC
<i>Rybp</i>	AGACCAGCGAAACAAACCAC	GGAGGAGGAGCGAGTCTTTT
<i>Tubb3</i>	TGAGGCCTCCTCTCACAAGT	GGCCTGAATAGGTGTCCAAA
<i>Yaf2 AB</i>	CTCTCAGGATGAAGCCACG	CTTGTCCTTCTCTACTCGGTCTT
<i>Yaf2 NM</i>	ACCTCCACCCGGAAGCCA	CTTCGACTGGGTAGGGGGCA

táblázat 2 - Össejtek *in vitro* fenntartása során használt anyagok adatai

Név	Gyártó	Katalógus szám
zselatin	Sigma	G9391
1x PBS (Phosphate Buffered Saline, Ca-, Mg- (1X))	Gibco	14190-144
10x tripszin	Thermofisher	15411-054
Össejtes tápoldat		
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM (1x))	Gibco	31966-021
15% össejtes szérum (Characterized Fetal Bovine Serum (FBS))	HyClone	SH30071.03E
1% nem esszenciális aminosavak (Minimum Essential Medium (MEM) Nonessential Amino Acids (100x))	Corning	25-025CI
0,1 mM β-merkaptóetanol (2-Mercaptoethanol (50 mM))	Gibco	31350-010
1% nátrium piruvát (Sodium Pyruvate (100 mM))	Gibco	11360-039
50 U/ml penicillin-sztreptomycin (10,000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	PAN Biotech	P06-07100
leukémia gátló faktor (Leukemia Inhibitory Factor (LIF))	ESGRO	ESG1107
GlutaMAX™ Supplement	Gibco	31966047
L-Glutamine	Gibco	25030-024

táblázat 3 - A neurális differenciáció során használt anyagok adatai

Név	Gyártó	Katalógus szám
DMSO	Sigma-Aldrich	D5879-1LM
Retinsav	Sigma-Aldrich	R2625-100MF
Poli-L-ornitin	Sigma-Aldrich	P4957-50ML
Laminin	Sigma-Aldrich	L2020
Neurális A médium		
DMEM/F12 (1:1) (1x)	Gibco	31331028
GlutaMax (100x)	Gibco	35050-038
15% össejtes szérum (Characterized Fetal Bovine Serum (FBS))	HyClone	SH30071.03E
1% nem esszenciális aminosavak (Minimum Essential Medium (MEM) Nonessential Amino Acids (100x))	Corning	25-025CI
N-2 Supplement (100x)	Gibco	17502048
rh-FGF	Shenandoah	100-146
Neurális B médium		
DMEM/F12 (1:1) (1x)	Gibco	31331028
Neurobasal medium	Gibco	21103049
15% össejtes szérum (Characterized Fetal Bovine Serum (FBS))	HyClone	SH30071.03E

GlutaMax (100x)	Gibco	35050-038
1% nem esszenciális aminosavak (Minimum Essential Medium (MEM) Nonessential Amino Acids (100x))	Cornig	25-025Cl
50 U/ml penicillin-sztreptomycin (10,000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	PAN Biotech	P06-07100
N-2 Supplement (100x)	Gibco	17502048
B-27 Supplement	Gibco	17504044
proteáz mentes ABS	VWR	422361V

táblázat 4 - A génexpressziós vizsgálatok során használt anyagok adatai

Név	Gyártó	Katalógus szám
1x PBS (Phosphate Buffered Saline, Ca-, Mg- (1X))	Gibco	14190-144
0,1 mM β -merkaptóetanol (2-Mercaptoethanol (50 mM))	Gibco	31350- 010
lízis puffer	Thermo Fisher Scientific	K0732
GeneJET RNA Purification Kit	Thermo Fisher Scientific	K0732
nukleáz mentes víz	AccuGENE	51200
cDNA Reverse Transcription kit	Thermo Fisher Scientific	4368814
GO Taq polimerázt	Promega	M8305
SYBR GREEN	Thermo Fisher Scientific	4472942

táblázat 5 - A luciferáz riporter rendszer során használt anyagok adatai

Név	Gyártó	Katalógus szám
1x PBS (Phosphate Buffered Saline, Ca-, Mg- (1X))	Gibco	14190-144
Tris-EDTA	Sigma	T1503
Hepes buffered saline	Sigma	H3375
Luciferase Assay System	Promega	E1500
BSA	Sigma	B2518
OptiPlate-96 Black	Perkin Elmer	6005279
HEK 293 tápoldat		
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM (1x))	Gibco	31966-021
15% őssejtes szérum (Characterized Fetal Bovine Serum (FBS))	HyClone	SH30071.03E
1% nem esszenciális aminosavak (Minimum Essential Medium (MEM) Nonessential Amino Acids (100x))	Cornig	25-025Cl
1% nátrium piruvát (Sodium Pyruvate (100 mM))	Gibco	11360-039
50 U/ml penicillin-sztreptomycin (10,000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	PAN Biotech	P06-07100

példa 1 - Példa a luciferáz riporter rendszer igazolására Western blot segítségével

